

Erika Maria do Nascimento Kalmar

Avaliação da resistência do HIV-1 às drogas anti-retrovirais em 150 pacientes em interrupção terapêutica por mais de seis meses

Tese apresentada à faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Medicina.

Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias

Orientadora: Profa. Dra. Ester Cerdeira Sabino

São Paulo

2007

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Ester Cerdeira Sabino

Agradeço às instituições que contribuíram para a realização deste trabalho, e em especial:

A atenção dos médicos dos ambulatórios do CRT DST/AIDS e Casa da AIDS.

Aos profissionais da coleta, do laboratório e transporte de material biológico do CRT DST/AIDS e Casa da AIDS.

Ao Laboratório de Biologia Molecular da Fundação Pró-Sangue.

A atenção e dedicação da bióloga Suzete Ferreira, à Cláudia Barreto e ao Sabri Sanabyen pela contribuição ao trabalho.

À Sanny Chen, e ao Dr. Willi Mc Farland do Departamento de Saúde Pública de San Francisco-CA, pelas análises estatísticas e considerações .

Ao apoio da Dra. Leda Jamal do CRT e da Dra. Marta Heloísa Lopes da FMUSP.

Aos pacientes, que permitiram a realização deste estudo.

Aos meus pais pelo incentivo.

Esta pesquisa teve o apoio financeiro da Fundação para o Amparo a pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP 2002/04016-4).

SUMÁRIO

Lista de abreviações e siglas

Lista de tabelas

Lista de figuras

Resumo

Summary

1.	Introdução.....	1
1.1	O tratamento.....	1
1.2	A resistência aos anti-retrovirais.....	4
1.3	A interrupção da terapia.....	9
1.4	Identificação das mutações de Resistência aos ARVs.....	19
1.5	Como surgem as mutações.....	20
1.5.1	Resistência aos anti-retrovirais IPs	21
1.5.2	Resistência aos anti-retrovirais NRTIs.....	24
1.5.3	Resistência aos anti-retrovirais NNRTIs.....	28
1.6	Resistência cruzada.....	29
1.7	<i>Fitness</i> viral.....	29
1.8	Os subtipos virais.....	30
1.9	Justificativa do estudo.....	31
1.9.1	Objetivos gerais.....	33
1.9.2	Objetivos específicos.....	33
2.	Materiais e Métodos.....	34
2.1	Casuística.....	34

2.2	Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e genotipagem para o HIV-1.....	38
2.2.1	PCR para o HIV-1.....	38
2.2.2	Reação de sequenciamento.....	42
2.3	Análise filogenética.....	43
2.4	Análise estatística.....	44
3.	Resultados.....	45
4.	Discussão.....	57
5.	Conclusões.....	69
	Referências.....	70
	Anexo A	
	Anexo B	
	Anexo C	

LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

3TC	Lamivudina
ABC	Abacavir
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Humana Adquirida
APV	Amprenavir
ARV	Anti-retroviral
ARVs	Anti-retrovirais
AZT	Zidovudina
Casa da AIDS	Serviço de Extensão ao Atendimento de Pacientes com HIV/AIDS da Divisão de Clínicas de Moléstias Infecciosas e Parasitárias do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
CRT/DST AIDS	Centro de Referência e Treinamento DST/AIDS de São Paulo
D4T	Estavudina
DDC	Zalcitabina
DDI	Didanosina
DHHS	Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos EUA
DLV	Delavudina
DNA	cido desoxirribonucleico
DRV	Darunavir

EFV	Efavirenz
EUA	Estados Unidos da América
FDA	Food and Drug Administration
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
FTC	Emcitribina
HAART	Terapia anti-retroviral de alta eficácia
HIV	Vírus da imunodeficiência humana adquirida
HIV-1	Vírus da imunodeficiência humana adquirida tipo 1
IAS	Seção Americana da Sociedade Internacional de AIDS
IDV	Indinavir
IET	Interrupção estruturada do tratamento
IP(s)	Inibidor(es) da protease
IQ	Intervalo interquartil
IT(s)	Interrupção(ões) terapêutica(s)
LPV/rtv	Lopinavir/ritonavir
min.	Minutos
NFV	Nelfinavir
NIAID	National Institute of Allergy and Infectious Diseases
NNRTIs	Não análogos nucleosídeos inibidores das transcriptase reversa
NR	Não resistentes

NRTI(s)	Análogo(s) nucleosídeo(s) inibidore(s) da(s) transcriptase reversa
NVP	Nevirapina
PBMC	Células mononucleares periféricas
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PR	Protease
R	Resistentes
RENAGENO	Rede Nacional de Genotipagem
RNA	Ácido ribonucleico
RTV	Ritonavir
seg.	Segundos
SQV	Saquinavir
T20	Enfuvirtide
TDF	Tenofovir
TPV	Tipranavir
TR	Transcriptase reversa

LISTA DE TABELAS

Tabela A.	Histórico do fornecimento dos anti-retrovirais no estado de São Paulo.....	2
Tabela 1.	Características sócio-epidemiológicas de 150 pacientes em interrupção terapêutica. São Paulo, Brasil.....	45
Tabela 2.	Características de tratamento e causas das interrupções Terapêuticas (ITs) de 150 pacientes.....	46
Tabela 3.	Medianas de CD4 e da carga viral: no início da terapia anti-retroviral (ARV), anterior à interrupção da terapia e anterior à coleta do exame de genotipagem.....	49
Tabela 4.	Características dos regimes de tratamento e interrupção terapêutica em 137 pacientes.....	50
Tabela 5.	Valores de carga viral e CD4 de acordo com a presença de resistência aos anti-retrovirais nos períodos: início do tratamento, anterior à interrupção da terapia, anterior à coleta do exame de genotipagem.....	51
Tabela 6.	Período de interrupção terapêutica (IT), mutações de resistência aos anti-retrovirais e indicações para a IT em 38 pacientes.....	54

LISTA DE FIGURAS

- Figura A.** Mapa esquemático das regiões seqüenciadas dos genes *Pol* do HIV-1.....41
- Figura 1.** Motivos das Interrupções Terapêuticas conforme a natureza da decisão.....47
- Figura 2.** Resistência dos 38 pacientes de acordo com as classes dos anti-retrovirais.....52
- Figura 3.** Mutações no gene da TR de 38 pacientes com resistência....55
- Figura 4.** Mutações no gene da PR de 38 pacientes com resistência....56

RESUMO

Kalmar EMN. Avaliação da resistência do HIV-1 às drogas anti-retrovirais em 150 pacientes em interrupção terapêutica por mais de seis meses [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2007. 181p.

INTRODUÇÃO: A mudança nos critérios de introdução das drogas anti-retrovirais, assim como a dificuldade na manutenção da terapia anti-retroviral de alta eficácia, tem levado à descontinuação da terapêutica por longo período de tempo em alguns pacientes infectados pelo Vírus da Imunodeficiência Humana Adquirida-Tipo 1 (HIV-1). O objetivo deste estudo foi a caracterização dos fatores que levam à interrupção terapêutica e a avaliação da persistência da resistência aos anti-retrovirais após a interrupção da terapia anti-retroviral. **MÉTODOS:** Foram incluídos na pesquisa 150 pacientes de dois serviços de atendimento ambulatorial de atenção a pacientes infectados pelo HIV-1 da cidade de São Paulo, os quais se achavam em interrupção terapêutica havia pelo menos 6 meses. Os pacientes foram submetidos a um questionário e houve consulta aos prontuários. Foi realizada coleta de amostra de sangue para teste de genotipagem. O DNA pró-viral foi amplificado e seqüenciado para a região da protease e transcriptase reversa do vírus. As seqüências foram analisadas por meio do algoritmo de Stanford, sendo consideradas resistentes as amostras com resultado parcial ou completo de resistência a pelo menos uma droga. **RESULTADOS:** Dos 150 pacientes, 137 tiveram DNA do HIV-1 amplificado e seqüenciado, sendo que 38 (27,7%) apresentaram cepas resistentes. Entre os 38 pacientes com resistência, 29 (76,3%) apresentavam mutações para os análogos nucleosídeos inibidores da transcriptase reversa, 15 (39,4%) para os não análogos nucleosídeos inibidores da transcriptase reversa, e 5 (13,1%) para os inibidores da protease. A detectabilidade da carga viral antes da interrupção terapêutica foi o único fator associado com a resistência do vírus. Cento e dez (73,3%) pacientes suspenderam a medicação por orientação médica. A principal causa das interrupções terapêuticas foram os efeitos adversos para 58 (38,7%), seguida de 45 (30,0%) pacientes fora dos critérios atuais de início da terapia e/ou boas condições clínico/laboratoriais, e baixa adesão em 30 (20%). No ano anterior à pesquisa, 56 (37,3%) pacientes relataram relação sexual desprotegida e 130 (86,7%) mais que 2 parceiros. **CONCLUSÕES:** A freqüência de mutações de resistência revelou-se alta nesse grupo de pacientes. Tais mutações parecem ter um *fitness* semelhante ao das cepas selvagens, pois mesmo sem a pressão seletiva do medicamento por mais de 6 meses, mantiveram-se como cepas majoritárias. O aumento da carga viral, associado a comportamentos de risco, torna esses indivíduos uma fonte de cepas resistentes para a população, reforçando a necessidade de atenção especial para a prevenção da transmissão do HIV-1 nesse segmento de pacientes.

Descritores: 1. HIV-1 2. Anti-retrovirais 3. Genótipo 4. Resistência viral a drogas 5. Anti-retrovirais/efeitos adversos

SUMMARY

Kalmar EMN. Evaluation of HIV-1 drug resistance among 150 patients that were in therapeutic interruption for more than 6 months. [thesis] Faculty of Medicine, University of São Paulo, SP (Brazil); 2007. 181p.

INTRODUCTION: Changes in guidelines for antiretroviral introduction and difficulties in maintaining Highly Active Antiretroviral Therapy have lead some physicians in Brazil to interrupt for long periods of time the treatment in some Human Immunodeficiency Virus-1 (HIV-1) infected patients. The objective of this study was to evaluate the causes that influenced long term treatment interruption and to determine the frequency of resistant strains among these patients. **METHODS:** A total of 150 patients, previously treated with antiretroviral therapy and under treatment interruption TI for at least 6 months, were recruited from two HIV outpatients clinics in São Paulo city. Patients responded to a questionnaire and the medical records were also analyzed. Plasma samples were obtained to HIV-1 genotypic resistance test. DNA was amplified for the protease and reverse transcriptase gene. Sequences were analyzed using Stanford algorithm; samples were considered resistant if they resulted in partial or complete resistance to at least one drug. **RESULTS:** One hundred thirty seven of the 150 samples had their DNA amplified, 38 (27.7%) of them harboring a resistant strain. Nucleoside reverse-transcriptase inhibitors, nonnucleoside reverse-transcriptase inhibitors and protease inhibitors associated mutations were present in 29 (76.3), 15 (39.4%) and 5 (13.1%) samples respectively. We could only associate presence of resistance to viral load detection before TI.. Of the 150 patients, 110 (73.3%) had interrupted treatment following medical advice, the remaining stopped by their own decision. The reasons for TI were: 58 (38.7%) had ARV-related side-effects, 45 (30.0%) had good laboratory parameter and/or started therapy based on criteria that were no longer used, 30 (20.0 %) had poor adhesion. During the 12 months prior to the study, there were 56 (37.3%) who had unprotected sexual relations and 130 (86.7%) had had sex with two or more partners. **CONCLUSION:** The frequency of drug resistance strains in this group of patients was high. These strains seem to have a good fitness because they were present after 6 months of drug interruption. The high viral load associated to non sexual protection in this group of patients may lead to increase in transmission of drug resistance strains. This highlights the need of prevention measures in this special group.

Descriptors: 1.HIV-1 2.Anti-retroviral agents 3.Genotype 4.Viral drug resistance 5. Antiretroviral agents/adverse effects

1. INTRODUÇÃO

1.1 O tratamento

O Brasil possui um terço dos casos de indivíduos infectados pelo vírus da imunodeficiência humana adquirida tipo-1 (HIV-1) na América Latina e apresenta estimativa da taxa de prevalência das pessoas com HIV/AIDS (Síndrome da Imunodeficiência Humana Adquirida) de 0,5 (0,3-1,6)% na população adulta (15 a 49 anos) (UNAIDS, 2007). Foi o primeiro país a ter um programa governamental para o controle da Síndrome da Imunodeficiência Humana Adquirida (AIDS), com distribuição gratuita de anti-retrovirais (ARVs) para o tratamento da infecção/doença pelo HIV-1. É reconhecido como exemplo internacional para países em desenvolvimento (Marins et al. 2003; UNAIDS 2007). Atualmente, mais de 180 mil pessoas são beneficiadas pelo tratamento (UNAIDS, 2007). A cidade de São Paulo é tida como provável epicentro da epidemia; em 1980, nessa cidade, registrou-se, em um homem homossexual, o primeiro caso de AIDS do país (Boletim AIDS, Vol VIII, nº 4, 1995). Hoje é uma das cidades brasileiras com mais alta taxa de incidência: 27,2 por 100.000 habitantes (AIDST Ano 1 nº 1, 2004). Na Tabela A, conforme dados do Núcleo de Controle e Distribuição de Medicamentos da Coordenação Estadual DST/AIDS para o tratamento da infecção pelo HIV, observa-se o histórico do fornecimento dos medicamentos no estado de São Paulo.

Tabela A. Histórico do fornecimento dos anti-retrovirais no estado de São Paulo

ANTI-RETROVIRAIS	Liberação para uso
ANÁLOGOS NUCLEOSÍDEOS	
Zidovudina (AZT)	abril/91
Didanosina (DDI)	março/93
Zalcitabina (DDC)	junho/96
Lamivudina (3TC)	outubro/96
Estavudina (D4T)	fevereiro/97
Zidovudina + Lamivudina	junho/98
Abacavir (ABC)	dezembro/01
NÃO ANÁLOGOS NUCLEOSÍDEOS	
Nevirapina (NVP)	outubro/98
Delavirdina (DLV)	janeiro/99
Efavirenz (EFV)	agosto/99
ANÁLOGO NUCLEOTÍDEO	
Tenofovir (TDF)	setembro/03
INIBIDORES DA PROTEASE	
Ritonavir (RTV)	outubro/96
Saquinavir (SQV)	outubro/96
Indinavir (IDV)	outubro/96
Nelfinavir (NFV)	agosto/98
Amprenavir (APV)	abril/01
Lopinavir/Ritonavir	março/02
INIBIDOR DE FUSÃO	
Enfuvirtide	dezembro/06

O medicamento Zidovudina (AZT) foi a primeira droga liberada pelo Food and Drug Administration (FDA - órgão responsável pela liberação dos medicamentos nos Estados Unidos), em 18 de março de 1987, para o tratamento da infecção pelo HIV (FDA, 2006). Inicialmente, só havia a possibilidade de se empregar monoterapia com os análogos nucleosídeos inibidores das transcriptase reversa (NRTIs). Com o advento de novos

medicamentos, a terapia dupla — com drogas da mesma classe — passou a ser usada. Em seguida, veio a terapia anti-retroviral alta eficácia: HAART, que emprega inibidores da protease (IPs) e análogos não nucleosídeos inibidores da transcriptase reversa (NNRTIs), pertencentes a diferentes classes de drogas.

O tratamento da infecção pelo HIV-1 com drogas inibidoras da protease ou não nucleosídeos inibidoras da enzima transcriptase reversa com dois análogos nucleosídeos mudou dramaticamente a história natural da infecção causada pelo HIV. Por meio do controle da replicação viral e da reversão ou prevenção da imunodeficiência, impediu-se a progressão para a doença (Mocroft et al. 1998b; Palella et al. 1998).

Como já demonstrado em vários estudos clínicos, a efetividade do HAART está em reduzir a carga viral e prolongar a sobrevida, sem o aparecimento de doenças relacionadas à AIDS (Cameron et al. 1998; Collier et al. 1996; Gulick et al. 1997). Desde a introdução dessa terapia na prática clínica, as hospitalizações e mortes ligadas à doença apresentaram um decréscimo significativo (Mocroft et al. 1998b; Palella et al. 1998). Também no Brasil, graças ao fornecimento iniciado em 1996, pelo Programa Nacional de Tratamento da Infecção pelo HIV, de drogas inibidoras da enzima protease, houve um importante decréscimo no número de pacientes com infecção oportunista e aumento da sobrevida dos pacientes infectados (Casseb et al. 2001; Casseb et al. 1999; Chequer et al. 2002; Marins et al. 2003). A terapia anti-retroviral (ARV) teve impacto significativo não só na

diminuição da morbidade e mortalidade, como também queda na disseminação da infecção pelo HIV-1 (Palella et al. 1998; Yerly et al. 2001).

1.2 A resistência aos anti-retrovirais

Pacientes primariamente infectados com cepas de HIV-1 resistentes ao AZT foram identificados logo em 1993, seis anos após a introdução da droga no tratamento da infecção pelo HIV-1 (Erice et al. 1993). Desde o início do fornecimento do HAART, em 1996, também começou a ser descrita a transmissão de cepas de HIV -1 com resistência a uma ou múltiplas drogas ARVs (Little et al. 2002).

Está demonstrado que um significativo número de pacientes apresenta falência às combinações de drogas, em virtude do desenvolvimento da resistência genotípica do HIV-1 (Young et al. 1998). Em uma meta-análise com 21 grupos de pacientes randomizados para estudos clínicos, somente 46% foram capazes de atingir carga viral <50 cópias/ml em 48 semanas (Bartlett et al. 2001). Em estudos de base populacional sobre o uso de terapia anti-retroviral de alta eficácia (HAART), conduzidos em pacientes não selecionados pré-tratamento, a falência virológica ocorreu em quase 50% após 6-12 meses de terapia (Fatkenheuer et al. 1997; Mocroft et al. 1998a). Com 8 meses, por volta de 25% dos pacientes descontinuaram o regime HAART inicial devido a falência, toxicidade ou não adesão (d'Arminio Monforte et al. 2000). Outros estudos clínicos confirmam que é inferior a 40-50% o percentual dos pacientes que mantêm supressão viral um ano após o início do esquema terapêutico (Deeks et al. 1999; Lucas et al. 1999).

No passado, quando se suspeitava de resistência virológica, acreditava-se que esta havia se desenvolvido para todas as drogas do regime já falido e que o vírus ainda era suscetível às drogas não empregadas previamente. Uma estratégia que passou a ser usada foi o emprego de drogas virgens de uso, evitando-se as usadas previamente (Carpenter et al. 1998). Com frequência, essa forma de tratamento não resultava em sucesso. A maioria dos vírus não se torna resistente a todas as drogas do regime falido e algumas drogas virgens de uso poderiam não estar sendo efetivas devido a resistência cruzada entre elas (Call et al. 2001).

As infecções por vírus RNA são marcadas pelas variações genéticas virais e o HIV-1 não é uma exceção (Condra 1998; Desai et al. 1986; Hahn et al. 1986). Os retrovírus pertencem a um dos grupos de maior disseminação e, provavelmente, mais biologicamente diversos dentre os agentes infecciosos que atingem os vertebrados. Estudos demonstram que o *turnover* viral em um indivíduo infectado é extremamente alto, chegando a 10^8 partículas virais por dia (Haase 1999). Como a meia vida das células infectadas é curta (entre um a dois dias), a manutenção deste estado requer a rápida infecção de novas células pelo HIV-1 (Ho et al. 1995; Perelson et al. 1996). Tem-se demonstrado que a enzima transcriptase reversa (TR) produz, em média, durante cada ciclo viral, um erro por genoma. O resultado do alto *turnover* viral é que, em cada indivíduo infectado, forma-se um grande *pool* de mutantes logo após a infecção (Clavel et al. 2004; Roberts et al. 1988). Um fator que leva à geração de variantes do HIV-1 distintas geneticamente é a recombinação viral, e como o vírus produz grande

número de variantes durante a replicação, torna-se capaz de uma adaptação rápida às mudanças diante da pressão seletiva dos medicamentos (Clavel & Hance 2004).

A seleção de variantes do vírus HIV-1 resistentes às drogas decorre da diversidade genética do vírus que é mantida pela alta taxa de erro da enzima TR. Isso se deve ao fato de o vírus não possuir mecanismo de correção durante a multiplicação viral (Cornelissen et al. 1996; Diaz et al. 1995).

Nos países desenvolvidos, um em cada dez pacientes já necessita de terapia de resgate devido ao uso do HAART e um em 50 é resistente a todas as 17 drogas anti-HIV aprovadas pelo FDA (Kenyon 2001).

Nos Estados Unidos (EUA), de uma amostra de 132.500 pacientes, 63% apresentaram viremia > 500 cópias/ml nos 3 primeiros anos de uso de HAART. Dentre estes, 76% apresentaram resistência a uma ou mais drogas anti-retrovirais (ARsV) (Richman et al. 2004). A transmissão de cepas virais do HIV em pessoas recentemente infectadas passou de 3,8% em 1996 para 14% em 2000 (Little et al. 2002).

Em 50 pacientes tratados com ARVs em Uganda, houve prevalência de 52% na emergência de resistência às drogas ARVs. Em 17 dos 27 pacientes com HIV resistentes, foram encontradas três ou mais mutações relacionadas ao gene da enzima TR. De menor prevalência foram as mutações relacionadas ao gene da enzima protease (PR); apenas 17 dos 50 pacientes estavam em uso de IP (Richard et al. 2004).

Em São Paulo, foram avaliados 791 pacientes, os quais, ao serem submetidos a exames de genotipagem do HIV, apresentaram falha à terapia

HAART. Os resultados evidenciaram que 96,6%, apresentavam resistência relacionada ao gene da enzima TR, 90,3% ao PR e 99,4% a ambos (Sucupira et al. 2001).

A resistência aos ARVs também ocorre em pacientes que não fizeram uso prévio de tratamento (resistência primária). Em 19 países europeus, num estudo realizado entre 1996 e 2000 com 2208 pacientes sem uso prévio de ARVs (“ARVs-*naive*”), um em cada 10 apresentava vírus com uma ou mais mutações relacionadas às drogas ARVs. Pacientes infectados recentemente apresentam variantes resistentes mais freqüentes que os cronicamente infectados (13,5% vs 8,7%; $p=0,06$) (Wensing et al. 2005). Num estudo de resistência em 50 pacientes “ARVs-*naive*” na Índia, onde todos apresentavam o subtipo C, os pacientes tinham pelo menos uma mutação na PR e/ou RT. Em 20%, foram encontradas mutações primárias de resistência aos IPs, sendo que em 6% tratavam-se de mutações para os NTRIs e em 14% para os NNRTIs (Balakrishnan et al. 2005). Em países do Leste Europeu, de 278 pacientes *naive* no uso de ARVs, houve prevalência de 12,9% de resistência aos NRTIs e 3,9% aos IPs (Vazquez de Parga et al. 2005).

Na Espanha, foram avaliados 150 pacientes sem uso prévio de ARVs: 13,3% em 1993 e 12% em 1997 apresentaram mutações de resistência primária aos NRTIs. A avaliação de outros 150 pacientes com experiência prévia de uso de ARV mostrou que 96% deles apresentavam mutações de resistência (Gomez-Cano et al. 1998).

O Brasil, quando comparado a países desenvolvidos, apresenta baixa taxa de resistência primária do HIV-1 (Soares et al. 2004). Em alguns estudos regionais de transmissão do HIV-1 com resistência primária, a taxa de prevalência registrada no período 1996-1998 ficou entre 0-1%, tendo aumentado para menos do que 7% entre 2000-2002 (Brindeiro et al. 1999; Dumans et al. 2004; Pires et al. 2004). Na cidade de São Paulo, num estudo em que foram avaliados 100 doadores de sangue que tiveram a detecção de positividade do HIV-1 pelo Banco de Sangue-Fundação Pró-Sangue de São Paulo, observou-se resistência na TR em 12% e 1% de mutações para o gene da protease (PR) (Barreto et al. 2005).

Para detectar a ocorrência de resistência genotípica em pacientes em uso de terapia anti-retroviral (ARV) e possibilitar a reorientação do tratamento e seleção da terapia de resgate, o Programa Nacional de DST e AIDS do Ministério da Saúde do Brasil implantou uma rede de laboratórios, Rede Nacional de Genotipagem – Renageno, que executa o exame de genotipagem do HIV em nível nacional. O Brasil foi o primeiro país a ter um programa desse porte com o objetivo de estimar, nas diferentes áreas geográficas, os sub-tipos circulantes, a prevalência de mutações e sua associação com o estadiamento clínico da doença (Renageno, 2006).

A Renageno foi instituída em 1999 e seu funcionamento operacional teve início no segundo semestre de 2001. Atualmente, é composta de 18 laboratórios executores. Além dos laboratórios, médicos de referência em genotipagem integram a rede. Esses profissionais orientam o corpo médico dos serviços na indicação, utilização e interpretação dos testes de

genotipagem para a seleção de esquemas ARVs de resgate terapêutico (Renageno, 2006).

1.3 A interrupção da terapia

Na prática, os regimes de tratamento com as drogas ARVs disponíveis são limitados pela potência, complexidade, adesão, toxicidade, potencial de desenvolvimento de resistência e custo. Adesão e tolerabilidade à terapêutica aparecem como fatores que comprometem diretamente a qualidade de vida dos pacientes, sendo apontados como causa da não adesão ao tratamento (Catz et al. 2000).

Efeitos adversos relacionados aos ARVs podem resultar em interrupção permanente das drogas, como acontece com a litíase renal recorrente associada ao indinavir (John et al. 1997), a neuropatia periférica relacionada a alguns análogos nucleosídeos e a pancreatite — chegando em certos casos ao óbito — derivada do uso da didanosina (Brinkman et al. 1999). Outras complicações observadas são os problemas cardiovasculares, a osteonecrose, a acidose láctica e as síndromes de toxicidade mitocondrial e de distribuição gordurosa (Brinkman et al. 1999; Carr et al. 2000).

Para a supressão viral, a adesão ao tratamento é fator fundamental. Num estudo que fez uso de monitoramento eletrônico de adesão a terapia, que empregava IPs, registrou-se falha virológica (carga viral >400 cópias/mL) em 22% dos pacientes com mais de 95% de adesão. Para os pacientes com adesão entre 80 e 95%, houve falha em 61%, e para aqueles com adesão inferior a 80% a falha chegou a 80% (Paterson et al. 2000). A dificuldade de

comprometimento com a terapia ao longo dos anos ficou evidenciada por um estudo que mostrou o declínio da adesão ao longo do tempo. No primeiro mês, 70% dos pacientes apresentaram adesão de 100%. No quarto mês, o índice caiu para 63% e no oitavo, para 58% (Bangsberg et al. 2003).

A não adesão à terapia está associada à incompleta supressão viral (Bangsberg et al. 2006; Paterson et al. 2000) e à progressão para doença (Bangsberg et al. 2001) sendo fator de risco para o desenvolvimento de resistência às drogas (Friedland et al. 1999; Wainberg et al. 1998). Em estudo prospectivo de contagem não anunciada dos medicamentos, 23% das mutações de resistência às drogas ocorreram em indivíduos com adesão entre 92-100% e mais de 50% da resistência a todas as drogas ocorreu em 40% dos mais aderentes (79-100% de adesão). Esse resultado se deve ao aumento da adesão entre os pacientes com falência de supressão viral (Bangsberg et al. 2003).

Para manter durável a resposta virológica ao tratamento faz-se necessário o emprego da terapia ARV com intuito de suprimir a replicação viral a valores abaixo de 50 cópias/ml em testes padronizados (Montaner et al. 1998). Caso ocorra multiplicação do HIV-1 na presença dos medicamentos, estes, com a eficácia perdida, passam a permitir o surgimento de mutações associadas a resistência ou a evolução das previamente existentes (Condra et al. 1995; Molla et al. 1996). Havendo resistência a um medicamento, existe risco de redução da potência de outros medicamentos da mesma classe ainda não utilizados. A resistência cruzada aumenta progressivamente. Num primeiro momento, a presença de

mutações iniciais específicas para um dado ARV pode não resultar em resistência cruzada ou pode estar associada a apenas um dos medicamentos de um regime terapêutico (Havir et al. 2000). Conforme o HIV-1 se multiplica na presença de determinada droga, pode ocorrer o desenvolvimento de resistência cruzada a outros medicamentos da mesma classe.

As diretrizes que recomendam o uso da terapia anti-retroviral (ARV) enfatizam a importância da supressão viral. As normas brasileiras seguem as correntes americana (Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos EUA -DHHS e Seção Americana da Sociedade Internacional de AIDS - IAS-USA) e europeia (Associação Britânica do HIV). Durante alguns anos, refletindo o entusiasmo pela introdução dos ARVs inibidores de protease na era da HAART, os consensos terapêuticos recomendavam o início precoce da terapia ARV. O tratamento já era indicado para pacientes com contagem de células CD4 <500 células/mm³ ou pequena elevação da carga viral. A partir de 2001, isso mudou. As diretrizes do DHHS passaram a recomendar o início da terapia quando o valor da contagem de células fosse CD4 <350 células/mm³; e em 2003 para CD4 ≤ 200 células/mm³ (Tarwater et al. 2003). Por sua vez, as diretrizes britânicas, passaram a recomendar, a partir de 2001, o início do tratamento no caso de contagem de células CD4 entre 200 e 350 células/mm³. Um grande estudo, que comparou o início da terapêutica ARV em pacientes com contagem inicial de células CD4 de 200 a 349 células/mm³ e outro grupo com células CD4 ≥ 350 células/mm³, mostrou que a resposta virológica após início da terapia foi similar nos dois grupos

(Lederman et al. 2000; Staszewski et al. 1999). Tal modificação nos consensos terapêuticos foi conseqüência da relutância demonstrada por médicos e pacientes em dar início precoce a uma terapia que acarreta efeitos colaterais, toxicidade e resistência a longo prazo (Tarwater et al. 2003).

Como resultado das modificações, atualmente existem vários pacientes que iniciaram a terapia no passado, mas que hoje estariam fora dos critérios atuais de início. Mesmo sem dados concretos de literatura que fundamentem a prática da interrupção da terapia nessas circunstâncias, alguns médicos passaram a optar pela descontinuidade da terapêutica em pacientes com bons parâmetros clínicos e laboratoriais e com ou sem alterações relacionadas a efeitos adversos e toxicidade das drogas. Nas Recomendações para Terapia Anti-Retroviral em Adultos e Adolescentes do Ministério da Saúde-2004, com base na contagem de células CD4 com que foi iniciada a terapia dupla, é aventada a possibilidade de suspensão terapêutica para os pacientes que estejam com bons parâmetros laboratoriais (Recomendações para Terapia Anti-retroviral em adultos e adolescentes infectados pelo HIV. Brasília: Ministério da Saúde, 2004).

A necessidade de estratégias para driblar as problemáticas dos efeitos não desejados do tratamento, bem como as inconveniências do uso de regimes terapêuticos que associam diferentes medicamentos, justificam as investigações do tratamento intermitente. Até poucos anos atrás, não havia um termo médico para a interrupção da terapia ARV. Os pacientes que a interrompem por vontade própria são chamados de “não aderentes”. Devido

à toxicidade relacionada aos ARVs, ocasionalmente tal interrupção também ocorre por recomendação médica (Gallant 2002). O termo “interrupção estruturada do tratamento” (IET) surgiu para definir a terminologia que envolve a busca de estratégias de descontinuação terapêutica da terapia. Vários são os estudos que abordam essa forma de conduzir o tratamento. A interrupção da terapia se coloca em distintos cenários: tratamento da infecção aguda, para pacientes tratados cronicamente que estejam com viremia controlada, e da infecção crônica tratada sem viremia controlada.

Nos pacientes com infecção aguda em tratamento, a IET poderia aumentar ou preservar a resposta imune celular, possibilitando a supressão viral na ausência da terapia (Walker 2002).

A IET, também designada auto-imunização, baseia-se na exposição periódica do sistema imune a baixas viremias, o que estimularia uma resposta imune celular específica. Essa é a resposta que aparece nos pacientes progressores lentos da doença e a que se perde na maioria dos pacientes cronicamente infectados (Kalams et al. 1999). A resposta imune específica, estimulada pela terapia intermitente, possibilitaria o controle do HIV-1 pelo sistema imune sem a necessidade de terapêutica contínua com as drogas ARVs. Foi o que sucedeu com o conhecido *Berlin patient*, o qual iniciou a terapia ARV logo após a infecção, antes da soroconversão, e mostrou-se capaz de manter resposta de células CD4 específica e citotóxica T-linfocítica com carga viral indetectável, sem a terapia ARV, após várias interrupções não planejadas do tratamento (Liszewicz et al. 1999). No estudo de Walker (2002) em que os pacientes iniciaram a terapia antes da

soroconversão pelo *Western blot*, dentre os 14 pacientes, 8 mantiveram carga viral <5000 cópias/ml após pelo menos uma IET. Esses resultados não foram confirmados por outros pesquisadores, possivelmente porque o tratamento não foi iniciado tão cedo como no grupo de Walker (Miro et al. 2002; Neumann et al. 1999).

No caso de pacientes com infecção crônica, o estudo “The Swiss and Spanish Intermittent Treatment Trial” avaliou 133 indivíduos cronicamente infectados que haviam obtido sucesso terapêutico. Ficou demonstrado que com a interrupção da terapia houve uma melhora da resposta do HIV-1 CD8 específica, não sendo observada correlação com a resposta virológica. Após um ano de terapia intermitente (8 semanas com terapia / 2 semanas sem terapia), poucos pacientes apresentaram baixas viremias durante a interrupção e somente 6% se mantiveram sem terapêutica até a semana 96, o que levou ao término do protocolo (Hirshel et al. 2002).

Em outro estudo com 20 pacientes em HAART, que haviam feito uso prévio de esquema duplo com NRTIs e que se submeteram à IET com base no CD4, foi realizado teste de resistência quando da mudança para o esquema HAART e quando da interrupção do tratamento. Após a IET, observou-se a presença da mutação maior T215Y em um paciente. Em outros 4 indivíduos, que apresentavam mutações para NNRTIs antes da IET, houve o desaparecimento das mesmas. As mutações para IPs eram menores e já estavam presentes na maioria dos casos antes da adoção da IET, não tendo havido aumento das mesmas em virtude da interrupção da terapia. Em 48 semanas, não foram observados casos de falência virológica.

Esta só veio a ocorrer após 108 semanas com dois pacientes; um deles em IET, o outro em uso contínuo. Na análise univariada, não se encontraram fatores que predispuessem ao desenvolvimento de mutações para o HIV (Nuesch et al. 2005).

Devido a falência virológica, um amplo estudo clínico que empregava o uso de ARVs uma semana com /uma semana sem teve de ser descontinuado (Ananworanich et al. 2003).

A interrupção da terapia também foi investigada em pacientes com experiência terapêutica e ampla resistência às drogas, visando permitir a re-emergência de cepas virais selvagens e aumentar a resposta terapêutica durante o tratamento de resgate. Ficou claramente demonstrado que a descontinuação da terapia permite a repopulação viral por cepas selvagens em detrimento das resistentes. Deeks et al. (2001) demonstrou que em pacientes que interromperam a terapêutica, após um período com mediana de 6 semanas, ocorreu o aumento da carga viral e decréscimo da contagem de células CD4. Esse estudo registrou decréscimo da mediana de CD4 de 128 células/mm³ durante a 12^a semana de interrupção; 2 pacientes reiniciaram a terapia antes das 12 semanas e 3 tiveram eventos adversos possivelmente relacionados à interrupção.

No estudo randomizado GIGAHAART, em pacientes com doença avançada e falha terapêutica, após a interrupção de 8 semanas, houve necessidade de se reiniciar a terapia ARV (Peytavin et al 2002). Num estudo de Miller et al. (2000) a interrupção resultou em completa mudança para vírus selvagem em 28 dos 45 pacientes com resistência aos ARVs, tendo

haver associação com a melhora da resposta terapêutica após reinício da terapia.

Apesar do vírus resistente não ser detectado no plasma, Deeks et al. (2001) demonstrou sua presença em cultura de células mononucleares periféricas. O grupo de Finzi et al. (1999) evidenciou a replicação de clones de vírus resistentes que estavam quiescentes em células CD4. Os vírus resistentes reemergiram quando foi reassumida a pressão seletiva da terapia de resgate, o que resultou em curto benefício após a reintrodução do HAART. A maioria desses estudos foi realizada com pequeno número de pacientes, não controlados, e nem todos se mostraram benéficos, mantendo a estratégia controversa.

Poucos são os estudos com pacientes cuja replicação viral se achava suprimida e que interromperam a terapia. Um pequeno estudo mostrou que, mesmo após muitos anos de tratamento, a carga viral pode voltar a ter o mesmo valor de antes da época do início do tratamento (Hatano et al. 2000). Outro mostrou que, para pacientes com mediana de CD4=554 células/mm³ na ocasião da IET, houve queda das células CD4 de 16 células/mm³ por mês após a interrupção (Tebas et al. 2002).

A IET com ciclos terapêuticos pré-determinados o estudo de Mocroft et al. (2001) mostrou a possibilidade de redução da exposição às drogas, não apenas melhorando a resposta imune específica, como também, devido à diminuição do tempo acumulado de tratamento, diminuição de custos e da possível toxicidade (Tarwater et al. 2003).

Ainda não se conhecem as conseqüências clínico-laboratoriais de longo prazo das diferentes formas de IET. A possibilidade de resistência aos ARVs com a IET já foi evidenciada. Em estudo no qual 24 pacientes submeteram-se à IET e reassumiram a terapia após mediana de 20 semanas, a falência com a subsequente combinação terapêutica foi associada à emergência de população viral com mutações de resistência idênticas às presentes antes da interrupção da terapia (Deeks et al. 2003).

Pacientes com máxima supressão virológica foram tratados 7 dias com / 7 dias sem terapia. Como o aumento da carga viral leva mais de 7 dias para ocorrer, esse escalonamento buscava minimizar a emergência de variantes resistentes virais durante a interrupção e reinício das fases. Foram observados alguns *blips* (aumento momentâneo da carga viral) durante os períodos sem terapia (Dybul et al. 2002). Outros estudos com o mesmo período de tempo de uso e interrupção de ARVs (Ananworanich et al 2003a), e outros com ciclos maiores de interrupção (Ananworanich et al. 2003b; Dybul et al. 2003; Vella et al. 2003), confirmaram que essa estratégia pode ocasionar o acúmulo de mutações relacionadas à resistência do HIV-1. Em estudo de ciclos longos, 2 meses com /1 mês sem terapia (Fauci 2001), foi observada resistência à lamivudina (3TC) e aos NRTIs, que são drogas de meia-vida longa e baixa barreira genética para resistência.

O risco potencial de qualquer terapia intermitente é a resistência viral, que pode surgir tanto na descontinuação, quanto na fase de reinício do tratamento, quando os níveis das drogas são subterapêuticos. Durante a interrupção terapêutica, observou-se aumento da capacidade replicativa

viral, quando comparada à das cepas selvagens (Deeks et al. 2001; Zhang et al. 1999). Em estudos envolvendo pacientes com falha virológicas as interrupções subseqüentes da terapia mostraram rápida elevação da carga viral, com acentuada queda na contagem das células CD4, a qual, após o início de um novo regime, pode levar meses para elevar-se novamente. Durante a interrupção da terapia, existe também a possibilidade serem observados sintomas compatíveis com a síndrome retroviral aguda, similar ao quadro que ocorre na soroconversão (Colven et al. 2000; Daar et al. 1998; Kilby et al. 2000).

Outra forma de interrupção terapêutica (IT) é a que toma a contagem das células CD4 como parâmetro para a descontinuação e reintrodução da terapia. Essa modalidade passou a ser conhecida como interrupção terapêutica guiada pela contagem de células CD4, já que a terapia é suspensa quando determinado valor de células CD4 é atingido, sendo reiniciada somente quando a queda das mesmas alcança outro patamar previamente estabelecido (Ananworanich et al. 2006; El-Sadr et al. 2006). Isso significa que a IT não obedece a um período de tempo de pré-definido; sua duração depende do tempo necessário para haver queda das células CD4. Alguns estudos importantes procuraram avaliar a eficácia dessa nova forma de tratamento, porém seus resultados são controversos, uma vez que variam de acordo com o número de pacientes investigados e com a realidade social do local onde foram realizados (Ananworanich et al. 2006; Danel et al. 2006; El-Sadr et al. 2006).

1.4 Identificação das Mutações de Resistência do HIV-1 aos anti-retrovirais

A presença de mutações que reduzem a suscetibilidade do vírus às drogas, quando comparado ao vírus selvagem, define a resistência do HIV aos ARVs (Shafer 2002). Essas mutações podem ser identificadas das seguintes formas:

- *In vitro*: isolados virais são cultivados em presença de diferentes concentrações de um dado composto anti-viral. Os isolados que crescem sob essas condições são seqüenciados, permitindo a identificação das mudanças genéticas selecionadas pela droga. Para comprovar se a mutação realmente está associada à resistência, emprega-se a técnica de mutagênese reversa. Essa metodologia laboratorial reverte as mutações para o aminoácido do vírus selvagem; caso o vírus volte a ficar sensível, fica confirmada a importância da mutação (Shafer 2002).
- Isolados virais provenientes de pacientes em falência terapêutica são seqüenciados e fenotipados. As mutações encontradas são então comparadas com o padrão fenotípico.
- Amostras de pacientes cujo tratamento é conhecido são seqüenciadas e a frequência das mutações é então comparada com a frequência encontrada em amostras de pacientes sem tratamento prévio.
- Outra forma é correlacionar a(s) mutação(ões) encontradas e a resposta virológica a um novo regime de tratamento (Shafer 2002).

A nomenclatura das mutações é baseada numa seqüência padrão. Devido à presença de poucas inserções e deleções nos genes que codificam as enzimas TR e PR foi possível definir um consenso com base nas seqüências do subtipo B do HIV Sequence Database, do Laboratório Nacional de Los Alamos (Shafer 2002). Para indicar a mutação, usa-se em primeiro lugar o aminoácido do consenso, seguido do número (*locus gene*) e da letra que indica a mutação (exemplo: T215Y). Havendo a mistura de mais de um aminoácido na posição, o composto da mistura é incluído após a posição, com freqüência separado por uma barra (exemplo: K103K/N denota que a seqüência possui uma mistura do tipo de vírus selvagem no resíduo lisina K e a mutação no resíduo asparaginina (N) na posição 103) (Shafer 2002). A mutação é definida como primária ou principal quando se mostra capaz de reduzir a suscetibilidade a determinada(s) droga(s) por conta própria. O termo mutação secundária ou acessória indica que a mutação reduz a suscetibilidade à droga quando em combinação com a primária ou que aumenta o *fitness* de isolados com a mutação primária. Algumas mutações podem ser primárias em relação a determinada droga e secundárias em relação a outras. Além disso, as mutações secundárias comumente surgem antes das primárias (Shafer 2002).

1.5 Como surgem as mutações

O alto índice de replicação do vírus faz com que uma pessoa cronicamente infectada e sem tratamento produza e elimine 10 bilhões de

vírus diariamente. Está demonstrado que, em média, a enzima TR produz um erro por genoma a cada replicação durante cada ciclo viral. Essa característica importante da alta taxa de mutação viral, cerca de 4×10^3 , decorre da incapacidade do vírus em realizar as correções nas seqüências de nucleotídeos da enzima TR durante a replicação. O acúmulo de inúmeras variantes genéticas (*quasispecies*) no indivíduo nos meses que se seguem à infecção pelo HIV estabelece a diversidade genética viral (Diaz et al. 1995; Mansky 1998).

Em geral, mutações que emergem diariamente não se fixam, ou seja, fazem parte de cepas minoritárias. As cepas resistentes competem com 10 bilhões de vírus liberados diariamente e para que se fixem e tornem-se população majoritária é necessário a pressão dos ARVs. Com o uso dos ARVs, haverá seleção das cepas resistentes em virtude da ação das drogas sobre as cepas sensíveis (Miller 2001).

1.5.1 Resistência aos anti-retrovirais IPs

A enzima PR do HIV-1 tem a forma de dímero, com a função de aderir a sítios específicos de uma grande poliproteína, precursora de enzimas necessárias à formação de partículas virais, no período que antecede o encapsulamento do vírus. Por meio de clivagem, ela libera as proteínas estruturais (Clavel & Hance 2004). Na ausência de proteases funcionais, partículas virais são produzidas, mas como são imaturas, não infectam (Clavel & Hance 2004). O desenho de drogas inibidoras dessa enzima é específico em sua estrutura química e mimetiza os peptídeos virais que

normalmente são reconhecidos e clivados pela PR. Isso só se tornou possível graças ao conhecimento da estrutura da PR e de seu substrato natural (Erickson et al. 1994; Roberts et al. 1990). De forma competitiva, a conformação dos IPs permite a ocupação do sítio ativo da PR. Através desses compostos, que possuem forte afinidade pelo sítio ativo da PR, ocorre a inibição da atividade catalítica da enzima de maneira altamente seletiva (Clavel & Hance 2004).

O excesso de IPs dentro da célula leva à inibição da replicação do vírus, quando comparada à quantidade do substrato natural do HIV-1. Mesmo sob a ação dos IPs, mantém-se o processo de encapsulamento e liberação viral das células por mais um ciclo. Por possuírem proteínas imaturas em seu interior, as partículas virais que tiveram interferência dos IPs perdem a capacidade de infecção; dessa forma, o ciclo de vida do HIV-1 é interrompido.

A resistência aos IPs é consequência da substituição de aminoácidos que emergem no sítio de ligação do substrato da enzima ou em sítios distantes (Condra et al. 1995; Kaplan et al. 1994; Molla et al. 1996). Direta ou indiretamente, as mudanças nesses aminoácidos modificarão o número e a natureza de pontos de contato entre o inibidor e a protease, reduzindo assim a afinidade pela enzima (Chen et al. 1995). Exemplo: a mutação V82A reduz o tamanho de um resíduo de aminoácido na PR, que é mais importante para a ligação da maioria dos inibidores do que para a ligação do substrato natural (proteína).

Algumas mutações são selecionadas somente para determinado IP, como a D30N para o nelfinavir (NFV). Isso se dá graças a particularidades na estrutura química dos IPs, que influenciam sua interação com o domínio de ligação do substrato da enzima. Porém, a maioria das mutações acaba por gerar resistência a outros IPs, o que leva à resistência cruzada (Hertogs et al. 2000; Schapiro et al. 1999). A resistência aos IPs pode ser promovida pelas mutações em alguns dos substratos naturais da protease (Doyon et al. 1996; Mammano et al. 1998; Zhang et al. 1997). A característica da substituição de aminoácido próximo ao sítio de clivagem da poliproteína Gag tem sido identificada como causa de aumento do grau de resistência e capacidade replicativa do vírus. Assim, fica facilitada a clivagem em condições que se somam: atividade sub-ótima da enzima ou aumento da habilidade da PR em conter mutações de resistência para interagir com o substrato (Clavel & Hance 2004).

De modo geral, a resistência aos IPs se desenvolve gradualmente, pelo acúmulo de múltiplas mutações primárias e secundárias. A maioria das mutações primárias causa, por conta própria, redução de 2 a 5 vezes na suscetibilidade a um ou mais IP. Entretanto, esse grau de resistência com frequência é insuficiente para interferir na atividade anti-viral dessas drogas. O alto grau de resistência resulta do acúmulo adicional de mutações primárias e secundárias, que é necessário para a redução da suscetibilidade à droga na prática clínica. E é essa necessidade de múltiplas mutações para interferir na atividade dos IPs que é chamada de “barreira genética de

resistência as drogas” (Condra et al. 1996; Kempf et al. 2001; Molla et al. 1996).

Várias análises de seqüências de isolados de vírus resistentes a drogas demonstram que mutações em vários sítios de clivagem da protease são selecionadas durante o tratamento com IPs (Doyon et al. 1996; Kaufmann et al. 2001; Mammano et al. 1998).

1.5.2 Resistência aos anti-retrovirais NRTIs

A estrutura dos NRTIs é muito semelhante à dos nucleosídeos verdadeiros: adenosina (a), guanosina (g), citosina (c) e timidina (t). A base do núcleo genético que codifica os aminoácidos é formada pelos nucleosídeos, que por sua vez representam a base para a formação das estruturas protéicas. No processo de transcrição reversa, os NRTIs substituem de forma competitiva os nucleosídeos verdadeiros. São análogos à timidina o AZT e Estavudina (D4T), à citosina o 3TC e o Zalcitabina (DDC), à adenosina o Didanosina (DDI) e o Tenofovir (TDF), à guanosina o Abacavir (ABC). Durante a polimerização do vírus, em vez de usar um nucleotídeo verdadeiro, a TR passa a incorporar um falso nucleotídeo, que impede a continuidade da síntese da cadeia de DNA, interrompendo o ciclo replicativo do HIV-1 (Shafer 2002).

Os inibidores da TR análogos aos nucleosídeos são drogas que, para estarem ativas, necessitam ser trifosforiladas, ou seja, têm de incorporar três moléculas de fósforo. Por sua vez, os análogos nucleotídeos já se

apresentam pré-fosforilados, necessitando de uma etapa a menos para serem ativados (Shafer 2002).

Dois mecanismos bioquímicos distintos estão envolvidos na resistência a essas drogas: prejuízo da incorporação do análogo no DNA e remoção do análogo da cadeia terminal do DNA recém-formado (Shafer 2002):

1-Prejuízo da incorporação do análogo no DNA

Esse primeiro é mediado por mutações que permitem que a enzima RT discrimine entre o NRTI e o substrato natural durante a síntese da cadeia de DNA, levando à incorporação deste último, o que permite a adição e crescimento da cadeia de DNA (Huang et al. 1998; Larder et al. 1999; Sarafianos et al. 1999b).

Várias mutações ou grupos de mutações na TR podem promover resistência por seleção e prejuízo da habilidade da TR em incorporar um análogo no DNA. Estão incluídas nesse grupo: as mutações M184V e K65R e o complexo Q151M.

A mutação M184V envolve a troca da metionina pela valina na posição 184 da TR, sendo essa a principal mutação que confere resistência à lamivudina (Boucher et al. 1993) e ao DDC. A metionina 184 está localizada no centro do sítio catalítico da TR, é trocada pela valina, que tem uma cadeia diferente, e passa a interferir na posição da lamivudina trifosfato com o sítio catalítico (Sarafianos et al. 1999a). A valina na posição 184 da TR altera o posicionamento tridimensional da enzima, levando a um mau posicionamento do 3TC e à redução na sua incorporação, o que gera alto grau de resistência a essa droga. Quando o 3TC é usado como

monoterapia, cepas resistentes tomam o lugar do vírus selvagem em poucas semanas, (Schuurman et al. 1995) e quando o 3TC é usado como parte de um regime terapêutico que está falho, essa é a primeira mutação a surgir (Descamps et al. 2000; Havlir et al. 2000).

O grupo de mutações do complexo Q151M (Iversen et al. 1996) é selecionado no curso de esquemas terapêuticos que contenham D4T e DDI. Essa via sempre se inicia com a substituição Q151M, um resíduo localizado próximo ao sítio de ligação do nucleotídeo da TR, e é seguida pelo acúmulo gradual de mutações secundárias, as quais aumentam a resistência e a atividade da enzima (Kosalaraksa et al. 1999). O complexo Q151M é relativamente raro no HIV-1 (menos que 5% dos HIV-1 resistentes aos análogos nucleosídeos) mas pode conferir alta resistência à maioria — ainda que não a todos (exemplos: 3TC e TDF) — os análogos (Iversen et al. 1996). Esse grupo ocorre com maior frequência no HIV-2 do que no HIV-1.

A mutação K65R é observada em pacientes com falha aos nucleosídeos ou nucleotídeos, especialmente quando o regime inclui TDF ou ABC. Essa mutação parece conferir resistência à maioria dos análogos, com exceção do AZT.

2-Remoção do análogo nucleosídeo da cadeia terminal do DNA recém-formada.

O segundo mecanismo é mediado pela excisão de mutações do nucleotídeo que aumentam a taxa de remoção hidrolítica do terminal da cadeia NRTI e permitem a continuidade da síntese de DNA (Kemp et al. 1998; Kempf et al. 2001; Meyer et al. 1999). A remoção do análogo

nucleosídeo da cadeia terminal do DNA está associada a um grupo de mutações denominado “mutações aos análogos da timidina”. Tais mutações são freqüentemente selecionadas após a falência de combinações a drogas que incluem análogos da timidina, como AZT e D4T. Porém, promovem resistência à maioria dos análogos nucleosídeos e nucleotídeos, inclusive o TDF (Coakley et al. 2000; Larder et al. 1989; Picard et al. 2001; Shafer et al. 1996). O aparecimento dessas mutações é gradual e a ordem em que elas surgem pode variar (Boucher et al. 1992; Richman 1990). As mutações aos análogos da timidina promovem resistência por favorecer a remoção de ATP ou pirofosfato do nucleosídeo análogo da cadeia terminal 3 do DNA integrado (Arion et al. 1998; Meyer et al. 1999) ATP e pirofosfato, que são abundantes em linfócitos normais, não participam da reação de polimerização do DNA, mas a estrutura da TR, ao expressar as mutações aos análogos da timidina, facilita sua entrada no sítio adjacente a um análogo já incorporado (Boyer et al. 2001; Chamberlain et al. 2002). Nessa posição, ATP ou pirofosfato pode atingir a ligação fosfodiéster que liga o análogo ao DNA, resultando na remoção do análogo.

Por exemplo, o AZT que se encontraria no final da cadeia, impedindo a continuação da transcrição reversa, seria arrancado, possibilitando a incorporação da timidina. Uma pirofosfatase que retira o fósforo do AZT, fazendo a excisão do mesmo, catalisa esse processo de retirada. As mutações relacionadas à resistência ao AZT provavelmente aumentam a afinidade dessas pirofosfatases com a enzima mutante. A resistência cruzada entre o AZT e outros NRTIs ocorre em virtude de a capacidade

aumentada de excisão da enzima mutante não ser específica para o AZT. A eficácia desse processo pode ser diminuída pela presença de outras mutações da TR, um fenômeno descrito para a M184V (Larder et al. 1995).

A partir da pressão seletiva exercida por uma droga, o vírus pode apresentar mutações específicas, seguindo diferentes “vias mutacionais”. Algumas delas podem implicar resistência cruzada e outras não. Um exemplo é o AZT, em que uma das vias leva à seleção dos códons M41L e L210W e outras aos códons D67N e K219Q/E/M. O vírus tem aparentemente 50% de chance de se dirigir a qualquer uma dessas vias (Clotet et al. 2002; Gong et al. 2000).

1.5.3 Resistência aos anti-retrovirais NNRTIs

NNRTIs são pequenas moléculas que têm forte afinidade pelo sítio hidrofóbico, localizado próximo ao domínio catalítico da TR. A ligação dos inibidores afeta a flexibilidade da enzima, bloqueando a síntese do DNA (Esnouf et al. 1997). As mutações selecionadas após a falência do tratamento com NNRTI são todas localizadas no sítio de ligação desses compostos e reduzem a afinidade às drogas (Boyer et al. 1993; Esnouf et al. 1997; Hsiou et al. 2001; Richman et al. 1994). Uma única mutação no sítio de ligação pode resultar em alto grau de resistência a um ou mais NNRTIs. Como muitas mutações de resistência dos IPs e NRTIs, algumas mutações de resistência dos NNRTIs podem comprometer a replicação viral (Shafer 2002). Devido a pequenas diferenças de interação entre vários NNRTIs e o sítio hidrofóbico (Boyer et al. 1993), as mutações que emergem mais

freqüentemente são drogas-dependente. A resistência à nevirapina (NEV) está freqüentemente associada com a mutação Y181C, mas outras como Y188C, K103N, G190A e V106A também levam à resistência. De início, a resistência ao EFV é geralmente caracterizada pela mutação K103N, mas a Y188L também está associada (Clavel & Hance 2004).

1.6 Resistência cruzada:

A utilização de determinado ARV, pode levar à seleção de determinada mutação (ou várias) no gene pol do HIV-1. Com freqüência se observa resistência ao ARV que selecionou tal mutação (ou mutações). Porém, pode haver resistência cruzada, a qual levará à diminuição da suscetibilidade a um ARV da mesma classe ainda não foi utilizado. Um exemplo são as TAMs, 6 mutações associadas aos timidínicos, selecionadas na TR pelo AZT e/ou D4T: M41L, D67N, K70R, L210W, T215Y/F e K219Q/E/N (Shafer 2002). *In vitro*, tais mutações levam à diminuição, em grau variado, da suscetibilidade a todos os análogos nucleosídeos, com conseqüente potencial para resistência cruzada *in vivo* a essas drogas. As mutações selecionadas pelos não nucleosídeos também levam à resistência cruzada dentro da própria classe.

1.7 Fitness viral

A capacidade replicativa viral corresponde ao *fitness* viral. Na maioria dos casos, as cepas resistentes apresentam um *fitness* menor que as cepas selvagens. Por esse motivo, quando o uso das drogas é interrompido,

deixando de exercer pressão seletiva, as cepas selvagens, por terem maior vantagem replicativa, voltam a prevalecer no paciente em detrimento das resistentes (Miller 2001).

1.8 Os subtipos virais

Durante a propagação da disseminação do HIV-1 no homem, o grupo M (Main) responsável pela pandemia de HIV-1 deu origem a múltiplos subtipos, cujos nucleotídeos apresentam variação de 10-12% nos genes da protease e transcriptase reversa (Gonzales et al. 2001) e mais de 30% nos genes do envelope (Korber et al. 2000). As drogas ARVs aprovadas foram desenvolvidas com base no subtipo B, o mesmo acontecendo com os mecanismos genéticos de resistência estudados. O subtipo B predomina nos EUA e Leste Europeu.

No Brasil, o subtipo B responde por 85% das infecções pelo HIV-1.(Janini et al. 1996; Morgado et al. 1994; Sabino et al. 1996). Dentre as variantes não B, predomina o subtipo F, que é responsável por 15 a 20% das infecções (da Costa et al. 1995; Janini et al. 1996; Morgado et al. 1994; Sabino et al. 1996). Esse subtipo é encontrado na América do Sul (Marquina et al. 1996), Romênia e África Central (Hu et al. 1996). Foram também registradas as presenças do subtipo C, HIV-1 recombinantes B/F e B/C (Cornelissen et al. 1996; Sabino et al. 1994), potenciais mosaicos do B e F entre os genomas virais e infecção por 2 subtipos F e D, F e B, B e C (Janini et al. 1996).

1.9 Justificativa do estudo:

Os ARVs são drogas que inibem as enzimas virais essenciais à replicação. Quando a pessoa infectada recebe a terapia ARV, o vírus é destruído ou inibido. Entretanto, mutações espontâneas ocorrem no vírus e a terapia ARV representa uma forte pressão seletiva em favor da sobrevivência de variantes resistentes às drogas. Quando a população selvagem é reduzida em tamanho de forma significativa, variantes virais resistentes podem se multiplicar rapidamente, resultando numa população de mutantes resistentes às drogas (Mocroft et al. 1998a). Com a suspensão da terapia anti-retroviral, espera-se que volte a ocorrer o predomínio de cepas virais selvagens. Porém, algumas mutações, mesmo sem a pressão seletiva das drogas, persistem, e o padrão de resistência se mantém, não ocorrendo a repopulação viral com as cepas selvagens. Uma vez estabelecidas, as cepas resistentes conseguem se manter por alta capacidade de replicação e podem ser transmitidas.

Num estudo de adesão aos ARVs, realizado no Pronto Atendimento do Centro de Referência e Treinamento em DST/AIDS de São Paulo (CRT DST/AIDS) em abril de 2001, dos 498 pacientes entrevistados, 36 (8%) já haviam utilizado anti-retrovirais e estavam com o tratamento interrompido no momento da entrevista (Estevam et al. 2002). No âmbito do Projeto Diversidade Genética do HIV no Estado de São Paulo, foram entrevistados, em 2001, 170 pacientes do CRT; 14 (8,2%) deles também estavam sem usar ARVs, já tendo feito uso anteriormente¹. Faz-se necessário analisar o

¹ Jamal L. e Sabino E. C., 2001 comunicação pessoal.

impacto das variantes resistentes na população que está em IT e tomar conhecimento das causas que levaram à interrupção do tratamento.

Devido à falta de estudos clínicos controlados que avaliem a IT, não temos estabelecidos os critérios de tal prática, porém é fato que os pacientes, com ou sem orientação médica, estão interrompendo a terapia anti-retroviral. Muitos, atualmente, já usaram diversas combinações terapêuticas, sendo algumas vezes necessária a suspensão do tratamento em virtude dos efeitos colaterais, da toxicidade relacionada às drogas ou de outros motivos até então não completamente estabelecidos, como a reconstituição do sistema imune e até mesmo a opção do próprio paciente.

Até pouco tempo atrás, o horizonte de pesquisadores, clínicos e pacientes era que, uma vez iniciada, a terapia ARV acompanharia o paciente pelo resto da vida (Tarwater et al. 2003). Porém, a prática clínica levanta questionamentos quanto à possibilidade real do uso contínuo, ano após ano, década após década dos ARVs. O surgimento de toxicidade a longo prazo e o desenvolvimento da resistência do HIV-1, sem contar o alto custo das drogas representam obstáculos significativos ao tratamento ideal. Na prática clínica, não temos disponíveis medidas que impeçam o desenvolvimento de variantes resistentes do HIV-1. Assim, os objetivos deste projeto foram caracterizar a prevalência das mutações estáveis que persistem mesmo após a interrupção dos ARVs, determinar como as combinações terapêuticas empregadas desde o início do tratamento podem ter influenciado nisso e identificar os motivos que levaram à IET.

1.9.1 Objetivos gerais

Avaliar a prevalência de mutações de resistência do vírus HIV-1 em pacientes que, na data da coleta do exame para o estudo, achavam-se em interrupção terapêutica de ARVs há pelo menos 6 meses.

1.9.2 Objetivos específicos

Identificar variáveis clínicas, laboratoriais e epidemiológicas que poderiam estar associadas à presença de resistência nesses indivíduos.

Avaliar quais as razões para a interrupção da terapêutica.

2 - MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Casuística

O estudo descritivo incluiu 150 pacientes do Centro de Referência e Treinamento DST/AIDS de São Paulo (CRT DST/AIDS) e do Serviço de Extensão ao Atendimento de Pacientes com HIV/AIDS da Divisão de Clínicas de Moléstias Infecciosas e Parasitárias do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (Casa da AIDS), sendo cada uma dessas instituições responsável pelo acompanhamento de 4 a 5 mil pessoas². Para a participação no estudo, os pacientes deviam atender aos seguintes critérios: ter mais de 18 anos, já ter utilizado ARVs por pelo menos seis meses e estar, no momento da inclusão, sem usar ARVs por no mínimo seis meses. Não se estabeleceu um critério específico para o tempo máximo de utilização dos ARVs. Em ambas as instituições, os pacientes que preenchiam tais quesitos foram indicados pelos médicos dos Ambulatórios, os quais tomaram conhecimento do projeto por meio de uma apresentação realizada pela própria pesquisadora durante reunião com o corpo clínico (CRT DST/AIDS) ou individualmente com cada médico (Casa da AIDS).

Após consentimento livre e esclarecido (Anexo A) aplicou-se uma entrevista (Anexo B) para a coleta de dados sócio-demográficos (sendo que destes o único considerado para efeito de análise foi a escolaridade); dados epidemiológicos para a definição da categoria de transmissão do HIV-1: se

² Fonte: SICLOM: Sistema de Controle Logístico de Medicamentos do Ministério da Saúde – CRT DST/AIDS; Serviço de Agendamento da Casa da Aids.

contaminação sexual ou sanguínea; laboratoriais (exames anti-HIV realizados, para conhecimento do tempo de soropositividade da infecção pelo HIV-1) e clínicos (terapia ARV, tempo de tratamento, adesão aos ARVs). Durante a entrevista, perguntou-se aos participantes se haviam tido relação sexual desprotegida e se haviam tido mais do que 2 parceiros sexuais no ano anterior a realização da pesquisa. Para a análise do número de parceiros sexuais no ano anterior à realização da pesquisa, os participantes foram divididos em ≤ 1 parceiro ou ≥ 2 . Também perguntou-se a eles se haviam interrompido a terapia anteriormente após o início do tratamento com drogas ARVs.

Depois da entrevista, procedeu-se à consulta aos prontuários (Anexo C), a fim de complementar dados como: data do diagnóstico da infecção pelo HIV-1, confirmada pela sorologia; categoria de exposição para a infecção pelo HIV-1; avaliação do histórico em relação ao fato de o paciente ter ou não apresentado doença oportunista prévia relacionada a AIDS; esquemas terapêuticos para tratamento da infecção pelo HIV; datas de início e fim de cada esquema; valores dos resultados, desde o início do seguimento ambulatorial, dos exames de quantificação de carga viral pelos métodos de Nasba ou PCR e das células CD4 por exame de citometria de fluxo desde o início do seguimento ambulatorial. Para as análises foram considerados valores de CD4 maiores ou menores do que 200 células/mm³ e para carga viral foram considerados valores acima ou abaixo de 400 cópias/ml no períodos em que teve início a terapia ARV no período anterior à IT e durante a coleta do exame de genotipagem do estudo. O valor do nadir

de células CD4 foi resgatado dos exames dos prontuários dos pacientes e, para a análise, foram considerados 3 grupos: <50; >=51 até 200 e >=201 células/mm³. Quando havia discordância entre as informações obtidas durante a entrevista e os dados dos prontuários, prevaleciam estes últimos.

Também nos prontuários foram coletados os dados referentes às causas das interrupções terapêuticas, as quais foram classificadas em a) decisão médica e b) decisão do próprio paciente e categorizadas de acordo com os seguintes motivos:

- 1) baixa adesão - definida pelos critérios pessoais de cada médico

- 2) bons parâmetros clínicos laboratoriais (independente da contagem do CD4 no início da terapia) os quais foram agrupados na mesma categoria do item “fora dos critérios atuais de início da terapia”. A definição de “bons parâmetros clínicos laboratoriais” respeitou a decisão pessoal de cada médico assistente que, ao propor a IT, julgava que o valor de CD4, carga viral e parâmetros clínicos eram estáveis o suficiente para justificar sua adoção. A parcela de pacientes que iniciou o tratamento com ARVs em período anterior aos critérios atuais de início da terapia e que se encontravam estáveis na época da IT também foi critério de justificativa da IT.

- 3) efeitos adversos que compreendiam: dislipidemia, diabetes mellitus, acidose láctica, miopatia, diarreia, lipodistrofia, pancreatite, toxicidade hematológica, neuropatia, síndrome dispéptica.

- 4) gestação: quando o uso dos ARVs foi restrito ao período da gestação e depois suspenso.

5) múltiplas razões: mais de um dos motivos enumerados anteriormente.

Tais itens foram elaborados a partir das causas que cada médico mencionava no prontuário como justificativa da IT. Nos casos em que o paciente decidiu por conta própria interromper o tratamento, as razões por ele alegadas, conforme constava no prontuário, também foram classificadas de acordo com os itens acima. Quando tais razões não constavam do prontuário, considerou-se o relato feito pelo paciente durante a realização da entrevista. Os pacientes que se decidiram pela IT por conta própria, alegando motivos sociais, psicológicos ou etilismo, foram incluídos no item referente à baixa adesão.

Os tratamentos com ARVs compreendiam o uso de drogas fornecidas pelo programa estadual de DST/AIDS.

Foram coletados 10 ml de sangue em tubo com EDTA, independente do valor da carga viral.

A subtipagem do HIV-1 e a determinação da resistência, foram realizadas no laboratório de Biologia Molecular da Fundação Pró-Sangue/Hemocentro de São Paulo, por técnica de seqüenciamento através da extração do DNA de células (Barreto et al. 2006), tendo as seqüências sido analisadas no site Universidade de Stanford (Stanford University. HIV Drug Resistance Database, 2006). Foram consideradas resistentes as amostras com resultado parcial ou completo de resistência a pelo menos uma droga.

No mês de novembro de 2006, todas as seqüências foram submetidas a uma nova análise no site da Universidade de Stanford, a fim de que os resultados fossem padronizados em um único período.

O estudo foi aprovado pelas Comissões de Ética do CRT/DST AIDS de São Paulo e do Hospital das Clínicas da FMUSP – CAPEPesq 224/03.

2.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e genotipagem para o HIV-1

2.2.1 PCR para o HIV-1

O DNA do HIV-1 foi extraído a partir de 200 ul do componente celular do sangue após separação do plasma com o *kit* de extração QIAamp (Qiagen GmbH, Hilden, Alemanha), conforme protocolos do fabricante. Para a detecção do pró-vírus (DNA), foram amplificadas as regiões do gene da PR e parte da TR (700 pares de base).

Como controle interno foi amplificado o gene da beta-globina humana para verificação da integridade do DNA extraído. Para amplificação do gene da beta-globina, foram adicionados 2ul do DNA extraído a 50ul da solução de amplificação (descrita a seguir). A amplificação foi realizada em um termociclador Mastercycler Eppendorf (Hamburgo, Alemanha) da seguinte forma: um ciclo inicial de 94 °C por 1 minuto (min.), seguido de 35 ciclos de 94 °C por 20 segundos (seg.), 50 °C por 20 seg. e 72 °C por 30 seg., e extensão final de 72 °C por 7 min.

Solução de amplificação:

Água MilliQ	38,10 ul
Tampão da enzima 10X (s/ MgCL ₂) Invitrogen (Carlsbad–CA, EUA)	5,00 ul
dNTPs 2,5 mM Amersham Pharmacia biotech (Londres, UK)	2,00 ul
MgCL ₂ 50 mM Invitrogen	2,00 ul
Primer PCO3(GH20) (25 uM)	0,40 ul
Primer PCO4 (25uM)	0,40 ul
Taq polimerase (5U/uL) Invitrogen	0,30 ul
Amostra DNA	2,00 ul

Seqüência de primers Beta globina

PCO3 5' –gaa gag cca agg aca ggt ac- 3'

PCO4 5' –caa ctt cat cca cgt tca cc– 3'

Foi utilizada a técnica de PCR *nested* para amplificação dos genes da PR e TR.

Na primeira reação, foram utilizados como *primers* externos Kozal 1 e 2 (Kozal et al. 1996) e na segunda os *primers* DP10 e Frenkel 2 (Frenkel et al. 1995). Nas amostras não amplificadas inicialmente, foram utilizados *primers* externos Kozal 1 e 2 e *primers* internos DP16 e RT4.

A amplificação foi realizada em um termociclador Eppendorf Mastercycler (Hamburgo, Alemanha) da seguinte forma: um ciclo inicial de 94^o C por 1min., seguido de 35 ciclos de 94^o C por 45 seg., 55^o C por 45 seg. e 72^o C por 2 min., e extensão final de 72^o C por 10 min. na primeira amplificação. Foram adicionados 5 ul do DNA a 50 ul da solução de amplificação descrita a seguir:

Água MilliQ Depc	33,2 a 28,2 ul
Tampão 10X (1,5 mM MgCL ₂) Amersham Pharmacia biotech	4,5 ul
dNTPs 10 mM Amersham Pharmacia biotech	2,0 ul
MgCL ₂ 50 mM Invitrogen	1,0 ul
Primer F (5 pmoles/ul)	2,0 ul
Primer R (5 pmoles/ul)	2,0 ul
Taq polimerase (5U/uL) Invitrogen	0,3 ul
Amostra	5,00 a 10,00 ul

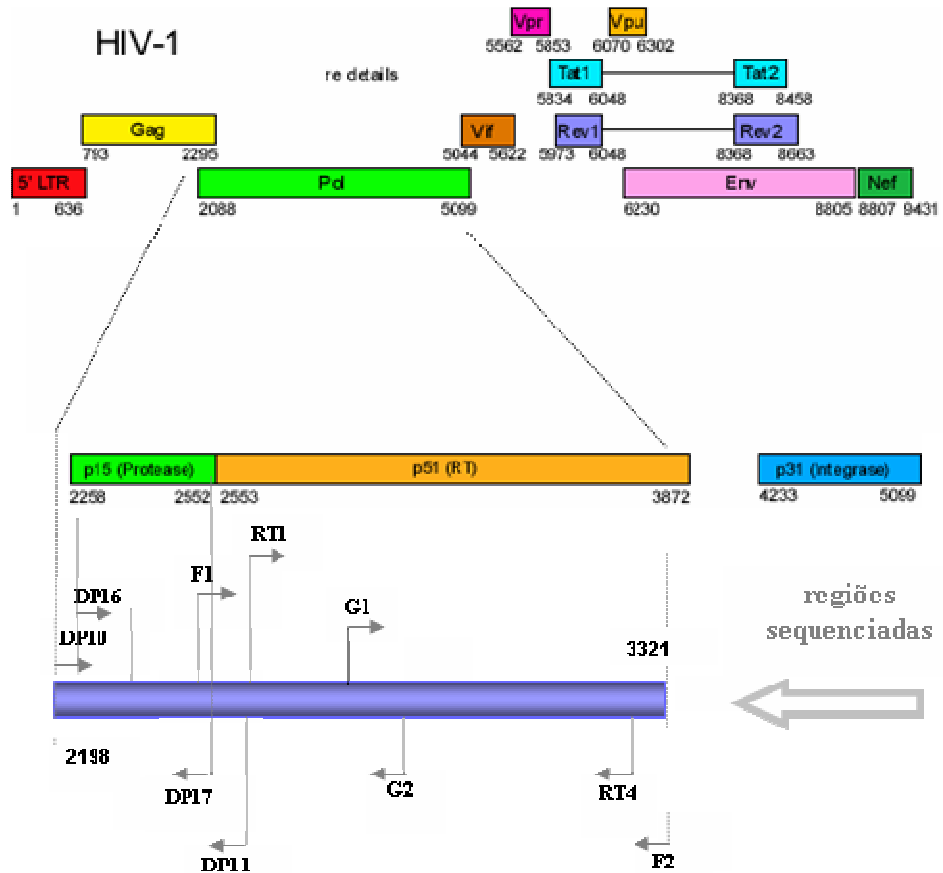
Seqüência de primers utilizados para amplificar a região da PR e RT

PCR 1

F-KOZAL 1 (outer)	5' - CAg AgC CAA CAg CCC CAC CA - 3'
R-KOZAL 2 (outer)	5' - TTT CCC CAC TAA CTT CTg TAT gTC ATT gAC A - 3'
F- DP 10 (inner)	5' - TAA CTC CCT CTC AgA AgC Agg AgC Cg - 3'
R- FRENKEL 2 (inner)	5' - gTA TgT CAT TgA CAg TCC AgC -3
F- DP 16 (inner)	5' - CCT CAA ATC ACT CTT Tgg CAA C - 3'
R- RT 4 (inner)	5' - AgT TCA TAA CCC ATC CAA Ag - 3'

Os produtos da amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% (ultrapura /Invitrogen) a 80 V em tampão TBE (ácido bórico 5,5%, Tris-Cl 10,8% e EDTA 0,9%) e visualizados sob luz ultravioleta após coloração com brometo de etídio.

Figura A. Mapa esquemático das regiões seqüenciadas dos genes *Pol* do HIV-1



Mapa genético extraído do site: <http://hiv-web.lanl.gov>

Os detalhes indicados pela seta grande corresponde às regiões seqüenciadas dos genes *Pol* (PR e RT) assinalados; onde: F1 e F2=Frenkel 1 e 2; G1 e G2=Gabo 1 e 2.

2.2.2 Reação de seqüenciamento

Os produtos da segunda amplificação, foram purificados com o *kit* PCR QIAamp, conforme protocolo do fabricante. O DNA foi quantificado utilizando-se o padrão Low DNA mass Ladder (Invitrogen).

Foram adicionados 15-45 ng de DNA à reação de seqüenciamento, seguindo o protocolo do *kit* ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (Applied Biosystems, Foster City, CA). A reação de seqüenciamento foi realizada em termociclador automático com 25 ciclos de 96 °C por 10 seg., 50° C por 5 seg. e 60°C por 4 min.

O produto da reação de seqüenciamento foi purificado com a adição de 80 ul de isopropanol 80% e, após agitação, mantido à temperatura ambiente por 15 min. O material foi centrifugado por 30 min. em microcentrífuga Eppendorf (12500g), sendo o precipitado lavado duas vezes com 100ul de etanol 70%. Foram adicionados ao precipitado seco 5 ul de formamida e 1 ul de tampão. Foram usados 2 ul da mistura para a eletroforese em seqüenciador automático (ABI 377 Sequencer; Applied Biosystems). Para cada produto de PCR foram realizadas 6 *primers*.

Tampão da reação de seqüenciamento:

Tampão (Kit ABI Prism)	4,0 ul
Primer (1,0 pmol/ul) ^b	1,0 ul
DNA purificado (15-45ng)	1,0 a 2,0 ul
Água MilliQ qsp	10,0 ul
Amostra primeira amplificação	1,0 a 3,0 ul

Primers para seqüenciamento

RT

FRENKEL 1	5' - gTT gAC TCA gAT Tgg TTg CAC – 3'
FRENKEL 2	5' - gTA TgT CAT TgA CAg TCC AgC –3'
Gabo 1	5' –CTC ARG ACT TYT GGG AAG TTC– 3'
Gabo 2	5' –GCA TCH CCC ACA TCY AGT ACT G–3'
RT 1	5' - CCA AAA gTT AAA CAA Tgg CCA TTg ACA Ga – 3'
RT 4	5' - AgT TCA TAA CCC ATC CAA Ag – 3'

Protease

DP 10	5' - TAA CTC CCT CTC AgA AgC Agg AgC Cg – 3'
DP 11	5' - CCA TTC CTg gCT TTA ATT TTA CTg gTA – 3'
DP 16	5' - CCT CAA ATC ACT CTT Tgg CAA C – 3'
DP 17	5' - AAA ATT TAA AgT gCA gCC AAT –3'

Os participantes que não obtiveram a amplificação do DNA do HIV-1 mesmo após o uso de *primers* alternativos, foram convocados por contato telefônico para a coleta de nova amostra de sangue e repetição do exame de genotipagem. Dos convocados, 13 mantiveram PCR não detectados e 7 na segunda vez em que o exame foi colhido tiveram a amostra amplificada.

2.3 Análise filogenética

As seqüências das amostras foram editadas utilizando-se o programa SEQUENCHER e analisadas através do site da Universidade de Stanford (Stanford University. HIV Drug Resistance Database, 2006).

A avaliação da freqüência das mutações foi possível pelo sistema de banco de dados DBCollHIV, ferramenta da bioinformática desenvolvida pelo

Departamento de Ciência da Computação da Universidade de São Paulo (Araujo et al. 2006). A frequência das mutações nos genes da TR e da PR do HIV-1 dos pacientes com resistência, foi apresentada conforme a listagem de mutações da International AIDS Society- Drug Resistance Mutations Group (Johnson et al. 2006).

2.4 Análise estatística

O banco de dados foi elaborado pelo programa EpiData 3.1. Para a análise estatística, foi empregado o programa STATA 9.0 (StataCorp, College Station, TX), com utilização dos seguintes testes: Teste chi-quadrado para variáveis categóricas e teste não-paramétrico de equidade das medianas para variáveis contínuas.

3 – RESULTADOS

Todos os 150 pacientes encaminhados aceitaram participar da pesquisa, que teve seu início com as coletas dos exames de genotipagem do vírus HIV-1 em abril de 2002, no CRT DST/AIDS, e em fevereiro de 2004, na Casa da AIDS. Em agosto de 2005, deu-se o encerramento das coletas. Participaram 14 pacientes da Casa da AIDS; os demais eram provenientes do CRT/DST AIDS. Na Tabela 1, são apresentadas as características sócio-epidemiológicas da população estudada.

Tabela1. Características sócio-epidemiológicas de 150 pacientes em interrupção terapêutica. São Paulo, Brasil

Características	n (%)
	Total=150
Sexo	
masculino	92 (61,3)
feminino	58 (38,7)
Escolaridade	
Não alfabetizado	1 (0,67)
Primeiro grau	45 (30,0)
Segundo grau	69 (46,0)
Terceiro grau	35 (23,3)
Uso de drogas intra venosas	
Não	141 (94)
Sim	9 (6)
Homens que fazem sexo com homens	
Não	73 (48,7)
Sim	77 (51,3)
Relação sexual desprotegida*	
Sim	56 (37,3)
Não	94 (62,7)
Antecedente de diferentes parceiros sexuais*	
<=1	20 (13,3)
>=2	130 (86,7)
Faixa etária (anos)	
<=30	25 (16,7)
31-40	77 (51,3)
41-50	30 (22,0)
>51	18 (12,0)

*No ano anterior à pesquisa

A tabela 2 apresenta as características dos regimes de tratamento, decisão e razões das ITs.

Tabela 2. Características de tratamento e causas das interrupções Terapêuticas (ITs) de 150 pacientes

Características	n (%) total=150
Ano de início da terapia ARV*	
1988-1996	39 (26,0)
1997-2001	110 (73,3)
Número de regimes ARVs prévios as ITs	
1	42 (28,0)
2	40 (26,7)
>=3	68 (45,3)
Interrupção prévia ARVs*	
Sim	69 (46,0)
Não	80 (53,0)
Diagnóstico prévio de doença oportunista antes das ITs	
Sim	55 (37,0)
Não	95 (63,0)
Nadir de células CD4/mm³	
<50	10 (6,6)
>=51 a 200	10 (6,6)
>=201	130 (86,6)
Decisão das ITs	
Recomendação médica	110 (73,3)
Decisão do paciente	40 (26,7)
Razões para as ITs	
Baixa adesão	30 (20,0)
Fora dos critérios atuais de início de terapia boas condições clínico/laboratoriais	45 (30,0)
Efeitos adversos	58 (38,7)
Gestação	4 (2,7)
Múltiplas razões	13 (8,6)

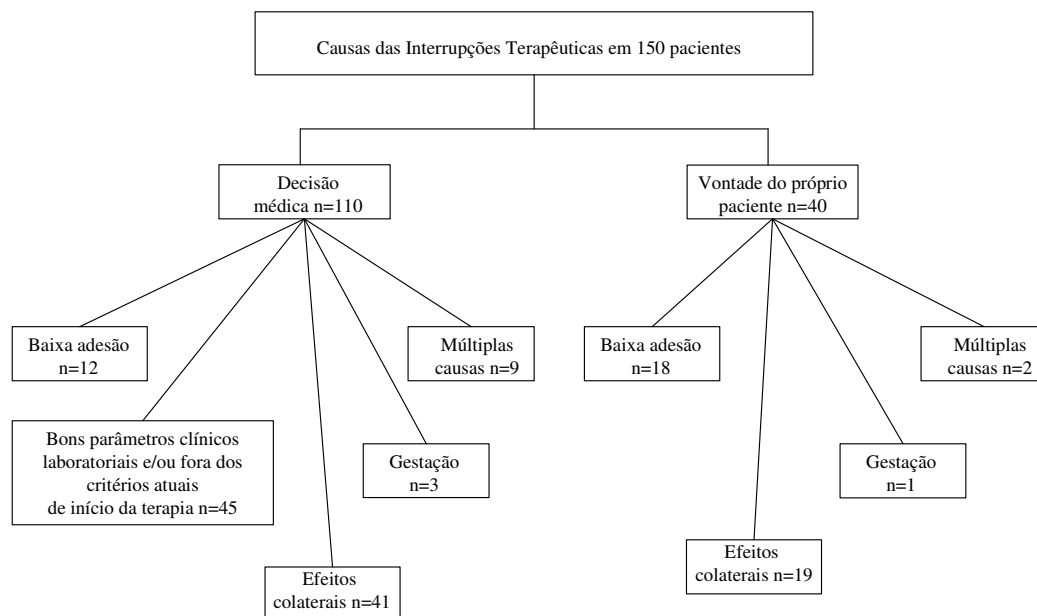
*Um paciente sem dado

Cento e dez (73,3%) pacientes submeteram-se à IT por decisão médica; os demais a adotaram por vontade própria. Cinquenta e cinco (37%)

pacientes apresentavam doença prévia relacionada a AIDS, sendo que 35 deles receberam indicação de IT por seus médicos. Os motivos que estavam por trás dessa decisão eram: efeitos colaterais (18 pacientes), bom estado clínico/laboratorial (9), falta de adesão ao tratamento (5) e múltiplas causas (3). Cinco pacientes apresentaram também doença associada a AIDS após a IT. Entre os 95 (63%) que não apresentavam história prévia de doença associada a AIDS, um apresentou quadro de doença oportunista após a interrupção.

Na figura, 1 são apresentados os motivos das ITs de acordo a natureza da decisão: indicação médica ou vontade do paciente.

Figura 1. Motivos das Interrupções Terapêuticas conforme a natureza da decisão



A reação de PCR foi positiva durante a realização do teste de genotipagem para 137 pacientes. Em 38 (27,7%), foi detectada resistência a pelo menos uma das classes dos ARVs.

Dos 13 pacientes em que não foi possível a amplificação da amostra mesmo após uma segunda coleta, 2 apresentavam carga viral menor do que 400 cópias/mm³ de sangue, 4 menor do que 10.000 cópias/mm³ e os demais tinham carga viral acima de 10.000 cópias/mm³. As amostras que não puderam ser amplificadas possivelmente apresentavam mutações no sítio de ligação de um dos *primers*.

A mediana do tempo transcorrido entre a descoberta da positividade para a infecção pelo HIV-1 e a data da IT foi de 6,2 anos (intervalo interquartil –IQ, 4,7-8,3) e não houve diferença estatística significativa entre os que apresentaram ou não resistência $p=0,18$. O tempo desde o diagnóstico da infecção pelo HIV-1 até a coleta do exame de genotipagem do estudo teve mediana de 7,4 anos (IQ, 5,9-9,7). A mediana do tempo de uso de ARVs foi de 4,1 anos (IQ, 2,9-5,5), 4,0 anos para os resistentes (R), e 4,1 anos para os não resistentes (NR), $p= 0,9$. O tempo da IT teve mediana de 338 dias (IQ, 243-529 dias), para os R a mediana foi de 310 dias (IQ, 240-565) e para os NR foi de 345 dias (IQ, 231-465), $p=0,4$. O tempo entre o diagnóstico de doença relacionada à AIDS e a IT (dos 55 pacientes que haviam apresentado doença oportunista) teve mediana de 7 anos (IQ, 5-8).

A média do nadir de células CD4/mm³ foi 346,14 (desvio padrão 161,7).

A Tabela 3 apresenta os valores das medianas de células CD4 e da carga viral nos períodos anterior ao início da terapia ARV, anterior à IT e anterior à coleta do exame de genotipagem.

Tabela 3. Medianas de CD4 e da carga viral: no início da terapia anti-retroviral (ARV), anterior à interrupção da terapia e anterior à coleta do exame de genotipagem

Períodos	CD4 células/mm ³					Carga viral cópias/ml				
	Mediana	Percentil %				Mediana	Percentil %			
		1	25	75	99		1	25	75	99
Início da terapia ARV	425	19	320	546	2.412	41.750	400	18.900	1.000.000	660.000
Anterior à interrupção da terapia	673	109	513	807	1.928	657	80	400	5.600	400.370
Anterior à coleta do exame de genotipagem	486	15	385	628	1.094	43.100	400	8.170	108.000	719.000

A Tabela 4 descreve as características dos regimes de tratamento com os ARVs, da IT e a resistência aos ARVs dos 137 pacientes. Não houve associação entre a presença de resistência e as variáveis analisadas.

Tabela 4. Características dos regimes de tratamento e interrupção terapêutica em 137 pacientes#

Características	Resistência aos ARVs		p	Total n
	não n(%)	sim n(%)		
Ano de início da terapia ARV*			0,2	
1988-1996	26 (68,4)	12 (31,6)		38
1997-2001	73 (74,5)	25 (25,5)		98
Número de regimes ARVs prévios			0,9	
1	27 (71,0)	11 (28,0)		38
2	25 (71,4)	10 (28,6)		35
>=3	47 (73,4)	17 (26,6)		64
Primeiro regime ARV usado			0,3	
NRTI	78 (72,9)	29 (27,1)		107
NRTI + NNRTI	5 (100,0)	0		5
NRTI + IP	15 (62,5)	9 (37,5)		24
NRTI + NNRTI + IP	1 (1,0)	0		1
Último regime usado			0,6	
NRTI	33 (68,7)	15 (31,3)		48
NRTI + NNRTI	35 (47,5)	12 (25,5)		47
NRTI + IP	28 (71,8)	11 (28,2)		39
NRTI + NNRTI + IP	3 (100,0)	0		3
Nadir de células CD4/mm³			0,1	
<=50	5 (50,0)	5 (50,0)		10
>=51 a 200	7 (87,5)	1 (12,5)		8
>=201	87 (73,1)	32 (26,9)		119
Interrupção prévia ARVs			0,1	
Sim	43 (66,5)	22 (33,5)		65
Não	56 (77,8)	16 (22,2)		72
Decisão da interrupção			0,4	
Recomendação médica	75 (74,3)	26 (25,7)		101
Decisão do próprio paciente	24 (66,7)	12 (33,3)		36
Razões para a interrupção			0,5	
Baixa adesão	19 (67,9)	9 (32,1)		28
Fora dos critérios atuais de início de terapia boas condições clínico/laboratoriais	28 (70,0)	12 (30,0)		40
Efeitos adversos	40 (71,4)	16 (28,5)		56
Gestação	2 (100,0)	0		2
Múltiplas razões	10 (90,9)	1 (9,0)		11

#13 pacientes PCR negativo *sem dados de um paciente

A Tabela 5 apresenta as análises dos valores da carga viral e CD4 com a resistência do HIV-1 aos ARVs nos períodos: início do tratamento, anterior à interrupção da terapia, anterior à coleta do exame de genotipagem. A detectabilidade da carga viral no período anterior a IT foi único fator associado com a resistência $p=0,004$.

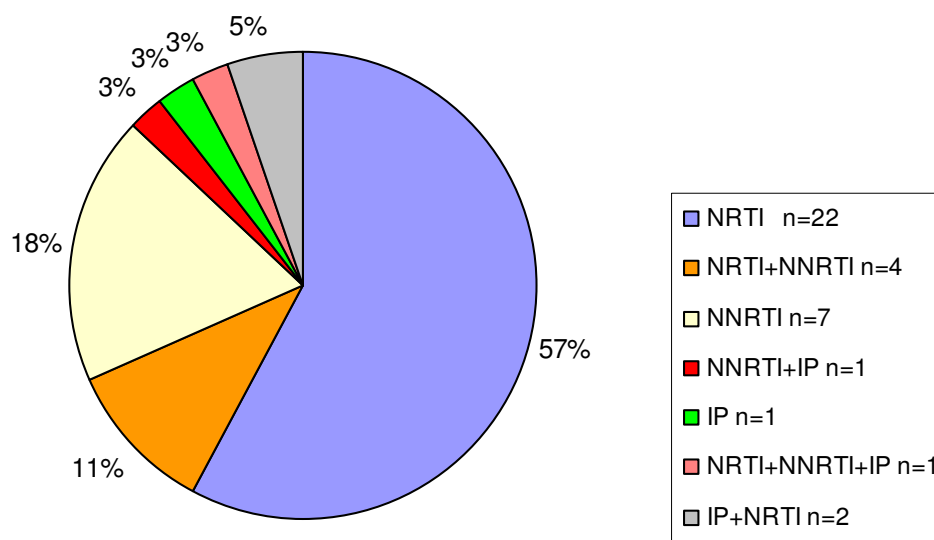
Tabela 5. Valores de carga viral e CD4 de acordo com a presença de resistência aos anti-retrovirais nos períodos: início do tratamento, anterior à interrupção da terapia, anterior à coleta do exame de genotipagem

Períodos	Carga viral/ml		p	CD4/mm ³		p
	<=400	>=401		<=200	>=201	
Início do tratamento	*			**		
sensíveis	2 (4,0)	48 (96,0)	0,4	5 (6,7)	70 (93,3)	0,2
resistentes	0 (0,0)	17 (100,0)		4 (17,8)	23 (85,2)	
Anterior à interrupção da terapia	#			##		
sensíveis	47 (50,0)	47 (50,0)	0,004	3 (3,1)	93 (96,9)	0,4
resistentes	8 (22,2)	28 (77,7)		2 (5,7)	33 (94,3)	
Anterior à coleta do exame genotipagem	#			#		
sensíveis	3 (3,2)	90 (96,8)	0,2	4 (4,3)	89 (95,7)	0,3
resistentes	0 (0,0)	37 (100,0)		3 (8,1)	34 (91,8)	

*70 pacientes sem dados,**35 pacientes sem dados, #7 pacientes sem dados, ##6 pacientes sem dados

Na figura 2, são apresentados os dados de resistência de acordo com as classes dos ARVs dos 38 pacientes.

Figura 2. Resistência dos 38 pacientes de acordo com as classes dos anti-retrovirais



A seguir, a Tabela 6 apresenta os períodos em meses das ITs, as mutações relacionadas à resistência, as drogas a que os pacientes foram resistentes e as indicações das ITs .

Tabela 6. Período de interrupção terapêutica (IT), mutações de resistência aos anti-retrovirais e indicações para a IT em 38 pacientes

ID*	Tempo (meses) após IT	Gene da Protease	Gene da Transcriptase Reversa	Baixo grau de resistência	Alto grau de resistência	Razões para IT#	Decisão do paciente para IT
2	6	M36I	V106I, T215ST	AZT		EA	não
5	7	M36I	T215N	AZT, D4T, DDI		EA	sim
7	16	V77I, I93L	M184G, Y188H, G190D		3TC, EFV, DLV, NVP	EA	não
11	28	L63P	K70R, M184V		3TC, FTC	BA	não
14	6	L33V, L63P	K70KR, K219KQ	D4T	AZT	FC	não
29	6	V32IV, L33FL, M46I, I47IV, G73AT, I84V, M41L, E44D, D67N, L74V, V118I, L210W, T215Y, K219R, K103S, V108I, L90M, L10F, L63P, I93L	M41L, E44D, D67N, L74V, V118I, L210W, T215Y, K219R, K103S, V108I, G190A, F227FL	3TC, FTC	ABC, AZT, D4T, DDC, DDI, TDF, DLV, EFV, NEV, ATV, DRV, FPV, IDV, LPV, NFV, SQV, TPV	BA	sim
31	16	M36I, L63LP	M41L, T215S	ABC, DDI, TDF	AZT, D4T	EA	não
32	8	L63P	M41LM, V118IV, L210W, T215D		ABC, AZT, D4T, DDI, TDF	FC	não
33	22	M36I, L63P	D67N, K219Q	D4T	AZT	FC	não
51	8	L63P, V177AITV	M41LM, T215ST	ABC, DDI, TDF	AZT, D4T	BA	não
52	7	M36I, L63S,	K219KQ	AZT		BA	não
54	9	V77I	K70KR	AZT		EA	não
78	13	K20R, M36I	K103N		DLV, EFV, NVP	FC	não
97	14	L63P	D67G, K70R, L210F, K219Q		AZT, D4T	FC	não
82	9	K20R, M36I, L63P	T215Y	ABC, DDI, TDF	AZT, D4T,	FC	não
86	10	L63P	M184MV		3TC, FTC	FC	sim
91	8		M41LM, T215FIST	TDF	ABC, AZT, D4T, DDI	FC	não
95	6	L10I, L63LPS, I93L	K103KN, P225HP		DLV, EFV, NVP	BA	não
96	10	L63P	D67G, K103N, G190A	AZT	DLV, EFV, NVP	BA	sim
98	6	L63P	M184V, K103N		3TC, FTC, DLV, EFV, NVP	FC	não
100	9	M36I, L63LP	K238KT	EFV	DLV, NVP	EA	não
104	11	M36I, V77I	D67N, V118I, T215FL, K219Q, K103R	TDF	ABC, AZT, D4T, DDI	FC	não
122	12	D30N, L63S, A71V, I93L	T215Y	ABC, DDI, TDF	AZT, D4T, NFV	BA	sim
139	13	D30N, N88D, L63P, A71V, V77I			NFV	BA	sim
150	10		M41L, L210W, T215D		ABC, AZT, D4T, DDI, TDF	FC	sim
153	15	M46L, L10F, V77I, I93L	K103N, P225H	ATV, FPV, IDV, LPV	NFV, DLV, EFV, NVP	BA	sim
160	13		M184V		3TC, FTC	EA	não
114	27	V77I	M41L, T215L	ABC, DDI, TDF	AZT, D4T	EA	não
120	6	M36I	K103N		DLV, EFV, NVP	EA	sim
132	9		T215X, Y188FHLY	AZT, D4T, DDI	DLV, EFV, NVP	BA	sim
141	9	K20M, M36I, I93L	K103N		DLV, EFV, NVP	BA	sim
123	9	M36I, L63T	M41L, D67N, V118I, L210W, T215Y	3TC, FTC	ABC, AZT, D4T, DDI, TDF	FC	não
125	11	I54V, V82A, L90M, L10I, K20R, M36I, L63P, A71V	M41L, L118I, L210W, T215H	DRV	ABC, AZT, D4T, DDI, TDF, FPV, IDV, LPV, NFV, SQV, TPV	FC	não
126	12	L63P	M41L, T69N, V118I, L210W, T215C	3TC, FTC	ABC, AZT, D4T, DDI, TDF	BA	não
142	40		M41L	AZT, D4T		EA	não
187	16	L63P, A71V, I93L	K103N		DLV, EFV, NVP	BA	não
165	10	L63P, A71T		AZT, D4T		EA	não
130	10	L63P, V77I	G190EG	DLV	EFV, NVP	EA	sim

*ID identificação #BA baixa adesão; FC fora dos critérios atuais de início da terapia e/ou boas condições clínico laboratoriais; EA efeitos adversos

Mutações tanto para alto e baixo graus de resistência foram encontradas em 18 pacientes. Catorze deles apresentaram mutações que levam a alto grau de resistência, 6 exibiram mutações que levam a baixo grau de resistência aos NRTIs. Entre os 38 pacientes com resistência, 29 (76,3%) apresentavam mutações para os NRTIs e 15 (39,4%) para os NNRTIs. A resistência aos IPs foi detectada em 5 (13,1%). A mutação M184V foi encontrada em 3 pacientes (7,9%).

Nas figuras 3 e 4 são apresentadas as mutações mais freqüentes encontradas nos genes da TR e da PR do HIV-1 dos 38 pacientes com resistência conforme a listagem de mutações da International AIDS Society-Drug Resistance Mutations Group.

Figura 3. Mutações no gene da TR de 38 pacientes com resistência

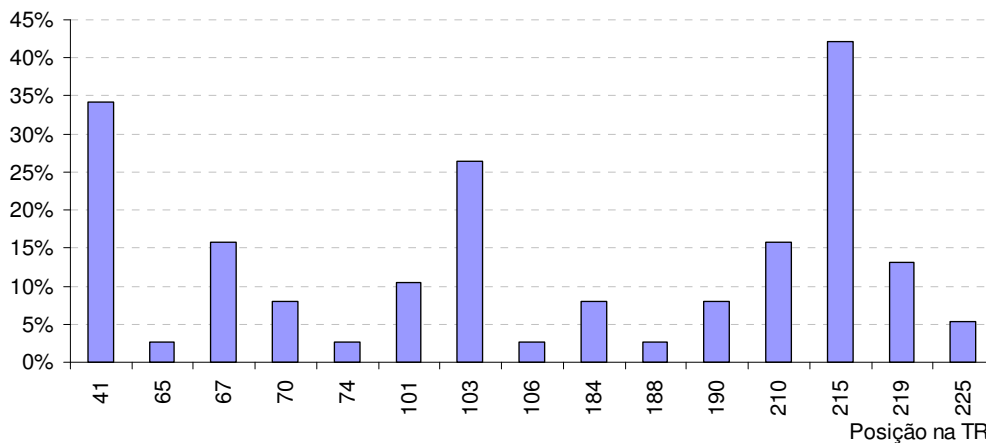
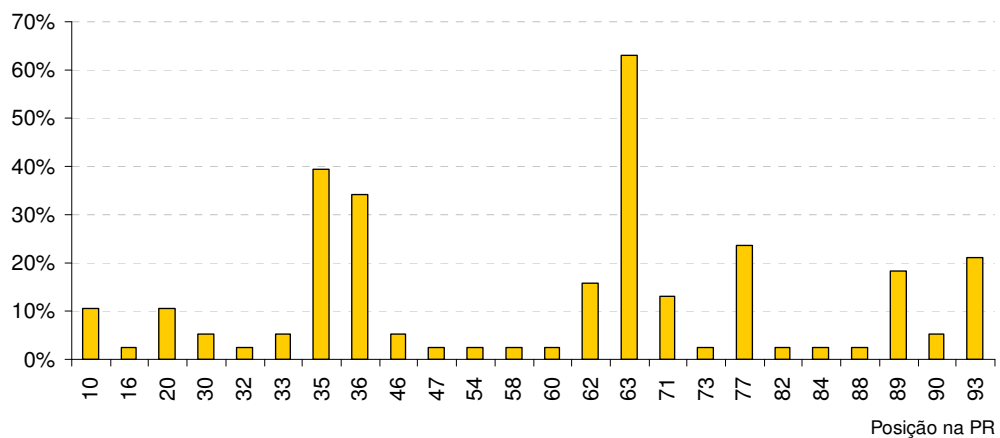


Figura 4. Mutações no gene da PR de 38 pacientes com resistência

Os subtipos apresentados pelos pacientes ao exame de genotipagem foram B em 123; F em 9; B/F em 4 e C em 2.

4. DISCUSSÃO

Este estudo descritivo avalia aspectos da prática clínica na conduta da IT. Seu intuito foi identificar, em um segmento de pacientes que havia feito uso de ARVs, a prevalência de resistência do HIV-1 a esses medicamentos, bem como as causas envolvidas na IT e o comportamento relacionado ao risco de transmissão do vírus HIV-1. Até então, não tínhamos conhecimento de como é a participação desses pacientes na rotina do atendimento de duas importantes instituições, que são reconhecidas como centros de referência no tratamento da infecção/doença causada pelo HIV-1.

A IT na prática clínica mostrou ser parte da história de tratamento dos pacientes avaliados, ainda que, naquela altura, não constasse das diretrizes de tratamento. De fato, a IT só passou a ser considerada em 2006, e mesmo assim, apenas para os pacientes que iniciaram a terapia ARV com a contagem de células CD4 acima dos valores preconizados atualmente, especialmente para aqueles que apresentam dificuldades de adesão, que nunca apresentaram valores menores que 350 células/mm³ e sempre foram assintomáticos (Recomendações para Terapia Anti-retroviral em adultos e adolescentes infectados pelo HIV. Brasília: Ministério da Saúde, 2006).

Em nossa investigação a IT foi indicada em 73,3% dos casos pelos médicos que assistiam aos pacientes nos ambulatórios. A necessidade de reduzir os efeitos colaterais, contornar os riscos das alterações do metabolismo da glicose e dos lípidos (Carr et al. 1998), decorrentes do uso dos ARVs, em conjunto com as mudanças na aparência, causadas pela

lipodistrofia e com o possível impacto negativo na adesão aos ARVs a longo prazo são fatores que podem ter encorajado os médicos a adotar tal conduta. As causas da IT variam desde a própria vontade do paciente em parar a terapêutica, passam pelos efeitos adversos e chegam a critérios clínicos laboratoriais ainda não estabelecidos que levam os médicos a indicar a interrupção o tratamento com os ARVs. Na prática, ocorrem situações não previstas pelos estudos, as quais elucidam as condutas adotadas. Para contornar os riscos inerentes à terapia, como os efeitos adversos e os custos, a IT se coloca atualmente como uma alternativa terapêutica atraente, porém o grande problema é a emergência de HIV-1 resistentes aos ARVs durante os ciclos de interrupção (Arnedo-Valero et al. 2005). Quando o presente estudo foi iniciado, em 2002, ainda não eram muito bem conhecidos os riscos e benefícios de tal procedimento.

Diferentes estratégias de IT já vinham sendo investigadas. Num pequeno estudo piloto com 10 pacientes cronicamente infectados (Dybul et al. 2001), a estratégia de interrupção estruturada da terapia, com tempo pré-definido (semanas alternadas de HAART), inicialmente se mostrou segura e, como fator positivo, confirmou um decréscimo dos níveis séricos de colesterol e triglicérides. No período em que foi desenvolvido o estudo, não houve emergência de mutações de resistência do HIV. Quando o mesmo grupo de pesquisadores fez outra investigação com ciclos maiores de interrupção (quatro semanas sem HAART, seguidas de 8 semanas com HAART), o estudo teve de ser encerrado antes do previsto devido à emergência de novas mutações de resistência (Dybul et al. 2003).

A estratégia da IT para pacientes cronicamente infectados que já houvessem atingido a reconstituição do sistema imune e apresentassem bom estado clínico-laboratorial começou então a ser investigada. Em janeiro de 2002, o National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID 2006), dos EUA, que faz parte dos National Institutes of Health (NIH), iniciou um grande estudo observacional, o SMART, que até janeiro de 2006 havia recrutado 5472 participantes em 33 países. Conforme comentário do Dr. Anthony S. Fauci, esse seria um dos maiores estudos sobre o tratamento HIV/AIDS conduzidos até então (NIAID 2006). A conclusão a que se chegou foi que a IT guiada pelo CD4 ou IET, esteve associada a um risco 2,5 vezes maior de progressão para doença ou morte (intervalo de confiança (IC) 95% :1,8-3,6; $p < 0,0001$) e 1,5 vezes maior de complicações severas para os pacientes (El-Sadr et al 2006). Embora o risco/benefício a longo prazo se mantenha incerto, o Comitê Executivo do SMART e o NIAID recomendaram que seria prudente o reinício da terapia no grupo que a usava de modo episódico (NIAID 2006).

Em contrapartida, no estudo Stacatto com 430 pacientes, a IT guiada pelo CD4 mostrou-se segura, sem aumento do número de casos de doença definidora de AIDS para pacientes com $CD4 > 350$ células/mm³ (a terapia era reiniciada quando < 350 células/mm³), com a vantagem de ter reduzido os custos da terapêutica ARV em 61,5%, além de ter minorado os episódios de diarreia e neuropatia relacionados com o tratamento. O surgimento de resistência foi similar para os dois grupos (2%) (Ananworanich et al. 2006). O estudo SALTO com 99 pacientes também apresentou resultados

favoráveis à IET evidenciando que, após 24 meses de IT 88% dos pacientes continuavam fora dos parâmetros para o reinício da terapia. A carga viral do HIV-1 na IT e o nadir das células CD4 foram os fatores relacionados ao reinício da terapia (Piketty et al. 2006). O estudo BASTA com 147 pacientes, mostrou que 74/76 em IET assim se mantiveram por pelo menos 18 meses, mas 8/71 em terapêutica contínua interromperam o HAART ($p=0,0007$). Dentre os que interromperam a terapia a decisão, na maior parte dos casos, foi do próprio paciente, observando-se diminuição nos níveis de colesterol e triglicérides dos que estavam em IET em comparação com os que estavam em terapia contínua, bem como redução dos custos no grupo em IET. Nesse estudo também o nadir de CD4 foi relacionado à duração da IT ($p=0,002$) (Maggiolo et al. 2003). Uma investigação sobre a ITE na África, abrangendo 326 pacientes, randomizados para terapêutica contínua ou guiada pela contagem de CD4, seguidos por 20 meses, não apontou diferenças entre os dois grupos na incidência de mortalidade (por 100 pessoas ano). Já a incidência de morbidade severa (por 100 pessoas/ano) foi maior no grupo em IET ($p=0,001$) (Danel et al. 2006).

É interessante notar que, neste último estudo, realizado num país subdesenvolvido, doenças bacterianas invasivas foram detectadas com mais frequência do que nos estudos realizados em países desenvolvidos. Isso indica que os potenciais benefícios encontrados por alguns investigadores em relação à IET não podem ser generalizados pois variam com a realidade de cada região.

Em nosso estudo, 45(30%) pacientes tiveram a interrupção da terapia devido aos bons níveis da contagem de células CD4 (fora dos critérios atuais de início da terapia e/ou boas condições clínico laboratoriais), mostrando que, na prática, seus médicos realizavam esse tipo de intervenção mesmo antes que os resultados dos trabalhos citados acima fossem conhecidos.

Num grande estudo, abrangendo uma coorte hospitalar com 862 pacientes, denominado I.C.O.N.A., 312 (36,2%) indivíduos interromperam o tratamento durante o primeiro regime terapêutico HAART num período de tempo cuja mediana foi de 45 semanas. As causas da IT foram: a) toxicidade dos ARVs (58,3%); b) não adesão (19,5%); c) falência ao tratamento (14,1%); d) outras razões (8,0%) (d'Arminio Monforte et al. 2000). Em nosso trabalho, a maioria dos pacientes já haviam usado mais do que 3 diferentes esquemas com ARVs, mas o principal motivo para a adoção da IT também foram os efeitos adversos relacionados aos ARVs (38,7%) e a baixa adesão se apresentou como a terceira causa mais importante para (20%). Como na época em que o estudo I.C.O.N.A. foi realizado ainda não se aventava a possibilidade de adotar a IT em pacientes com bom estado clínico-laboratorial, esse fator não foi considerado.

Nossa pesquisa não definiu a frequência de IT para o total de pacientes dos dois grandes centros de tratamento em que a investigação foi conduzida. Nosso objetivo inicial foi avaliar a presença de resistência do HIV aos ARVs em pacientes com mais de 6 meses de IT. No entanto, pudemos também ter uma visão do que está ocorrendo na prática clínica.

Uma das limitações do estudo foi o emprego de amostragem por conveniência, que não incluiu os pacientes que abandonaram os serviços. É possível que com isso tenhamos subestimado a frequência de ITs por efeitos adversos ou baixa adesão. Outra limitação foi a avaliação da baixa adesão, uma vez que a classificação foi baseada em dados do prontuário e ficou limitada à visão pessoal do médico de cada paciente.

Na literatura, não se encontram estudos que levem em conta o desejo do paciente como fator causal da IT — talvez esse fator seja incluído no item que agrupa os pacientes com má adesão ao tratamento. A única pesquisa que registrou à parte os casos de IT adotados por desejo do paciente foi o estudo BASTA (Maggiolo et al. 2003). Em nosso estudo, classificamos como fatores definidores da IT tanto a vontade do paciente, como a indicação do médico.

Em nossa investigação, 37% (55) dos pacientes apresentavam diagnóstico prévio de doença relacionada à AIDS. Destes, 35 adotaram a IT por recomendação médica (18 por efeitos colaterais, 9 por estarem em bom estado clínico-laboratorial, 5 por baixa adesão a terapia ARV e 3 por mais de uma causa). No cotidiano do tratamento, os médicos deparam uma realidade que não faz parte dos estudos clínicos. A dificuldade de adesão a regimes terapêuticos complexos, seja em virtude dos efeitos colaterais ou mesmo da necessidade de se respeitar corretamente a posologia, aliada a dificuldades sociais, pode desencadear a suspensão da terapia mesmo em casos onde os riscos de tal conduta se sobrepõem aos benefícios.

A prática de relação sexual desprotegida no ano anterior à pesquisa foi relatada por 37,3% (56) dos pacientes, e 86,7% (130) referiram mais que dois parceiros no mesmo período. Tais dados sugerem a necessidade de um trabalho de prevenção à AIDS também direcionado para os pacientes em IT. Não conhecemos a dinâmica da transmissão do HIV-1 resistente em nossa população, mas o aumento do risco de transmissão em homens que fazem sexo com outros homens e entre casais heterossexuais já foi associado à descontinuidade do tratamento com ARVs, por Tubiana et al (2002). No período da IT, o risco de transmissão deve ser informado aos pacientes, por ser considerado maior, principalmente porque o aumento da carga viral após a IT é comparável ao observado durante a infecção aguda (Colven et al. 2000; Kilby et al. 2000) e por haver perigo de transmissão de cepas resistentes de pessoa a pessoa (de Ronde et al. 1996; Erice et al. 1993; Quigg et al. 1997).

Em nosso estudo, os pacientes apresentaram mediana da carga viral, no período em que foi colhido o exame de genotipagem, de 43.100 cópias/ml, o que indica maior possibilidade de transmissão, decorrente da alta carga viral. Como já estabelecido, o valor da carga viral no plasma é um importante marcador na transmissibilidade do HIV entre heterossexuais e na transmissão materno-fetal. Em Montreal, Canadá, tem-se observado, desde o ano 2000, decréscimo na prevalência do HIV resistente às drogas em indivíduos com infecção recente. Esse fato coincide com a queda da média da carga viral dos pacientes cronicamente infectados (Routy et al. 2004).

Em geral, o que se sabe é que as cepas resistentes têm *fitness* viral menor que as selvagens. Por isso, seria de esperar que não fossem mais encontradas após 6 meses da suspensão da terapia. Em estudo de Verhofstede et al (1999), em 12 dos 14 pacientes avaliados, o tempo necessário para o reaparecimento de cepas de HIV-1 selvagens variou de 14 dias a 2 meses após a interrupção da terapia, tanto para as mutações associadas à TR quanto para as associadas aos IP.

Provavelmente, as cepas resistentes encontradas em nosso estudo que foram selecionadas após 6 meses de IT (mediana de 338 dias) têm *fitness* equivalente ao das selvagens, pois se fixaram na população viral mesmo sem a pressão seletiva do medicamento, se mostrando majoritárias. Portanto, esses pacientes apresentam fatores que aumentam o risco de transmissão de cepas resistentes: carga viral alta, cepas resistentes com bom *fitness* e, no que diz respeito à transmissão sexual, comportamento de risco.

Em 98 (71,5%) pacientes com resultado de genotipagem, o início da terapia ocorreu entre os anos de 1997-2001 (Tabela 4), em 107 (78,1%) foram usados apenas NRTI no regime inicial, provavelmente porque nessa época não era preconizado o início da terapia com regime terapêutico potente que empregasse IP ou NNRTI. Os pacientes que haviam usado mais que três diferentes regimes em seu histórico de terapia com ARVs representavam 46,7% (64) da amostra estudada; outros 25,5% (35) tinham feito uso de dois regimes diferentes e 27,7% (38) de apenas um único regime. Seria de se esperar que aqueles que haviam feito uso de maior

número de regimes terapêuticos tivessem mais chance de apresentar resistência após a IT, o mesmo ocorrendo com os que haviam sido submetidos à interrupção prévia dos ARVs, o que, todavia, não foi confirmado pela análise estatística, $p=0,9$ e $p=0,1$ respectivamente. O tempo de uso de terapia ARV teve mediana de 4,1 anos um período relativamente longo para uma amostra de pacientes que apresentava mediana de tempo da infecção pelo HIV (até a IT) de 6,2 anos.

Tampouco pudemos associar resistência a outras variáveis investigadas como: decisão da interrupção (por orientação do médico ou decisão do paciente), tipo de regime terapêutico usado no início do tratamento e na época da IT (último regime usado), as razões para a IT e nadir de células CD4.

O único marcador que se mostrou associado com resistência foi a presença de carga viral acima de 400 cópias/ml, $p=0,004$, no período anterior à IT, o que seria de esperar, uma vez que a seleção de variantes virais resistentes ocorre na presença de replicação viral.

Considerando-se que o HIV RNA do plasma reflete a produção mais recente de variantes virais e os pacientes da pesquisa se encontravam sem a pressão seletiva dos ARVs, optamos por realizar a investigação da genotipagem do HIV-1 em células mononucleares periféricas (PBMC), ou seja do HIV-DNA pró-viral, pela possibilidade de existirem mutações de resistência arquivadas em células de memória. Já foi demonstrada a concordância entre o exame de genotipagem em plasma e PBMC. Para 1104 pacientes infectados pelo HIV, virgens de tratamento, não foi

encontrada mais que 2% de diferença entre as seqüências pareadas (Bennet et al 2005).

Durante a ITE existe a possibilidade da replicação viral e seleção de variantes virais resistentes em virtude do decréscimo lento dos níveis plasmáticos dos ARVs. Na tentativa de verificar se as mutações eram selecionadas pela IT, Valero-Arnedo et al (2005), realizaram um estudo com 70 pacientes submetidos a IET (2 semanas com terapia e 2 semanas sem terapia ARV). Os autores detectaram mutações em 20 (18%) dos 112 ciclos de IET sendo que 6% foram selecionadas durante a interrupção e 12% haviam sido detectadas antes dela. A maioria ocorreu no primeiro ciclo da IET e não aumentou com os ciclos subsequentes. As mutações mais encontradas foram M184V, em 50%, e as relacionadas aos NNRTIs em 23%. Já Nuesch et al (2005) obtiveram resultados diferentes ao avaliar 20 pacientes com boa resposta ao tratamento HAART. Após terapia com duplo NRTI e realização de IET, verificou-se que a maioria das mutações relacionadas à resistência a drogas não foi induzida pela IET .

Esses estudos, ainda que controversos, levam-nos a considerar que a IT pode por si só causar o surgimento de novas mutações. Em nossa investigação, devido à falta de genotipagem no período anterior a IT, não é possível saber se as mutações encontradas devem-se a falências a regimes terapêuticos progressivos ou se são decorrentes da IT. Quanto às mutações de resistência, a maioria dos pacientes apresentou poucas posições mantidas nas que associadas à resistência. Alguns mantiveram um perfil com várias mutações que levam à resistência a muitas drogas. A maioria

76,3% (29 pacientes) apresentou mutações relacionadas aos NRTIs e 39,4% (15) aos NNRTIs. É interessante observar que a mutação M184V, em geral considerada de baixo *fitness* na ausência de medicação, permaneceu em 3 casos, sendo que num deles, a coleta foi realizada após 28 meses de IT.

A persistência de cepas resistentes por um longo período de tempo já foi descrita na infecção primária do HIV-1. No estudo de Ghosn et al. (2006) as mutações associadas a resistência persistiram no plasma e PBMC por mais de 2 anos em 5 pacientes não tratados. Os autores não observaram diferença entre os resultados obtidos do plasma ou PBMC. No nosso, caso não sabíamos qual seria a frequência de mutações que poderíamos encontrar. Também esperávamos o clareamento das mutações após a IT e a repopulação por cepas selvagens, conforme descrição de Miller et al.(2000), conhecida como *Drug holliday*. Porém, ao contrário do previamente descrito, a proporção de cepas resistentes foi considerável (27,7%) mesmo após um longo período sem uso de ARVs, o que leva a crer que elas talvez sejam estáveis.

Em nossa população também pode ter ocorrido clareamento do HIV-1 resistente e a frequência de resistência devesse ser maior no momento da IT.

Mesmo que a longo prazo não estejam estabelecidas as conseqüências clínico-laboratorias da prática da IT, como conclusão evidenciamos que uma parcela considerável de pacientes 27,7% (38) em IT manteve mutações estáveis relacionadas à resistência do HIV-1 por longo período de tempo. Dessa forma, existe a possibilidade de aumento do risco de transmissão de

cepas resistentes — o que pode se tornar mais um agravante para o controle da epidemia da infecção pelo HIV-1. Ou seja, há necessidade de reforçar os cuidados com a transmissão nesse segmento específico de pacientes.

5. CONCLUSÕES

Foram encontradas mutações de resistência do HIV-1 em 27,7% dos pacientes com mais de 6 meses de IT (mediana 338 dias).

A resistência esteve associada à detectabilidade da carga viral no período anterior à IT.

A IT é uma prática que tem sido adotada por orientação médica, mesmo antes de constar das diretrizes de tratamento do consenso brasileiro.

A grande proporção de indivíduos que afirmaram ter relação sexual desprotegida e com mais que 2 diferentes parceiros no ano anterior a pesquisa, reforça a necessidade de atenção especial para a prevenção da transmissão do HIV-1 nesse segmento específico de pacientes.

REFERÊNCIAS

AIDST BE-Boletim Epidemiológico. Ano 1 n^o 1. Programa Nacional de DST e AIDS [Ministério da Saúde]. Brasília; Janeiro a Junho, 2004.

Ananworanich J, Gayet-Ageron A, Le Braz M et al. CD4-guided scheduled treatment interruptions compared with continuous therapy for patients infected with HIV-1: results of the Staccato randomised trial. *Lancet* 2006; 368 (9534):459-65.

Ananworanich J, Nuesch R, Le Braz M et al. Failures of 1 week on, 1 week off antiretroviral therapies in a randomized trial. *Aids* 2003; 17 (15):F33-7.

Araujo LV, Soares MA, Oliveira SM et al. DBCollHIV: a database system for collaborative HIV analysis in Brazil. *Genet Mol Res* 2006; 5 (1):203-15.

Arion D, Kaushik N, McCormick S et al. Phenotypic mechanism of HIV-1 resistance to 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT): increased polymerization processivity and enhanced sensitivity to pyrophosphate of the mutant viral reverse transcriptase. *Biochemistry* 1998; 37 (45):15908-17.

Arnedo-Valero M, Garcia F, Gil C et al. Risk of selecting de novo drug-resistance mutations during structured treatment interruptions in patients with chronic HIV infection. *Clin Infect Dis* 2005; 41 (6):883-90.

Balakrishnan P, Kumarasamy N, Kantor R et al. HIV type 1 genotypic variation in an antiretroviral treatment-naive population in southern India. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2005; 21 (4):301-5.

Bangsberg DR, Acosta EP, Gupta R et al. Adherence-resistance relationships for protease and non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors explained by virological fitness. *Aids* 2006; 20 (2):223-31.

Bangsberg DR, Charlebois ED, Grant RM et al. High levels of adherence do not prevent accumulation of HIV drug resistance mutations. *Aids* 2003; 17 (13):1925-32.

Bangsberg DR, Perry S, Charlebois ED et al. Non-adherence to highly active antiretroviral therapy predicts progression to AIDS. *Aids* 2001; 15 (9):1181-3.

Barreto CC, Nishyia A, Araujo LV et al. Trends in antiretroviral drug resistance and clade distributions among HIV-1--infected blood donors in Sao Paulo, Brazil. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2006; 41 (3):338-41.

Barreto CC, Sabino EC, Goncalvez TT et al. Prevalence, incidence, and residual risk of human immunodeficiency virus among community and

replacement first-time blood donors in Sao Paulo, Brazil. *Transfusion* 2005; 45 (11):1709-14.

Bartlett JA, DeMasi R, Quinn J et al. Overview of the effectiveness of triple combination therapy in antiretroviral-naive HIV-1 infected adults. *Aids* 2001; 15 (11):1369-77.

Bennet DE, Shafer RW, Heneine W, et al. Concordance of HIV drug resistance genotyping results for paired PBMC and plasma specimens from persons newly diagnosed with HIV. In: 14th International HIV Drug Resistance Workshop. Quebec, Canada; 2005:161 (abst).

Boletim AIDS, Vol VIII, nº 4, São Paulo [Ministério da Saúde]. Brasília; Setembro/Novembro 1995.

Boucher CA, Cammack N, Schipper P et al. High-level resistance to (-) enantiomeric 2'-deoxy-3'-thiacytidine in vitro is due to one amino acid substitution in the catalytic site of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37 (10):2231-4.

Boucher CA, O'Sullivan E, Mulder JW et al. Ordered appearance of zidovudine resistance mutations during treatment of 18 human immunodeficiency virus-positive subjects. *J Infect Dis* 1992; 165 (1):105-10.

Boyer PL, Currens MJ, McMahon JB et al. Analysis of nonnucleoside drug-resistant variants of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *J Virol* 1993; 67 (4):2412-20.

Boyer PL, Sarafianos SG, Arnold E et al. Selective excision of AZTMP by drug-resistant human immunodeficiency virus reverse transcriptase. *J Virol* 2001; 75 (10):4832-42.

Brindeiro R, Vanderborght B, Caride E et al. Sequence diversity of the reverse transcriptase of human immunodeficiency virus type 1 from untreated Brazilian individuals. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43 (7):1674-80.

Brinkman K, Smeitink JA, Romijn JA et al. Mitochondrial toxicity induced by nucleoside-analogue reverse-transcriptase inhibitors is a key factor in the pathogenesis of antiretroviral-therapy-related lipodystrophy. *Lancet* 1999; 354 (9184):1112-5.

Call SA, Saag MS, Westfall AO et al. Phenotypic drug susceptibility testing predicts long-term virologic suppression better than treatment history in patients with human immunodeficiency virus infection. *J Infect Dis* 2001; 183 (3):401-8.

Cameron DW, Heath-Chiozzi M, Danner S et al. Randomised placebo-controlled trial of ritonavir in advanced HIV-1 disease. The Advanced HIV Disease Ritonavir Study Group. *Lancet* 1998; 351 (9102):543-9.

Carpenter CC, Fischl MA, Hammer SM et al. Antiretroviral therapy for HIV infection in 1998: updated recommendations of the International AIDS Society-USA Panel. *Jama* 1998; 280 (1):78-86.

Carr A, Miller J, Law M et al. A syndrome of lipoatrophy, lactic acidemia and liver dysfunction associated with HIV nucleoside analogue therapy: contribution to protease inhibitor-related lipodystrophy syndrome. *Aids* 2000; 14 (3):F25-32.

Carr A, Samaras K, Burton S et al. A syndrome of peripheral lipodystrophy, hyperlipidaemia and insulin resistance in patients receiving HIV protease inhibitors. *Aids* 1998; 12 (7):F51-8.

Casseb J, Orrico GS, Feijo RD et al. Lack of prior antiretroviral therapy is associated with increased mortality among hospitalized patients with AIDS in Sao Paulo, Brazil. *AIDS Patient Care STDS* 2001; 15 (5):271-5.

Casseb J, Pereira Junior LC, Silva GL et al. Decreasing mortality and morbidity in adult AIDS patients from 1995 to 1997 in Sao Paulo, Brazil. *AIDS Patient Care STDS* 1999; 13 (4):213-4.

Catz SL, Kelly JA, Bogart LM et al. Patterns, correlates, and barriers to medication adherence among persons prescribed new treatments for HIV disease. *Health Psychol* 2000; 19 (2):124-33.

Chamberlain PP, Ren J, Nichols CE et al. Crystal structures of Zidovudine- or Lamivudine-resistant human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptases containing mutations at codons 41, 184, and 215. *J Virol* 2002; 76 (19):10015-9.

Chen Z, Li Y, Schock HB et al. Three-dimensional structure of a mutant HIV-1 protease displaying cross-resistance to all protease inhibitors in clinical trials. *J Biol Chem* 1995; 270 (37):21433-6.

Chequer P, Cuchi P, Mazin R et al. Access to antiretroviral treatment in Latin American countries and the Caribbean. *Aids* 2002; 16 Suppl 3:S50-7.

Clavel F, Hance AJ. HIV drug resistance. *N Engl J Med* 2004; 350 (10):1023-35.

Clotet B, Ruiz L, Martinez-Picado J et al. Prevalence of HIV protease mutations on failure of nelfinavir-containing HAART: a retrospective analysis of four clinical studies and two observational cohorts. *HIV Clin Trials* 2002; 3 (4):316-23.

Coakley EP, Gillis JM, Hammer SM. Phenotypic and genotypic resistance patterns of HIV-1 isolates derived from individuals treated with didanosine and stavudine. *Aids* 2000; 14 (2):F9-15.

Collier AC, Coombs RW, Schoenfeld DA et al. Treatment of human immunodeficiency virus infection with saquinavir, zidovudine, and zalcitabine. AIDS Clinical Trials Group. *N Engl J Med* 1996; 334 (16):1011-7.

Colven R, Harrington RD, Spach DH et al. Retroviral rebound syndrome after cessation of suppressive antiretroviral therapy in three patients with chronic HIV infection. *Ann Intern Med* 2000; 133 (6):430-4.

Condra JH. Resistance to HIV protease inhibitors. *Haemophilia* 1998; 4 (4):610-5.

Condra JH, Holder DJ, Schleif WA et al. Genetic correlates of in vivo viral resistance to indinavir, a human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitor. *J Virol* 1996; 70 (12):8270-6.

Condra JH, Schleif WA, Blahy OM et al. In vivo emergence of HIV-1 variants resistant to multiple protease inhibitors. *Nature* 1995; 374 (6522):569-71.

Cornelissen M, Kampinga G, Zorgdrager F et al. Human immunodeficiency virus type 1 subtypes defined by env show high frequency of recombinant gag genes. The UNAIDS Network for HIV Isolation and Characterization. *J Virol* 1996; 70 (11):8209-12.

d'Arminio Monforte A, Lepri AC, Rezza G et al. Insights into the reasons for discontinuation of the first highly active antiretroviral therapy (HAART) regimen in a cohort of antiretroviral naive patients. I.CO.N.A. Study Group. Italian Cohort of Antiretroviral-Naive Patients. *Aids* 2000; 14 (5):499-507.

da Costa SM, Schechter M, Shindo N et al. Sequence and phylogenetic analysis of glycoprotein 120 of an HIV type 1 variant (GWGR) prevalent in Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1995; 11 (9):1143-5.

Daar ES, Bai J, Hausner MA et al. Acute HIV syndrome after discontinuation of antiretroviral therapy in a patient treated before seroconversion. *Ann Intern Med* 1998; 128 (10):827-9.

Danel C, Moh R, Minga A et al. CD4-guided structured antiretroviral treatment interruption strategy in HIV-infected adults in west Africa (Trivacan ANRS 1269 trial): a randomised trial. *Lancet* 2006; 367 (9527):1981-9.

de Ronde A, de Rooij ER, Coutinho RA et al. [Zidovudine-resistant HIV strains in intravenous drug users and homosexual men in Amsterdam]. *Ned Tijdschr Geneesk* 1996; 140 (17):932-4.

Deeks SG, Hecht FM, Swanson M et al. HIV RNA and CD4 cell count response to protease inhibitor therapy in an urban AIDS clinic: response to both initial and salvage therapy. *Aids* 1999; 13 (6):F35-43.

Deeks SG, Wrin T, Liegler T et al. Virologic and immunologic consequences of discontinuing combination antiretroviral-drug therapy in HIV-infected patients with detectable viremia. *N Engl J Med* 2001; 344 (7):472-80.

Deeks SG, Grant RM, Wrin T et al. Persistence of drug-resistant HIV-1 after a structured treatment interruption and its impact on treatment response. *Aids* 2003; 17 (3):361-70.

Desai SM, Kalyanaraman VS, Casey JM et al. Molecular cloning and primary nucleotide sequence analysis of a distinct human immunodeficiency virus isolate reveal significant divergence in its genomic sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986; 83 (21):8380-4.

Descamps D, Flandre P, Calvez V et al. Mechanisms of virologic failure in previously untreated HIV-infected patients from a trial of induction-maintenance therapy. Trilege (Agence Nationale de Recherches sur le SIDA 072) Study Team). *Jama* 2000; 283 (2):205-11.

Diaz RS, Sabino EC, Mayer A et al. Dual human immunodeficiency virus type 1 infection and recombination in a dually exposed transfusion recipient. The Transfusion Safety Study Group. *J Virol* 1995; 69 (6):3273-81.

Doyon L, Croteau G, Thibeault D et al. Second locus involved in human immunodeficiency virus type 1 resistance to protease inhibitors. *J Virol* 1996; 70 (6):3763-9.

Dumans AT, Soares MA, Machado ES et al. Synonymous genetic polymorphisms within Brazilian human immunodeficiency virus Type 1 subtypes may influence mutational routes to drug resistance. *J Infect Dis* 2004; 189 (7):1232-8.

Dybul M. Treatment Interruption in chronic HIV infection. In XIV International AIDS Conference. Barcelona, Spain; 2002: ThOrB261 (abst).

Dybul M, Chun TW, Yoder C et al. Short-cycle structured intermittent treatment of chronic HIV infection with highly active antiretroviral therapy: effects on virologic, immunologic, and toxicity parameters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98 (26): 15161-6.

Dybul M, Nies-Kraske E, Daucher M et al. Long-cycle structured intermittent versus continuous highly active antiretroviral therapy for the treatment of chronic infection with human immunodeficiency virus: effects on drug toxicity and on immunologic and virologic parameters. *J Infect Dis* 2003; 188 (3):388-96.

El-Sadr WM, Lundgren JD, Neaton JD et al. CD4+ count-guided interruption of antiretroviral treatment. *N Engl J Med* 2006; 355 (22):2283-96.

Erice A, Mayers DL, Strike DG et al. Brief report: primary infection with zidovudine-resistant human immunodeficiency virus type 1. *N Engl J Med* 1993; 328 (16):1163-5.

Erickson J, Kempf D. Structure-based design of symmetric inhibitors of HIV-1 protease. *Arch Virol Suppl* 1994; 9:19-29.

Esnouf RM, Ren J, Hopkins AL et al. Unique features in the structure of the complex between HIV-1 reverse transcriptase and the bis(heteroaryl)piperazine (BHAP) U-90152 explain resistance mutations for this nonnucleoside inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94 (8):3984-9.

Estevam D, Jamal L, Laplaza M, et al. Evolution of the Adherence to Antiretrovirals Patients HIV/AIDS. In 8th European Conference on Clinical Aspects and Treatment of HIV Infection. Athens, Greece; 2002: 86 p.

Fatkenheuer G, Theisen A, Rockstroh J et al. Virological treatment failure of protease inhibitor therapy in an unselected cohort of HIV-infected patients. *Aids* 1997; 11 (14):F113-6.

Fauci A. Host factors in the pathogenesis of HIV disease: implications for therapeutic strategies. In The 1st IAS Conference on HIV Pathogenesis and Treatment. Buenos Aires, Argentina; 2001:PL4 (abst).

FDA . HIV/AIDS Historical Time Line 1981-1990. 2006 Nov 15 [cited 2006 Nov 20]. Available from: <http://www.fda.gov>

Finzi D, Blankson J, Siliciano JD et al. Latent infection of CD4+ T cells provides a mechanism for lifelong persistence of HIV-1, even in patients on effective combination therapy. *Nat Med* 1999; 5 (5):512-7.

Frenkel LM WLI, Atwood SM, et al. . Specific, sensitive, and rapid assay for human immunodeficiency virus type 1 pol mutations associated with resistance to zidovudine and didanosine. *J Clin Microbiol* 1995; 215:403-10.

Friedland GH, Williams A. Attaining higher goals in HIV treatment: the central importance of adherence. *Aids* 1999; 13 Suppl 1:S61-72.

Gallant J. Current status of antiretroviral treatment interruption and intermittent therapy strategies. *Medscape General Medicine* 4(3), 2002 Sep19 [cited 2002 Nov 20]. Available from: <http://www.medscape.com/viewarticle/440897>

Ghosn J, Pellegrin I, Goujard C et al. HIV-1 resistant strains acquired at the time of primary infection massively fuel the cellular reservoir and persist for lengthy periods of time. *Aids* 2006; 20 (2):159-70.

Gomez-Cano M, Rubio A, Puig T et al. Prevalence of genotypic resistance to nucleoside analogues in antiretroviral-naive and antiretroviral-experienced HIV-infected patients in Spain. *Aids* 1998; 12 (9):1015-20.

Gong YF, Robinson BS, Rose RE et al. In vitro resistance profile of the human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitor BMS-232632. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44 (9):2319-26.

Gonzales MJ, Machekano RN, Shafer RW. Human immunodeficiency virus type 1 reverse-transcriptase and protease subtypes: classification, amino acid mutation patterns, and prevalence in a northern California clinic-based population. *J Infect Dis* 2001; 184 (8):998-1006.

Gulick RM, Mellors JW, Havlir D et al. Treatment with indinavir, zidovudine, and lamivudine in adults with human immunodeficiency virus infection and prior antiretroviral therapy. *N Engl J Med* 1997; 337 (11):734-9.

Haase AT. Population biology of HIV-1 infection: viral and CD4+ T cell demographics and dynamics in lymphatic tissues. *Annu Rev Immunol* 1999; 17:625-56.

Hahn BH, Shaw GM, Taylor ME et al. Genetic variation in HTLV-III/LAV over time in patients with AIDS or at risk for AIDS. *Science* 1986; 232 (4757):1548-53.

Hatano H, Vogel S, Yoder C et al. Pre-HAART HIV burden approximates post-HAART viral levels following interruption of therapy in patients with sustained viral suppression. *Aids* 2000; 14 (10):1357-63.

Havlir DV, Hellmann NS, Petropoulos CJ et al. Drug susceptibility in HIV infection after viral rebound in patients receiving indinavir-containing regimens. *Jama* 2000; 283 (2):229-34.

Hertogs K, Bloor S, Kemp SD et al. Phenotypic and genotypic analysis of clinical HIV-1 isolates reveals extensive protease inhibitor cross-resistance: a survey of over 6000 samples. *Aids* 2000; 14 (9):1203-10.

Hirshel B, Fagaard C., Oxenius A., et al. SSITT: a prospective trial of treatment interruption in HIV infection. In 9th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. Seattle, Washington; 2002:528 (abst).

Ho DD, Neumann AU, Perelson AS et al. Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature* 1995; 373 (6510):123-6.

Hsiou Y, Ding J, Das K et al. The Lys103Asn mutation of HIV-1 RT: a novel mechanism of drug resistance. *J Mol Biol* 2001; 309 (2):437-45.

Hu DJ, Dondero TJ, Rayfield MA et al. The emerging genetic diversity of HIV. The importance of global surveillance for diagnostics, research, and prevention. *Jama* 1996; 275 (3):210-6.

Huang H, Chopra R, Verdine GL et al. Structure of a covalently trapped catalytic complex of HIV-1 reverse transcriptase: implications for drug resistance. *Science* 1998; 282 (5394):1669-75.

Iversen AK, Shafer RW, Wehrly K et al. Multidrug-resistant human immunodeficiency virus type 1 strains resulting from combination antiretroviral therapy. *J Virol* 1996; 70 (2):1086-90.

Janini LM, Pieniazek D, Peralta JM et al. Identification of single and dual infections with distinct subtypes of human immunodeficiency virus type 1 by using restriction fragment length polymorphism analysis. *Virus Genes* 1996; 13 (1):69-81.

John H, Muller NJ, Opravil M et al. Indinavir urinary stones as origin of upper urinary tract obstruction. *Urol Int* 1997; 59 (4):257-9.

Johnson VA, Brun-Vezinet F, Clotet B et al. Update of the drug resistance mutations in HIV-1: Fall 2006. *Top HIV Med* 2006; 14 (3):125-30.

Kalams SA, Buchbinder SP, Rosenberg ES et al. Association between virus-specific cytotoxic T-lymphocyte and helper responses in human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* 1999; 73 (8):6715-20.

Kaplan AH, Michael SF, Wehbie RS et al. Selection of multiple human immunodeficiency virus type 1 variants that encode viral proteases with decreased sensitivity to an inhibitor of the viral protease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91 (12):5597-601.

Kaufmann GR, Suzuki K, Cunningham P et al. Impact of HIV type 1 protease, reverse transcriptase, cleavage site, and p6 mutations on the virological response to quadruple therapy with saquinavir, ritonavir, and two nucleoside analogs. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2001; 17 (6):487-97.

Kemp SD, Shi C, Bloor S et al. A novel polymorphism at codon 333 of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase can facilitate dual resistance to zidovudine and L-2',3'-dideoxy-3'-thiacytidine. *J Virol* 1998; 72 (6):5093-8.

Kempf DJ, Isaacson JD, King MS et al. Identification of genotypic changes in human immunodeficiency virus protease that correlate with reduced

susceptibility to the protease inhibitor lopinavir among viral isolates from protease inhibitor-experienced patients. *J Virol* 2001; 75 (16):7462-9.

Kenyon G. Resistance study to re-evaluate HAART. *Nat Med* 2001; 7 (5):515.

Kilby JM, Goepfert PA, Miller AP et al. Recurrence of the acute HIV syndrome after interruption of antiretroviral therapy in a patient with chronic HIV infection: A case report. *Ann Intern Med* 2000; 133 (6):435-8.

Korber B, Muldoon M, Theiler J et al. Timing the ancestor of the HIV-1 pandemic strains. *Science* 2000; 288 (5472):1789-96.

Kosalaraksa P, Kavlick MF, Maroun V et al. Comparative fitness of multi-dideoxynucleoside-resistant human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) in an In vitro competitive HIV-1 replication assay. *J Virol* 1999; 73 (7):5356-63.

Kozal MJ, Shah N, Shen N et al. Extensive polymorphisms observed in HIV-1 clade B protease gene using high-density oligonucleotide arrays. *Nat Med* 1996; 2 (7):753-9.

Larder BA, Kemp SD. Multiple mutations in HIV-1 reverse transcriptase confer high-level resistance to zidovudine (AZT). *Science* 1989; 246 (4934):1155-8.

Larder BA, Kemp SD, Harrigan PR. Potential mechanism for sustained antiretroviral efficacy of AZT-3TC combination therapy. *Science* 1995; 269 (5224):696-9.

Larder BA, Stammers DK. Closing in on HIV drug resistance. *Nat Struct Biol* 1999; 6 (2):103-6.

Lederman MM, Valdez H. Immune restoration with antiretroviral therapies: implications for clinical management. *Jama* 2000; 284 (2):223-8.

Lisziewicz J, Rosenberg E, Lieberman J et al. Control of HIV despite the discontinuation of antiretroviral therapy. *N Engl J Med* 1999; 340 (21):1683-4.

Little SJ, Holte S, Routy JP et al. Antiretroviral-drug resistance among patients recently infected with HIV. *N Engl J Med* 2002; 347 (6):385-94.

Lucas GM, Chaisson RE, Moore RD. Highly active antiretroviral therapy in a large urban clinic: risk factors for virologic failure and adverse drug reactions. *Ann Intern Med* 1999; 131 (2):81-7.

Maggiolo FRD, Gregis G, Quinzan G et al. Individualized Structured Treatment Interruptions: Results of a Randomized, Controlled Study

(BASTA). In 43rd Annual ICAAC Meeting. Chicago, Illinois, EUA.; 2003:H-448 (abst).

Mammano F, Petit C, Clavel F. Resistance-associated loss of viral fitness in human immunodeficiency virus type 1: phenotypic analysis of protease and gag coevolution in protease inhibitor-treated patients. *J Virol* 1998; 72 (9):7632-7.

Mansky LM. Retrovirus mutation rates and their role in genetic variation. *J Gen Virol* 1998; 79 (Pt 6):1337-45.

Marins JR, Jamal LF, Chen SY et al. Dramatic improvement in survival among adult Brazilian AIDS patients. *Aids* 2003; 17 (11):1675-82.

Marquina S, Leitner T, Rabinovich RD et al. Coexistence of subtypes B, F, and as B/F env recombinant of HIV type 1 in Buenos Aires Argentina. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1996; 12 (17):1651-4.

Meyer PR, Matsuura SE, Mian AM et al. A mechanism of AZT resistance: an increase in nucleotide-dependent primer unblocking by mutant HIV-1 reverse transcriptase. *Mol Cell* 1999; 4 (1):35-43.

Miller V. International perspectives on antiretroviral resistance. Resistance to protease inhibitors. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2001; 26 Suppl 1:S34-50.

Miller V, Sabin C, Hertogs K et al., Virological and immunological effects of treatment interruptions in HIV-1 infected patients with treatment failure. *AIDS* 2000; 14 (18):2857-67.

Miro JM, Plana M, Garcia F., et al. Structured treatment interruptions (STI) in patients receiving Haart within 90 days after onset of primary HIV-1 infection (PHI) symptoms: spontaneous control of viremia in only one third of cases after four cycles off therapy. In XIV International AIDS Conference; 2002: ThOrB1437 (abst).

Mocroft A, Gill MJ, Davidson W et al. Predictors of a viral response and subsequent virological treatment failure in patients with HIV starting a protease inhibitor. *Aids* 1998a; 12 (16):2161-7.

Mocroft A, Vella S, Benfield TL et al. Changing patterns of mortality across Europe in patients infected with HIV-1. EuroSIDA Study Group. *Lancet* 1998b; 352 (9142):1725-30.

Mocroft A, Youle M, Moore A et al. Reasons for modification and discontinuation of antiretrovirals: results from a single treatment centre. *Aids* 2001; 15 (2):185-94.

Molla A, Korneyeva M, Gao Q et al. Ordered accumulation of mutations in HIV protease confers resistance to ritonavir. *Nat Med* 1996; 2 (7):760-6.

Montaner JS, Reiss P, Cooper D et al. A randomized, double-blind trial comparing combinations of nevirapine, didanosine, and zidovudine for HIV-infected patients: the INCAS Trial. Italy, The Netherlands, Canada and Australia Study. *Jama* 1998; 279 (12):930-7.

Morgado MG, Sabino EC, Shpaer EG et al. V3 region polymorphisms in HIV-1 from Brazil: prevalence of subtype B strains divergent from North American/European prototype and detection of subtype F. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1994; 10 (5):569-76.

Neumann AU, Tubiana R, Calvez V et al. HIV-1 rebound during interruption of highly active antiretroviral therapy has no deleterious effect on reinitiated treatment. Comet Study Group. *Aids* 1999; 13 (6):677-83.

NIAID- National Institute of Allergy and Infectious Diseases. International HIV/AIDS Trials Finds Continuous Antiretroviral Therapy Superior to Episodic Therapy. 2006 Jan 18 [cited 2006 Feb 20]. Available from: <http://www.niaid.nih.gov>

Nuesch R, Ananworanich J, Sirivichayakul S et al. Development of HIV with drug resistance after CD4 cell count-guided structured treatment interruptions in patients treated with highly active antiretroviral therapy after dual-nucleoside analogue treatment. *Clin Infect Dis* 2005; 40 (5):728-34.

Palella FJ, Jr., Delaney KM, Moorman AC et al. Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigators. *N Engl J Med* 1998; 338 (13):853-60.

Paterson DL, Swindells S, Mohr J et al. Adherence to protease inhibitor therapy and outcomes in patients with HIV infection. *Ann Intern Med* 2000; 133 (1):21-30.

Perelson AS, Neumann AU, Markowitz M et al. HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time. *Science* 1996; 271 (5255):1582-6.

Peytavin G, Legrand M, Katlama C, et al. Benefits of treatment interruption (TI) in patients with multiple therapy failures, CD4 cells, 200/mm³ and RNA >50 000 cp/ml (GIGAHAART ANRS 097). In XIV International AIDS Conference. Barcelona, Spain; 2002: We PeB5887

Picard V, Angelini E, Maillard A et al. Comparison of genotypic and phenotypic resistance patterns of human immunodeficiency virus type 1

isolates from patients treated with stavudine and didanosine or zidovudine and lamivudine. *J Infect Dis* 2001; 184 (6):781-4.

Piketty CWL, Bachir-Cherif S, Assoumou L, et. The ANRS 116 SALTO study group. Time to HAART resume after structured treatment interruption is strongly associated with hiv dna level in pbmc at interruption: results of the anrs 116 SALTO trial. In *Int Conf AIDS*. Toronto, Canada; 2006: WeAb0205 (abst)

Pires IL, Soares MA, Speranza FA 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* 2004; 42 (1):426-30.

Potts KE, Kalish ML, Lott T et al. Genetic heterogeneity of the V3 region of the HIV-1 envelope glycoprotein in Brazil. Brazilian Collaborative AIDS Research Group. *Aids* 1993; 7 (9):1191-7.

Quigg M, Rebus S, France AJ et al. Mutations associated with zidovudine resistance in HIV-1 among recent seroconvertors. *Aids* 1997; 11 (6):835-6.

Recomendações para Terapia Anti-retroviral em adultos e adolescentes infectados pelo HIV. Brasília: Programa Nacional de DST e AIDS- Ministério da Saúde, 2004:8,9.

Recomendações para Terapia Anti-retroviral em adultos e adolescentes infectados pelo HIV. Brasília: Programa Nacional de DST e AIDS- Ministério da Saúde, 2006:14.

Renageno-Rede Nacional de Laboratórios de Genotipagem. Brasília: Programa Nacional de DST e AIDS- Ministério da Saúde; 2006 [citado em 11 out 2006] Disponível em: <http://www.aids.gov.br>

Richard N, Juntilla M, Abraha A et al. High prevalence of antiretroviral resistance in treated Ugandans infected with non-subtype B human immunodeficiency virus type 1. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2004; 20 (4):355-64.

Richman DD. Susceptibility to nucleoside analogues of zidovudine-resistant isolates of human immunodeficiency virus. *Am J Med* 1990; 88 (5B):8S-10S.

Richman DD, Havlir D, Corbeil J et al. Nevirapine resistance mutations of human immunodeficiency virus type 1 selected during therapy. *J Virol* 1994; 68 (3):1660-6.

Richman DD, Morton SC, Wrin T et al. The prevalence of antiretroviral drug resistance in the United States. *Aids* 2004; 18 (10):1393-401.

Roberts JD, Bebenek K, Kunkel TA. The accuracy of reverse transcriptase from HIV-1. *Science* 1988; 242 (4882):1171-3.

Roberts NA, Martin JA, Kinchington D et al. Rational design of peptide-based HIV proteinase inhibitors. *Science* 1990; 248 (4953):358-61.

Routy JP, Machouf N, Edwardes MD et al. Factors associated with a decrease in the prevalence of drug resistance in newly HIV-1 infected individuals in Montreal. *Aids* 2004; 18 (17):2305-12.

Sabino EC, Diaz RS, Brigido LF et al. Distribution of HIV-1 subtypes seen in an AIDS clinic in Sao Paulo City, Brazil. *Aids* 1996; 10 (13):1579-84.

Sabino EC, Shpaer EG, Morgado MG et al. Identification of human immunodeficiency virus type 1 envelope genes recombinant between subtypes B and F in two epidemiologically linked individuals from Brazil. *J Virol* 1994; 68 (10):6340-6.

Sarafianos SG, Das K, Clark AD, Jr. et al. Lamivudine (3TC) resistance in HIV-1 reverse transcriptase involves steric hindrance with beta-branched amino acids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999a; 96 (18):10027-32.

Sarafianos SG, Das K, Ding J et al. Touching the heart of HIV-1 drug resistance: the fingers close down on the dNTP at the polymerase active site. *Chem Biol* 1999b; 6 (5):R137-46.

Schapiro JM, Winters MA, Lawrence J et al. Clinical cross-resistance between the HIV-1 protease inhibitors saquinavir and indinavir and correlations with genotypic mutations. *Aids* 1999; 13 (3):359-65.

Schuurman R, Nijhuis M, van Leeuwen R et al. Rapid changes in human immunodeficiency virus type 1 RNA load and appearance of drug-resistant virus populations in persons treated with lamivudine (3TC). *J Infect Dis* 1995; 171 (6):1411-9.

Shafer RW. Genotypic testing for human immunodeficiency virus type 1 drug resistance. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15 (2):247-77.

Shafer RW, Winters MA, Jellinger RM et al. Zidovudine resistance reverse transcriptase mutations during didanosine monotherapy. *J Infect Dis* 1996; 174 (2):448-9.

Soares MA, Brindeiro RM, Tanuri A. Primary HIV-1 drug resistance in Brazil. *Aids* 2004; 18 Suppl 3:S9-13.

Stanford University. HIV Drug Resistance Database. EUA. 2006 [cited 2006 Nov]. Available from: <http://www.hivdb.stanford.edu/>

Staszewski S, Miller V, Sabin C et al. Determinants of sustainable CD4 lymphocyte count increases in response to antiretroviral therapy. *Aids* 1999; 13 (8):951-6.

Sucupira MC, Souza IE, Costa LJ et al. Antiretroviral treatment failure and HIV-1 genotypic resistance in Sao Paulo, Brazil. *Antivir Ther* 2001; 6 (4):263-4.

Tarwater PM, Parish M, Gallant JE. Prolonged treatment interruption after immunologic response to highly active antiretroviral therapy. *Clin Infect Dis* 2003; 37 (11):1541-8.

Tebas P, Henry K, Mondy K et al. Effect of prolonged discontinuation of successful antiretroviral therapy on CD4+ T cell decline in human immunodeficiency virus-infected patients: implications for intermittent therapeutic strategies. *J Infect Dis* 2002; 186 (6):851-4.

Tubiana R, Ghosn J, De-Sa M et al. Warning: antiretroviral treatment interruption could lead to an increased risk of HIV transmission. *Aids* 2002; 16 (7):1083-4.

UNAIDS. *Uniting the World Against AIDS*. In., Series *Uniting the World Against AIDS*. 2007 [cited 2007 Mar 13]. Available from: <http://www.unaids.org/en/Regions/Countries/Countries/brazil.asp>

Vazquez de Parga E, Rakhmanova A, Perez-Alvarez L et al. Analysis of drug resistance-associated mutations in treatment-naive individuals infected with different genetic forms of HIV-1 circulating in countries of the former Soviet Union. *J Med Virol* 2005; 77 (3):337-44.

Vella S, Giuliano M., Palmisano, L., et al. Iss-Part: a prospective, randomized, multi-center clinical trial of intermittent therapy in HIV+ subjects with persistent suppression of viral replication. In 10th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. Boston, Massachusetts; 2003: 66 (abst).

Verhofstede C, Wanzele FV, Van Der Gucht B et al. Interruption of reverse transcriptase inhibitors or a switch from reverse transcriptase to protease inhibitors resulted in a fast reappearance of virus strains with a reverse transcriptase inhibitor-sensitive genotype. *Aids* 1999; 13 (18):2541-6.

Wainberg MA, Friedland G. Public health implications of antiretroviral therapy and HIV drug resistance. *Jama* 1998; 279 (24):1977-83.

Walker B. Treatment interruption in primary HIV infection. In XIV International AIDS Conference. Barcelona, Spain; 2002:ThOrB 259 (abst).

Wensing AM, van de Vijver DA, Angarano G et al. Prevalence of drug-resistant HIV-1 variants in untreated individuals in Europe: implications for clinical management. *J Infect Dis* 2005; 192 (6):958-66.

Yerly S, Vora S, Rizzardì P et al. Acute HIV infection: impact on the spread of HIV and transmission of drug resistance. *Aids* 2001; 15 (17):2287-92.

Young B, Johnson S, Bahktiari M et al. Resistance mutations in protease and reverse transcriptase genes of human immunodeficiency virus type 1 isolates from patients with combination antiretroviral therapy failure. *J Infect Dis* 1998; 178 (5):1497-501.

Zhang L, Ramratnam B, Tenner-Racz K et al. Quantifying residual HIV-1 replication in patients receiving combination antiretroviral therapy. *N Engl J Med* 1999; 340 (21):1605-13.

Zhang YM, Imamichi H, Imamichi T et al. Drug resistance during indinavir therapy is caused by mutations in the protease gene and in its Gag substrate cleavage sites. *J Virol* 1997; 71 (9):6662-70.

ANEXO A

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DA
FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Instruções para preenchimento no verso)

I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME DO PACIENTE :.....
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M F
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO Nº APTO:
BAIRRO:..... CIDADE
CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)
2. RESPONSÁVEL LEGAL
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
DOCUMENTO DE IDENTIDADE : SEXO: M F
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO:..... Nº APTO:
BAIRRO:..... CIDADE:
CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)
-

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA : ANÁLISE DAS MUTAÇÕES DO VÍRUS HIV QUE GERAM RESISTÊNCIA AOS ANTI-RETROVIRAIS EM PACIENTES COM HISTÓRIA DE INTERRUPÇÃO TERAPÊUTICA.
2. PESQUISADORA: ERIKA MARIA DO NASCIMENTO KALMAR.
CARGO/FUNÇÃO: MÉDICA INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 86.192
UNIDADE DO HCFMUSP:
3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:
SEM RISCO RISCO MÍNIMO ~~X~~ RISCO MÉDIO
RISCO BAIXO RISCO MAIOR
- (probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo)
4. DURAÇÃO DA PESQUISA: DOIS ANOS.
-

III - REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA CONSIGNANDO:

1. Justificativa e os objetivos da pesquisa: Este estudo tem por finalidade avaliar o padrão de resistência do vírus HIV frente aos anti-retrovirais em pacientes que estão sem utilizar estes medicamentos há pelo menos seis meses.
 2. Procedimentos que serão utilizados e propósitos, incluindo a identificação dos procedimentos que são experimentais: Sua participação neste estudo implica em entrevista, coleta de sangue e revisão do seu prontuário médico. Entrevista: finalidade de levantar dados sócio-demográficos (cidades em que morou, anos de escolaridade), dados sobre suas práticas sexuais e riscos de infecção pelo HIV, sobre os medicamentos que você usa, doenças que já teve. Coleta de sangue: serão coletados 10 ml de sangue para realização de genotipagem do vírus HIV para sabermos a quais anti-retrovirais o seu vírus é sensível
 3. Desconfortos e riscos esperados: Estão ai incluídos dor pela punção e ocasionalmente formação de hematomas ou flebite (inflamação no local da picada). A coleta será feita por profissional capacitado de modo a minimizar os riscos inerentes ao procedimento.
 4. Benefícios que podem ser obtidos: Está a possibilidade de realizar exame de genotipagem do vírus HIV. O resultado irá para o seu prontuário.
 5. Procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para o indivíduo: Como benefício está a possibilidade de contribuir para o conhecimento do HIV quando este não está sob pressão dos medicamentos.
-

IV - ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA CONSIGNANDO:

1. Acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para eventuais dúvidas: Em caso de dúvidas ou informações sobre a pesquisa, basta entrar em contato com a Dra. Erika Kalmar no tel. 55 79 99 11 ramal 2038.
2. Liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência: O estudo não implica em riscos do ponto de vista clínico. Sua participação é voluntária, podendo seu consentimento ser retirado a qualquer momento, sem qualquer prejuízo ao seu tratamento.
3. Salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade: O estudo garante confidencialidade dos dados, e, em nenhum momento serão tornados públicos dados relacionados a sua identidade.
4. Disponibilidade de assistência no HCFMUSP, por eventuais danos à saúde, decorrentes da pesquisa: Não se enquadra no propósito da pesquisa, uma vez que não há riscos que possam necessitar de internação.
5. Viabilidade de indenização por eventuais danos à saúde decorrentes da pesquisa: Não se enquadra no propósito da pesquisa.

V. INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.

Se necessário entre em contato com Dra. Erika Kalmar tel 55 79 99 11 ramal 2038.

VI. OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES: Não necessárias.

VII - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa

São Paulo, de de 2002 .

assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal

assinatura do pesquisador
(carimbo ou nome Legível)

ANEXO B

Análise das mutações do vírus HIV que geram resistência aos anti-retrovirais em pacientes com história de interrupção terapêutica

Formulário 1: Entrevista com o paciente

Data da entrevista: ____ / ____ / ____

I. Dados do caso:

Dados do paciente:

1. Nome: _____

2. Prontuário: _____ 3. Data de nascimento: ____ / ____ / ____ 4. Sexo: M F

5. Cor: branca preta/parda amarela vermelha

6. Nome da mãe: _____

7. Até que ano escolar cursou? _____ ano do _____ grau.

*(considerar somente anos completos; para o grau considerar os seguintes códigos:
0 = analfabeto, 1 = primeiro, 2 = segundo, 3 = universitário).*

8. Ocupação atual: _____ 9. Gestante sim não não se aplica

10. Endereço: _____

Bairro: _____ Município: _____

Estado: _____ Telefone: (0__) _____ Cep: _____

Zona: urbana rural Morador de rua: sim não

11. Nos últimos 20 anos morou ou esteve em outras cidades nas quais tenha passado por alguma situação de risco para o HIV? sim não

Se sim, em que cidade foi e qual o período aproximado em lá permaneceu (*coloque "99" para mês ignorado*)

_____ Período: ____ / ____ / a ____ / ____

_____ Período: ____ / ____ / a ____ / ____

_____ Período: ____ / ____ / a ____ / ____

_____ Período: ____ / ____ / a ____ / ____

_____ Período: ____ / ____ / a ____ / ____

12. Nos últimos 20 anos, esteve detido(a)? sim não

Se sim, especifique local e período (*coloque "99" para mês ignorado*)

_____ / _____ / _____

_____ / _____ / _____

13. Autoriza contato: sim não

Endereço e telefone para contato (anote somente se for diferente do especificado acima):

Rua: _____

Bairro: _____ Município: _____

Estado: _____ Telefone: (0__) _____ CEP: _____

Contato também com: _____ Fone: _____

Grau de parentesco: _____

I. Dados Laboratoriais:

(Orientações: coloque "99" caso o mês seja desconhecido, porém registre o ano, mesmo que aproximado)

1. Quando foi seu primeiro teste anti-HIV positivo? Data (mês/ano): ____/____

2. Antes desse primeiro teste positivo, o sr(a). tinha feito algum teste que tivesse sido negativo?

1.sim 2.não 3.não quis responder 9.não sabe

3. Se sim, quando foi? ____/____ (mês/ano)

(caso haja mais de um teste negativo, transcreva somente o mais próximo da data do primeiro teste positivo)

II. Categoria de exposição:

A) As questões seguintes se referem ao período anterior à descoberta de sua soropositividade:

Para as questões de 1 a 4 utilize os códigos:

1. sim 2.não 3.não quis responder 4.não se aplica* 9.não sabe

(* caso o paciente não tenha mantido vida sexual ativa, nesse período).

Em primeiro lugar: gostaria de saber sobre seus parceiros sexuais:

1.O sr(a). teve relações sexuais desprotegidas com indivíduo sabidamente HIV positivo ou com Aids?

2. O sr(a) mantinha relações sexuais:

somente com mulheres somente com homens com homens e mulheres

3.manteve relações com algum profissional do sexo?

4.Seu parceiro (a):

mantinha relações sexuais só com homens tinha múltiplos parceiros

mantinha relações sexuais só com mulheres usava droga injetável

mantinha relações sexuais com homens e mulheres era hemofílico

já tinha recebido transfusão de sangue/derivados

5. Quantos parceiros sexuais o sr.(a) teve no ano anterior à descoberta de sua soropositividade:

nenhum somente 1 2 – 10 11-50 mais de 50 não quis responder

6. E nos 5 anos anteriores à descoberta, quantos parceiros teve (no total):

nenhum somente 1 2 – 10 11-50 mais de 50 não quis responder

Agora, as questões seguintes se referem a uma possível contaminação pelo sangue:

(utilize os seguintes códigos nas questões 7 a 10: 1.sim 2.não 3.não quis responder 9.não sabe)

7. O sr.(a) é hemofílico?

8. Fazia uso de droga injetável? 9. Se sim, partilhou seringa com alguém?

10. Havia recebido anteriormente transfusão de sangue ou derivados do sangue?

11. Se sim, onde e quando foi?

Data: _____ / _____ Município: _____ UF: _____

Instituição: _____

Data: _____ / _____ Município: _____ UF: _____

Instituição: _____

(Nas questões 12 e 13 utilize os códigos: 1.sim 2.não 3.não quis responder 4.não se aplica 9.não sabe)

(A questão 12 é somente para profissionais de saúde):

12. O sr(a) alguma vez já se acidentou com material biológico que pudesse estar contaminado pelo HIV (por exemplo, com seringa contaminada, ou sangue que espirrou em seu olho)?

13. O sr(a) enfrentou alguma outra situação, diferente das que foram colocadas nas questões anteriores, na qual você possa ter se contaminado com HIV?

14. Se sim, qual foi ela: _____

A) E neste último ano, o sr(a)

Para as questões 15 a 17, utilize os códigos:

(1.sim 2.não 3.não quis responder 4.não se aplica 9.não sabe)*

15. Usou droga injetável? 16. Caso use ou tenha usado, partilhou seringa?

17. Manteve relações sexuais desprotegidas?

18. Quantos parceiros sexuais teve, no último ano?

nenhum somente 1 2 – 10 11-50 mais de 50 não quero responder

I. Dados clínicos

1. Em relação às doenças e/ou condições associadas à Aids, o sr(a):

nunca apresentou doença e/ou condição associada à Aids.

já apresentou doença e/ou condição associada à Aids.

Se já apresentou, quais foram?

(assinale no quando abaixo as doenças e/ou condições que o paciente referir; coloque "99" para mês ignorado)

Doenças associadas à Aids:

Mês e ano do primeiro episódio

<input type="checkbox"/> Candidíase (esôfago, traquéia, brônquios e pulmão)	____/____
<input type="checkbox"/> Candidíase oral	____/____
<input type="checkbox"/> Câncer cervical invasivo	____/____
<input type="checkbox"/> Citomegalovirose (em local que não o olho, fígado, baço, linfonodos)	____/____
<input type="checkbox"/> Criptococose extra-pulmonar	____/____
<input type="checkbox"/> Criptosporidíase	____/____
<input type="checkbox"/> Doença por micobactéria (outra que não a tuberculose)	____/____
<input type="checkbox"/> Herpes simples muco-cutâneo (por um período superior a 1 mês)	____/____
<input type="checkbox"/> Herpes zoster	____/____
<input type="checkbox"/> Histoplasmose disseminada	____/____
<input type="checkbox"/> Isosporíase	____/____
<input type="checkbox"/> Leucoencefalopatia multifocal progressiva	____/____
<input type="checkbox"/> Leucoplasia pilosa	____/____
<input type="checkbox"/> Linfoma não-Hodgkin	____/____
<input type="checkbox"/> Linfoma primário do cérebro	____/____
<input type="checkbox"/> Neurotoxoplasmose	____/____
<input type="checkbox"/> Pneumonia (exceto PPC)	____/____
<input type="checkbox"/> pneumonia por <i>P. carinii</i>	____/____
<input type="checkbox"/> Retinite por citomegalovirus (CMV)	____/____
<input type="checkbox"/> Salmonelose	____/____
<input type="checkbox"/> Sarcoma de Kaposi	____/____
<input type="checkbox"/> Tuberculose extra-pulmonar	____/____
<input type="checkbox"/> Tuberculose pulmonar	____/____
<input type="checkbox"/> Tuberculose disseminada (dois ou mais sítios, ou isolamento em sangue)	____/____
<input type="checkbox"/> Tuberculose não especificada	____/____

Condições associadas à Aids:

<input type="checkbox"/> Disfunção do SNC	____/____
<input type="checkbox"/> Diarréia (por um período igual ou superior a 1 mês)	____/____
<input type="checkbox"/> Febre (maior ou igual a 38°C, por um período maior ou igual a 1 mês)	____/____
<input type="checkbox"/> Caquexia (ou perda de peso maior que 10% do peso normal do paciente)	____/____
<input type="checkbox"/> Astenia (por um período maior ou igual a 1 mês)	____/____
<input type="checkbox"/> Dermatite persistente.	____/____

- | | |
|--|---------------|
| <input type="checkbox"/> Anemia | _____ / _____ |
| <input type="checkbox"/> Linfopenia | _____ / _____ |
| <input type="checkbox"/> Trombocitopenia | _____ / _____ |
| <input type="checkbox"/> Tosse persistente | _____ / _____ |
| <input type="checkbox"/> Linfadenopatia | _____ / _____ |

(Para a questão 2, utilize os códigos: 1.sim 2.não 3.não quis responder 4.não se aplica* 9.não sabe)
 (* caso o paciente não tenha mantido vida sexual ativa, nesse período)

1. Já teve (ou tem) alguma doença sexualmente transmissível como:

- sífilis HPV
 hepatite (Especifique: hepatite B hepatite C)

2. Atualmente o sr(a) está:

- sem nenhum sintoma/doença
 com sintomas/doença:

Especifique: _____

I. Terapêutica anti-retroviral (ARV):

1. esta, atualmente, fazendo uso de ARV? (utilize os códigos: 1.sim 2.não)

2.De 1 a 10 (sendo 10 a nota máxima), que nota o sr(a) daria para a sua regularidade (de drogas e de doses) na tomada dos medicamentos anti-retrovirais prescritos pelo seu médico?

3. Já fez uso anteriormente de medicamento anti-retroviral?

(Em caso de resposta afirmativa, passe para a questão 8):

(Caso paciente diga que não sabe, forneça-lhe os nomes de alguns dos principais anti-retrovirais; se houver reconhecimento de algum que já tenha sido utilizado, passe para a questão 8)

(Em caso de resposta negativa, considere encerrada a entrevista).

4.Tente se recordar, agora, das drogas que o sr(a). já tenha utilizado, e qual o período:

(coloque data aproximada de início e suspensão, referida pelo paciente; coloque "99" para mês ignorado, mas especifique o ano.
 Utilize as siglas das drogas, especificadas abaixo).

<u>Drogas</u>	<u>Início</u>	<u>Suspensão</u>
_____	____/____	____/____
_____	____/____	____/____
_____	____/____	____/____
_____	____/____	____/____
_____	____/____	____/____
_____	____/____	____/____
_____	____/____	____/____
_____	____/____	____/____
_____	____/____	____/____
_____	____/____	____/____
_____	____/____	____/____
_____	____/____	____/____
_____	____/____	____/____
_____	____/____	____/____
_____	____/____	____/____
_____	____/____	____/____
_____	____/____	____/____

**sigla das drogas:*

- | | |
|---|---------------------------------------|
| AZT (Zidovudina, Retrovir®) | DDI (Didanosina – Videx®) |
| DDC (Zalcitabina, Hivid®) | 3TC (Lamivudine – Epivir®) |
| D4T (Stavudine, Zeritavir®) | IDV (Indinavir – Crixivan®) |
| SQV (Saquinavir-invirase®, Fortovase®) | RTV (Ritonavir – Norvir®) |
| NFV (Nelfinavir – Viracept®) | NVP (Nevirapina – Viramune®) |
| DLV (Delavirdina – Rescriptor®) | EFV (Efavirenz – Sustiva®, Stocrin®) |
| APV (Amprenavir – Agenerase®) | ABV (Abacavir – Ziagen®) |
| ABT 378 (Lopinavir/Ritonavir – Kaletra®) | |

Porque o seu esquema anti-retroviral foi suspenso? 1.sim 2.não

Decisão do médico

Decisão do paciente

Porque foi suspenso? _____

Já interrompeu o tratamento outras vezes? Quantas: _____

Quando:

Razões:

ANEXO C

Análise das mutações do vírus HIV que geram resistência aos anti-retrovirais em pacientes com história de interrupção terapêutica

Formulário 2: coleta de dados de prontuário

Data: ____/____/____

I. Dados do caso:

Dados do paciente:

1. Nome do paciente: _____
2. Prontuário: _____
3. Data de Diagnóstico de Aids: ____/____/____
4. Critério(S) de Diagnóstico: () Rio de Janeiro/Caracas () CDC Modificado () Cd4
5. Paciente sem Critérios de Definição de Caso: ()

II. Categoria de exposição:

SEXUAL:

- | | |
|---|---|
| 1. Relações sexuais: | 2. Relações sexuais com indivíduo sabidamente HIV + Aids: |
| <input type="checkbox"/> 1. Só com homens 4. não se aplica | <input type="checkbox"/> 1. sim 9. ignorado |
| 2. só com mulheres 9. ignorado | 2. não |
| 3. com homens e mulheres | 3. não se aplica |

-
- | | | | |
|--|--|--------|-------------|
| 3. Informações sobre parceria sexual: | 1. Sim | 2. Não | 9. Ignorado |
| <input type="checkbox"/> parceiro(a) que mantém relações sexuais só com homens | <input type="checkbox"/> parceiro(a) com múltiplos parceiros | | |
| <input type="checkbox"/> parceiro(a) que mantém relações sexuais só com mulheres | <input type="checkbox"/> parceiro(a) que usa droga injetável | | |
| <input type="checkbox"/> parceiro(a) que mantém relações sexuais com homens e mulheres | | | |
| <input type="checkbox"/> parceiro(a) que recebeu transfusão de sangue/derivados | | | |
| <input type="checkbox"/> parceiro(a) hemofílico | | | |

SANGUÍNEO:

- | | | | |
|--|---------------------------------------|--|-------------|
| | 1. Sim | 2. Não | 9. Ignorado |
| 4. <input type="checkbox"/> uso de droga injetável | 5. <input type="checkbox"/> hemofilia | 6. <input type="checkbox"/> história de transfusão de sangue/derivados | data: _____ |

IV. Dados clínicos:

1. Em relação às doenças e/ou condições associadas à Aids, o paciente:

- 1.nunca apresentou doença e/ou condição associada à Aids.
2.já apresentou doença e/ou condição associada à Aids.
3.nada consta no prontuário

Caso já tenha apresentado, especifique , assinalando no quadro:

Doenças associadas à Aids

Data do primeiro episódio

- | | |
|---|----------------|
| () Candidíase (esôfago, traquéia, brônquios e pulmão) | ____/____/____ |
| () Candidíase oral | ____/____/____ |
| () Câncer cervical invasivo | ____/____/____ |
| () Citomegalovirose (em local que não o olho, fígado, baço, linfonodos | ____/____/____ |
| () Criptococose extra-pulmonar | ____/____/____ |
| () Criptosporidíase | ____/____/____ |
| () Doença por micobactéria (outra que não a tuberculose) | ____/____/____ |
| () Herpes simples muco-Cutâneo (por um período superior a 1mês) | ____/____/____ |
| () Herpes zoster | ____/____/____ |
| () Histoplasmose disseminada | ____/____/____ |
| () Isosporíase | ____/____/____ |
| () Leucoencefalopatia multifocal progressiva | ____/____/____ |
| () Leucoplasia pilosa | ____/____/____ |
| () Linfoma não-Hodgkin | ____/____/____ |
| () Linfoma primário do cérebro | ____/____/____ |
| () Neurotoxoplasmose | ____/____/____ |
| () Pneumonia (exceto PPC) | ____/____/____ |
| () Pneumonia por <i>P. carinii</i> | ____/____/____ |
| () Retinite por citomegalovírus | ____/____/____ |
| () Salmonelose | ____/____/____ |
| () Sarcoma de Kaposi | ____/____/____ |
| () Tuberculose extrapulmonar | ____/____/____ |
| () Tuberculose pulmonar cavitária | ____/____/____ |
| () Tuberculose pulmonar não cavitária | ____/____/____ |
| () Tuberculose disseminada (dois ou mais sítios, ou isolamento em sangue | ____/____/____ |
| () Tuberculose não especificada | ____/____/____ |

* *Sigla das drogas:*

AZT (Zidovudina, Retrovir®)

DDC (Zalcitabina, Hivid®)

D4T (Stavudine, Zeritavir®)

SQV (Saquinavir – Invirase®, Fortovase®)

NFV (Nelfinavir – Viracept®)

DLV (Delavirdina – Rescriptor®)

APV (Amprenavir – Agenerase®)

ABT 378 (Lopinavir/Ritonavir – Kaletra®)

DDI (Didanosina – Videx®)

3TC (Lamivudine – Epivir®)

IDV (Indinavir – Crixivan®)

RTV (Ritonavir – Norvir®)

NVP (Nevirapina – Viramune®)

EFV (Efavirenz – Sustina®, Stocrin®)

ABV (Abacavir – Ziagen®)

** *para aderência, considerar anotação do médico no prontuário, referente à utilização, pelo paciente, do esquema prescrito*

*** *ou anote somente a droga, para pacientes que fizeram uso de monoterapia.*

Causas para a suspensão do anti-retroviral:

1.Sim

2.Não

Decisão médica

Diabetes mellitus

Lipodistrofia

Hiperlipidemia

Pancreatite

Acidose láctica

Toxicidade hematológica

Miopatia

Neuropatia

Diarréia

Síndrome dispéptica

Evento adverso

qual: _____

Outras _____

Decisão do próprio paciente

Já interrompeu o tratamento outras vezes:

quantas vezes: _____

razoes: _____