



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Botucatu



**Avaliação do perfil de mutações e resistência aos inibidores de
transcriptase reversa e protease em variantes HIV presentes
em pacientes coinfectados pelo VHC**

Andressa Alves de Almeida Cruz

**Botucatu
2014**

Andressa Alves de Almeida Cruz

**Avaliação do perfil de mutações e resistência aos inibidores de
transcriptase reversa e protease em variantes HIV presentes
em pacientes coinfectados pelo VHC**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual Paulista
“Julio de Mesquita Filho”, Campus de
Botucatu, para obtenção do título de Mestre

Orientadora: Dra. Rejane Maria Tommasini Grotto

**Botucatu
2014**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE - CRB 8/5651

Cruz, Andressa Alves de Almeida.

Avaliação do perfil de mutações e resistência aos inibidores de transcriptase reversa e protease em variantes HIV presentes em pacientes coinfectados pelo VHC / Andressa Alves de Almeida Cruz. - Botucatu, 2014

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Rejane Maria Tommasini Grotto

Capes: 20804008

1. HIV (Virus). 2. Coinfecção. 3. Mutação (Biologia). 4. Agentes antirretrovirais.

Palavras-chave: Antirretrovirais; Coinfecção HIV/VHC; Mutação; Resistência.

Dedicatoria

Dedico aos meus pais Wilson e Dalva e a minha irmã Vanessa pelo incentivo e apoio a todas as minhas escolhas; a “tia” Rose por acreditar em meus sonhos e vibrar com minhas conquistas; a Karina pela confiança, generosidade e carinho.

Agradecimientos

A Deus, por me acompanhar em cada passo e tornar possível a realização deste projeto.

A minha orientadora Dra. Rejane Maria T. Grotto, pela orientação, apoio, dedicação, confiança e oportunidade.

A Dra. Maria Inês de Moura C. Pardini, pelo incentivo, conselhos e oportunidade.

Ao coordenador do Programa de Pós-Graduação, Dr. Paulo Eduardo Machado e, aos demais professores pela disponibilidade, dedicação e atenção.

Ao Dr. Alexandre Naime Barbosa pelo auxílio com os dados clínicos, pacientes e prontuários, além da atenção, dedicação e sugestões.

Ao Hospital Dia “Domingos Alves Meira”, na pessoa do Dr. Alexandre N. Barbosa, Farmacêutica Vânia e demais enfermeiros pelo apoio e parceria.

Ao Instituto Adolfo Lutz - IAL/Marília, por autorizar os afastamentos necessários ao cumprimento dos créditos.

Aos funcionários, pós-graduandos e estagiários do Laboratório de Biologia Molecular (rotina e pesquisa): Maércio, Regina, Sarita, Aline, Bianca, Francine, Natália, Natalia P., Aline G., Renata, Flávia e Viviam pelo auxílio com as amostras, críticas e sugestões.

A Aline Aki e Sarita Barreto pela montagem dos cases, e a Natália Picelli pelo auxílio com as amostras.

A Vivian e a Natalia Cantão pela disponibilidade e auxílios com toda a documentação enviada ao CEP, além da amizade.

A Janisse, secretaria do Programa, pelo auxílio e amizade.

Aos amigos do mestrado: Turma de Jaú (Nádia, Aline, Paulo, Ana Paula, Ana Claudina e Elisângela); Mariana, Fernando, Ari, Emerson, Rafaela e todos os demais colegas da turma de 2012 e 2013.

A Mariana Sartori pelas dicas, palpites e amizade.

As “minhas” estagiárias do IAL, amigas de hoje e sempre: Talita, Natália e Renata pela torcida e incentivo.

A Karina N. Biasotto pelo companheirismo, incentivo, dedicação e apoio.

A todos os meus sinceros agradecimentos!

*“Mesmo quando tudo parece desabar,
cabe a mim decidir entre rir ou chorar, ir ou
ficar, desistir ou lutar; porque descobri, no
caminho incerto da vida, que o mais
importante é decidir”*

Cora Coralina

A coinfeção HIV/VHC tornou-se um importante problema de saúde pública devido à possibilidade desses vírus agirem sinergicamente, acelerando a progressão da doença hepática relacionada ao VHC e podendo favorecer a proliferação do HIV. Apesar de estabelecido que a alta variabilidade genética do HIV gera mutações, conferindo ao vírus a capacidade de responder rapidamente as alterações da pressão seletiva exercida pelo sistema imunológico ou pela terapia antirretroviral (TARV), não é conhecido se a presença do VHC pode favorecer a emergência de variantes do HIV resistentes. Assim, este estudo teve como objetivo avaliar o perfil de mutações de resistência a inibidores de transcriptase reversa: Inibidores de Transcriptase Reversa análogo nucleosídeo ou nucleotídeo (ITRNs), Inibidores de Transcriptase Reversa não análogo nucleosídeo (ITRNNs); e inibidores de protease (IPs) em variantes de HIV circulantes em indivíduos coinfectados pelo VHC. Foram incluídos 19 pacientes coinfectados pelos vírus HIV/VHC, maiores de 18 anos, com carga viral plasmática do HIV de pelo menos 1.000 cópias de RNA/mL, atendidos no Ambulatório de Gastroenterologia da Faculdade de Medicina de Botucatu e, no Hospital dia “Domingos Alves Meira”. A genotipagem e o sequenciamento foram realizados no Laboratório de Biologia Molecular do Hemocentro de Botucatu, Faculdade de Medicina, UNESP, utilizando o *Trugene HIV-1 Genotyping Kit* (Siemens Healthcare Diagnostics, Inc. Tarrytown, NY, USA). Foram observados dois subtipos do HIV-1, B e F, sendo o subtipo B o mais freqüente, 94,74%. Para o VHC foram observados os genótipos 1 (94,74%) e 3 (5,26%). Todos os pacientes apresentaram mutações de resistência as classes avaliadas, tendo maior freqüência mutações associadas aos ITRNs como M184V em 57,89%. As mutações associadas aos ITRNNs mais freqüentes foram a K103N e G190A, presentes em 21,05% das amostras. As mutações principais associadas aos IPs mais freqüentes foram a M46I, I54V e V82A com 15,78% cada. Na análise da resistência a antirretrovirais (ARVs), os ITRNs 3TC/FTC e os ITRNNs EFV/NVP foram os que apresentaram maior resistência total com 57,8% e 52,6%, respectivamente. Os IPs DRV/r e TPV/r, foram os que apresentaram melhor desempenho, com 0% e 5,2% de resistência total, respectivamente. Altas taxas de sensibilidade aos IPs demonstram um importante potencial de uso desta classe, podendo anteceder o uso de drogas destinadas a terapias de resgate.

Abstract

HIV/HCV coinfection has become an important public health problem due to the possibility of these viruses act synergistically, which can accelerate the progression of liver disease related to HCV and may favor the spread of HIV. It is established that the high genetic variability of HIV generates mutations, giving the virus the ability to respond quickly to changes in selective pressure exerted by the immune system or by antiretroviral therapy (ART). It is not known whether the presence of HCV can promote the emergence of resistant variants of HIV. Thus, this study aimed to evaluate the profile of resistance mutations to classes of reverse transcriptase inhibitors: nucleoside and nucleotide analogue Reverse Transcriptase Inhibitors (NRTIs), non-nucleoside analogue Reverse Transcriptase Inhibitors (NNRTIs) and protease inhibitors (PIs), in circulating HIV variants in HCV coinfecting individuals. In this study were included 19 HIV/HCV coinfecting patients, over 18, with plasma HIV viral load of at least 1,000 RNA copies/mL. These patients were treated at the Ambulatory of Gastroenterology of the Faculty of Medicine of Botucatu and at the Day-Hospital "Domingos Alves Meira". Genotyping and sequencing were performed at the Laboratory of Molecular Biology of the Blood Center of Botucatu, Faculty of Medicine, UNESP, using the *Trugene HIV-1 Genotyping Kit* (Siemens Healthcare Diagnostics, Inc. Tarrytown, NY, USA). Two subtypes of HIV-1, B and F, were observed, but the subtype B was observed more often, 94.74%. It was observed HCV genotypes 1 (94.74%) and 3 (5.26%). All patients presented resistance mutations to the evaluated classes, and the mutations associated to NRTIs as M184V were observed more often (57.89%). The most common mutations associated to NNRTIs were K103N and G190A, present in 21.05% of the samples. The main mutations associated to PIs more frequent were M46I, I54V and V82A, with 15.78% each. In the analysis of resistance to antiretrovirals (ARVs), the NRTIs 3TC/FTC and NNRTIs EFV/NVP presented higher total resistance with 57.8% and 52.6%, respectively. PIs DRV/r and TPV/r presented the best performance, with 0% and 5.2% of total resistance, respectively. The very high sensitivity to PIs demonstrates an important potential use of this class, which may precede the use of drugs designed to rescue therapies.

Figura 1: Evolução clínica da infecção pelo HIV-1: contagem de linfócitos T CD4 (células/mL de sangue) e níveis de RNA do HIV no plasma (cópias de RNA/mL de plasma) ao longo da infecção (Fonte: adaptado de FAUCI et al., 1996)	26
Figura 2: Ilustração que representa um linfócito T (vermelho) sendo infectado pelo vírus HIV (azul) (Fonte: GALLO, 2003).....	26
Figura 3: Estrutura do HIV evidenciando as principais estruturas, proteínas e enzimas envolvidas na replicação viral (Fonte: adaptado de Robinson, 2002)	27
Figura 4: Esquema representativo do genoma do HIV	28
Figura 5: Ciclo de vida do HIV. Principais mecanismos, proteínas e enzimas envolvidas na replicação viral (Fonte: ABBAS et al., 2008).....	29
Figura 6: Ilustração da estrutura do Vírus da Hepatite C (VHC), evidenciando RNA viral (vermelho), envelope com glicoproteínas e nucleocapsídeo (<i>core</i>) (Fonte: adaptado de James, 2001)	40
Figura 7: Perfil de resistência aos ITRNs	64
Figura 8: Perfil de resistência aos ITRNNS.....	66
Figura 9: Perfil de resistência aos IPs	67

Tabela 1: Características demográficas e clínicas dos pacientes coinfectados HIV/VHC incluídos no estudo (n=19).....	52
Tabela 2: Características virológicas dos pacientes coinfectados HIV/VHC incluídos no estudo (n=19)	53
Tabela 3: Frequência das mutações de resistência nas regiões genômicas codificadoras da transcriptase reversa e protease do HIV dos pacientes coinfectados HIV/VHC incluídos no estudo (N=19).....	54
Tabela 4: Frequência da presença de mutações de resistência por classe de droga em pacientes monoinfectados HIV e pacientes coinfectados HIV/ VHC	55
Tabela 5: Frequência absoluta e relativa das principais mutações relacionadas aos ITRNs, ITRNNs e IPs nos grupos monoinfectados HIV e coinfectados HIV/VHC	63
Tabela 6: Frequências absolutas e relativas da resistência genotípica aos ARVs dos vírus circulantes em pacientes monoinfectados pelo HIV (n=386) e pacientes coinfectados HIV/VHC (n=19)	68

Lista de Abreviaturas e Símbolos

HIV: Vírus da Imunodeficiência Humana

OMS: Organização Mundial de Saúde

CDC: Centro de controle e prevenção de doenças

T CD4: Linfócitos T CD4+

RNA: Ácido ribonucléico

gp: glicoproteína

gag: *group-specific antigen* (antígeno de grupo específico)

pol: polymerase (polimerase)

env: envelope

LTRs: *Long Terminal Repeat* (sequências terminais longas)

MA: Matriz protéica

CA: Capsídeo

NC: Nucleocapsídeo

PR: Protease

TR: Transcriptase reversa

IN: Integrase

SU: glicoproteína de superfície

TM: glicoproteína transmembrana

DNA: Ácido desoxirribonucléico

TARV: Terapia antirretroviral

ARV: Antirretroviral

IP: Inibidor de protease

ITRN: Inibidor de transcriptase reversa análogo de nucleosídeo

ITRNN: Inibidor de transcriptase reversa não análogo de nucleosídeo

IF: inibidor de fusão

ICR: Inibidor de co-receptor

II: Inibidor de integrase

APV: Amprenavir

ATZ: Atazanavir

DRV: Darunavir

FPV: Fosamprenavir

IDV: Indinavir

LPV: Lopinavir

NFV: Nelfinavir

RTV: Ritonavir

SQV: Saquinovir

TPV: Tripanavir

ABC: Abacavir

ddl: Didanosina

FTC: Emtricitabina

3TC: Lamivudina

d4T: Estavudina

ddC: Zalcitabina

AZT: Zidovudina

TDF: Tenofovir

ETR: Etravirina

DLV: Delavirdina

EFV: Efavirenz

NEV: Nevirapina

RPV: Rilpivirina

T-20: Enfuvirtida

MRV: Maraviroque

RAL: Raltegravir

EVG: Elvitegravir

HAART: *Highly Active Antiretroviral Therapy* (Terapia Antirretroviral Altamente Ativa)

CV: Carga viral

TAM: *Thymidine analog mutations* (mutações associadas aos análogos de timidina)

VHC: Vírus da Hepatite C

HCC: Carcinoma hepatocelular

RVS: Resposta virológica sustentada

PEG-IFN: Interferon peguilado

DAA: Agentes antivirais diretos

ESLD: Doença hepática em estágio final

INTRODUÇÃO	24
OBJETIVOS	43
CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	45
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	50
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	70
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72
APENDICE E ANEXOS	86

A aids é considerada uma das maiores pandemias da humanidade. Desde o primeiro relato até os dias atuais estima-se, aproximadamente, dois milhões de óbitos e milhares de pessoas vivendo com o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) (QUINN, 2008).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) (WHO, 2012a) estima a ocorrência de 2,5 milhões de novas infecções em 2011. Há, atualmente, 34 milhões de pessoas infectadas pelo HIV em todo mundo sendo que apenas metade delas tem conhecimento de sua soropositividade.

O Brasil apresenta, aproximadamente, um terço dos casos de HIV da América Latina, com cerca de 490.000 pessoas vivendo com o vírus (UNAIDS, 2012). Desde o início da epidemia até junho de 2012, o Brasil registrava 656.701 casos. Em 2011, foram notificados 38.776 casos da doença e a taxa de incidência de 20,2 casos por 100 mil habitantes, com uma prevalência estável em 0,6% desde 2004 (BRASIL, 2012a; BRASIL, 2012b).

A evolução clínica da infecção pelo HIV é caracterizada pela fase aguda nas primeiras semanas da infecção, seguida por um longo período assintomático, de meses a anos, e pela fase sintomática, que caracteriza o caso aids (Figura 1) (KOUP et al., 1994). Contudo, a presença de variantes mutantes relacionados ao mecanismo de escape ao sistema imunológico, torna as fases da evolução da doença distinta em cada indivíduo (HELBERT e BREUER, 2000).

Considerando as condições clínicas associadas a aids o centro de controle e prevenção de doenças (CDC) utiliza um sistema de classificação para os pacientes infectados que categoriza condições clínicas em A, B ou C, associadas a contagem de linfócitos T CD4 em 1, 2 ou 3. Desta forma, os pacientes infectados são incluídos na categoria A quando assintomáticos, com linfadenopatia generalizada e/ou com infecção aguda; B quando não estão incluídos nem em A nem em C e, C quando apresentam condições indicativas de aids. Quanto à classificação segundo o número de linfócitos T CD4, os pacientes são incluídos em 1 quando apresentam contagens de linfócitos T

CD4 superior 500 células/mm³; em 2 quando o nível de linfócitos T CD4 se encontra entre 200 e 499 células/mm³ e, em 3 quando a contagem de linfócitos T CD4 é inferior a 200 células/mm³ (CDC, 1992).

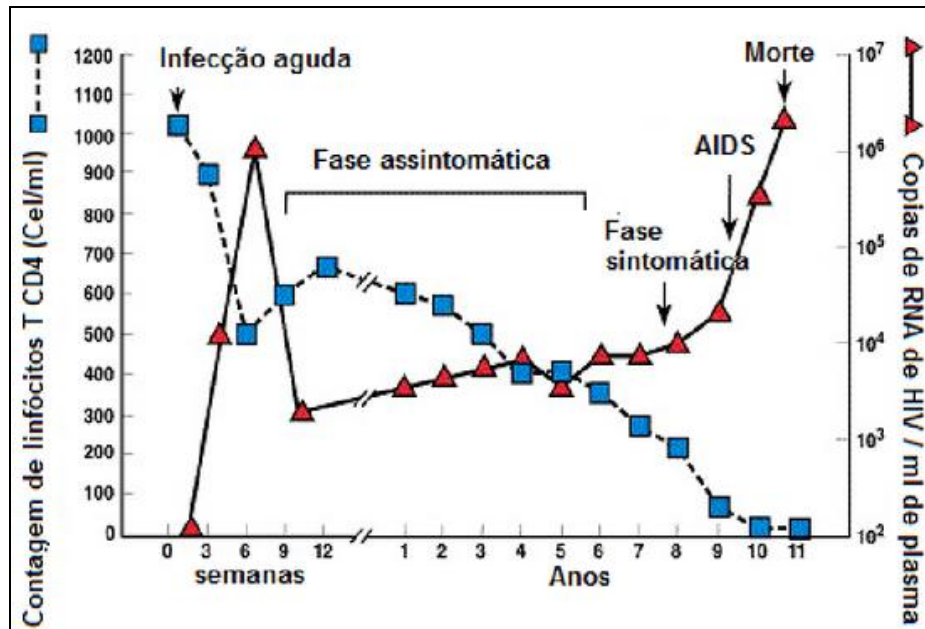


Figura 1: Evolução clínica da infecção pelo HIV: contagem de linfócitos T CD4 (células/mL de sangue) e níveis de RNA do HIV no plasma (cópias de RNA/mL de plasma) ao longo da infecção (Fonte: adaptado de FAUCI et al., 1996).

O HIV é um retrovírus da família **Lentiviridae**, associado a infecções persistentes, que infectam os linfócitos T (Figura 2) e outras células que expressam receptores e correceptores para o vírus (ANDREWS e KOUP, 1996).

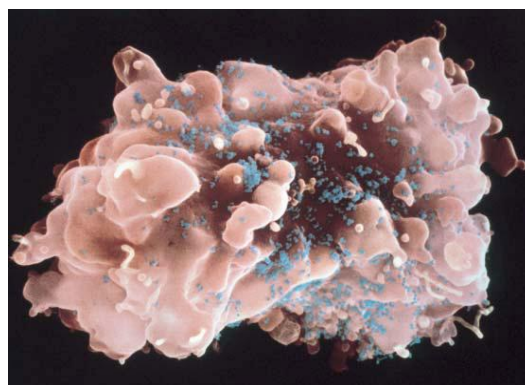


Figura 2: Ilustração que representa um linfócito T (vermelho) sendo infectado pelo vírus HIV (azul) (Fonte: GALLO, 2003).

Com genoma constituído por duas fitas de RNA idênticas de 9,2 kb, de polaridade positiva, o HIV é composto de capsídeo e nucleocapsídeo protéico que envolvem além do material genético viral, as enzimas transcriptase reversa, integrase e protease (Figura 3). Além disso, o capsídeo é envolto por um envelope lipoglicoprotéico com glicoproteínas virais (gp120 e gp41) responsáveis pela interação com receptores celulares do hospedeiro (CHAN et al., 1997).

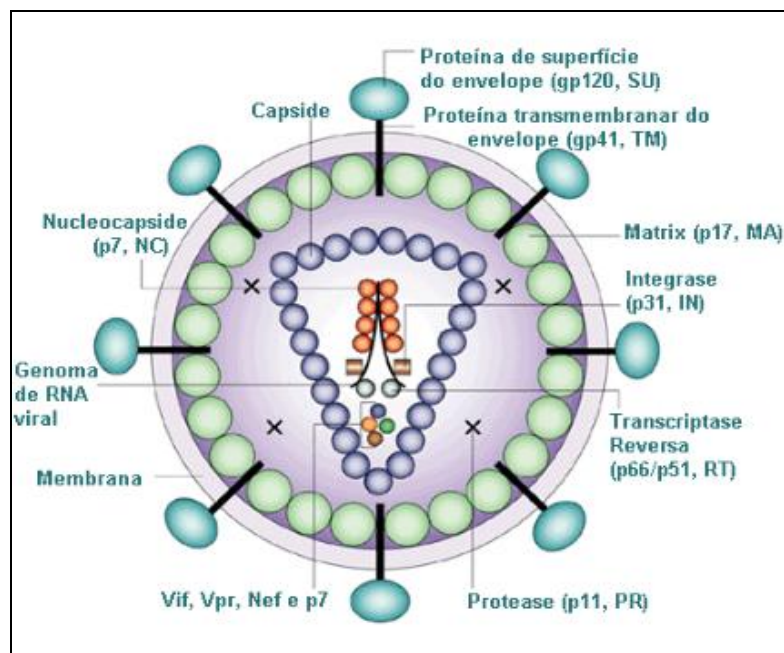


Figura 3: Estrutura do HIV evidenciando as principais estruturas, proteínas e enzimas envolvidas na replicação viral. (Fonte: Adaptado de Robinson, 2002).

O genoma viral (Figura 4) é constituído por três genes estruturais *gag* (*group-specific antigen*), *pol* (*polymerase*) e *env* (envelope) (CULLEN, 1991) além de genes acessórios e regulatórios. O genoma do HIV é, ainda, flanqueado por sequências terminais longas, as LTRs (*Long Terminal Repeat*).

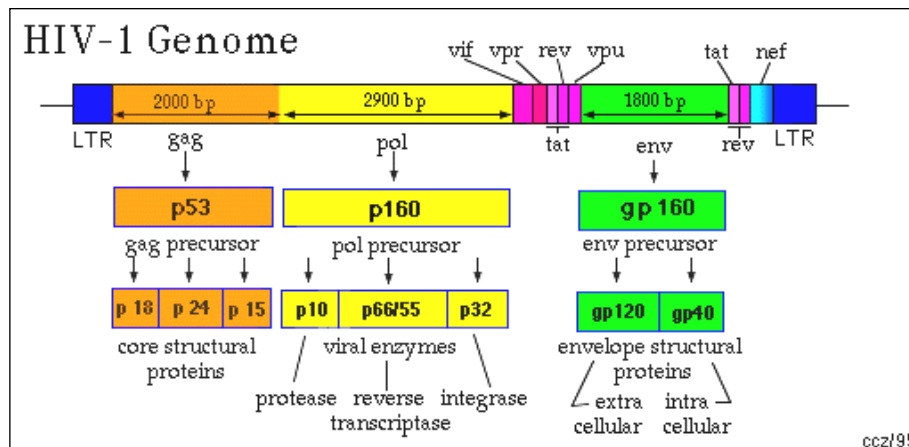


Figura 4: Esquema representativo do genoma do HIV. LTR, repetições terminais longas; *gag* codifica as proteínas virais p18, p24 e p15; *pol* codifica a protease (p10), transcriptase reversa (p66/55) e integrase (p32); *env* codifica glicoproteínas do envelope viral (gp120 e gp41); *tat* codifica proteínas acessórias; e *rev* codifica proteínas regulatórias (Adaptado de <http://www.yale.edu/bio243/HIV/genome.html>).

Produtos do gene *gag* incluem proteínas da matriz (MA), capsídeo (CA), e nucleocapsídeo (NC). As enzimas protease (PR), transcriptase reversa (TR), e integrase (IN) são produtos do gene de *pol*. As glicoproteínas de superfície (SU ou gp120) e transmembranas (TM ou gp41) do envelope são codificadas pelo gene *env* (BERGER et al., 1999).

As proteínas codificadas no genoma do HIV apresentam diferentes funções no ciclo replicativo viral (Figura 5). O processo de infecção inicia-se com a ligação da gp120 do envelope viral com a molécula de superfície celular CD4. O CD4 está presente em abundância na superfície dos linfócitos T imaturos, bem como na superfície de linfócitos maduros circulantes, macrófagos e células dendríticas (HASELTINE, 1991). Esta interação inicial provoca mudanças conformacionais na gp120, que expõe a terceira região variável (V3) a qual se liga ao correceptor CCR5 e/ou CXCR4. Assim, para a infecção além da expressão do CD4 a célula hospedeira também deve expressar os receptores de quimiocinas CCR5 e/ou CXCR4, os quais funcionam como correceptores para o vírus (HELBERT e BREUER, 2000). Esta segunda interação conduz a mudanças na gp41, que promove a fusão do envelope viral e membrana da célula alvo (BERGER et al., 1999; WAHEED e FREED, 2012).

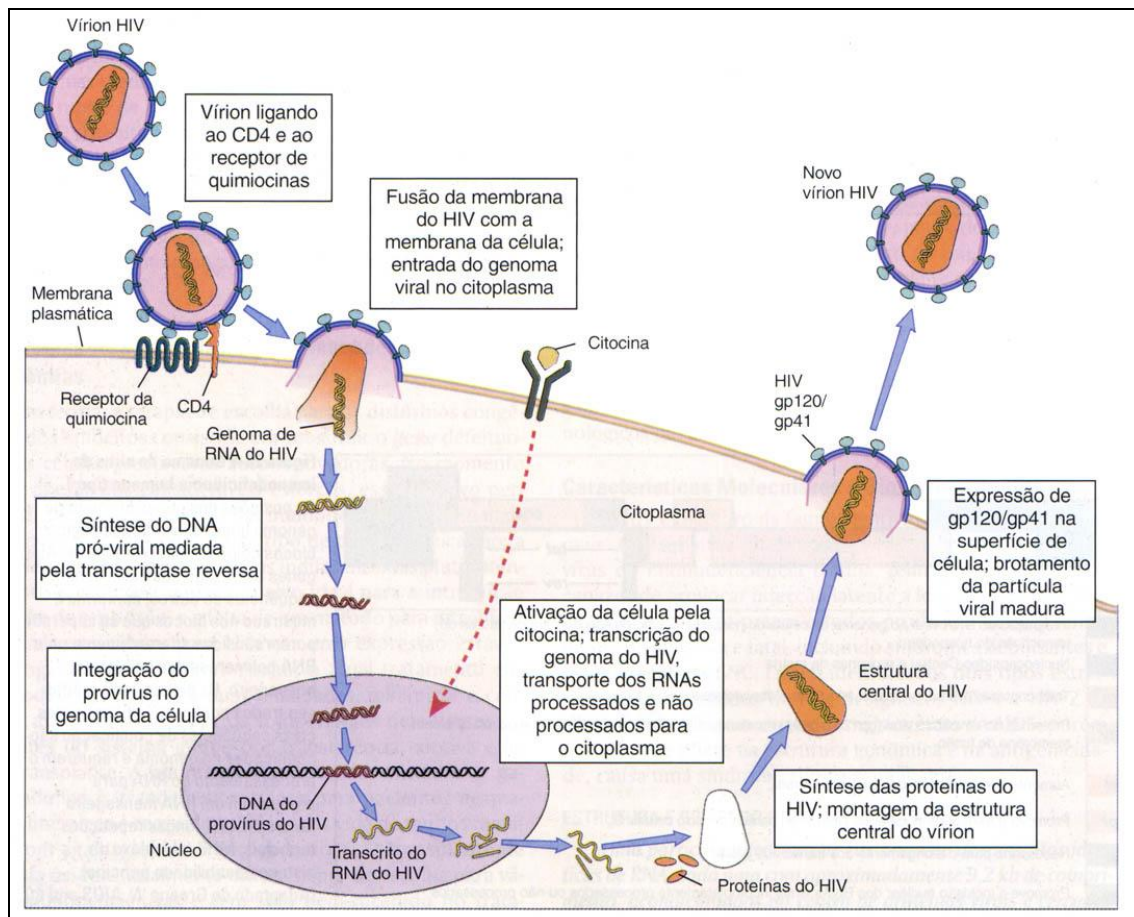


Figura 5: Ciclo de vida do HIV. Principais mecanismos, proteínas e enzimas envolvidas na replicação viral (Fonte: ABBAS et al., 2008).

Depois da entrada na célula-alvo, ocorre o processo de transcrição reversa mediado pela enzima TR (RABSON, 1990). O DNA viral resultante deste processo é direcionado ao núcleo celular, onde sofre integração ao cromossomo da célula hospedeira processo catalisado pela enzima IN (FREED, 1998).

Uma vez integrado, o DNA viral (próvirus) permanece associado ao material genético da célula hospedeira de forma que o DNA proviral é replicado juntamente como DNA celular, durante a divisão celular. Quando a célula está ativada o provírus funciona como molde para a transcrição de RNAs virais (FREED, 1998; CRAIGIE e BUSHMAN, 2012).

Entre os eventos que se seguem encontram-se a síntese e transporte de glicoproteínas do envelope pela via secretora. Precursores *gag* e *gag-pol* são

sintetizados e transportados para a membrana plasmática. Durante ou depois do transporte, o precursor *gag* se associa a duas cópias do genoma de RNA viral de fita simples que interage com o precursor *gag-pol*, formando estruturas densas que revestem a face interna da membrana plasmática (FREED, 1998).

A fase de brotamento é conduzida pelo complexo de proteína *gag* que induz a curvatura da membrana, conduzindo à formação de um broto. Durante o brotamento, as glicoproteínas virais *env* são incorporadas e é completada a fase de brotamento com a partícula completamente exteriorizada (FREED, 1998).

Durante ou imediatamente após o brotamento, a PR viral cliva as proteínas precursoras *gag* e *gag-pol*. A PR leva a clivagem e condensação do núcleocapsídeo, gerando partículas virais maduras infecciosas capazes de iniciar nova infecção (FREED, 1998).

Nesta etapa do ciclo replicativo partículas virais são lançadas na circulação de indivíduos infectados e podem ser quantificadas pelos testes de carga viral (CLERICI et al., 1996).

O HIV apresenta alta variabilidade genética e, até o momento dois tipos de HIV já foram identificados, HIV-1 e HIV-2, sendo o HIV-1 dividido em três grupos M (*major*), O (*outlier*) e N (*new*) e, o grupo M ainda subdividido em nove subtipos (A, B, C, D, F, G, H, J e K) e formas recombinantes circulatórias (CRFs) (ROBERTSON et al., 2000; HEMELAAR, 2012).

O grupo M do HIV-1 é responsável pela pandemia global (cerca de 33 milhões de infectados), sendo o subtipo C predominante na África subsaariana e sudeste asiático. O grupo O provoca algumas dezenas de milhares de infecções na África Centro-Ocidental, o grupo N encontrado em Camarões, assim como, o grupo P que foi recentemente identificado em dois indivíduos deste mesmo país (HEMELAAR, 2012).

No Brasil predomina o subtipo B do grupo M. No entanto, um número crescente de não-B e infecções por variantes recombinantes vem sendo identificadas. Dentro do território brasileiro, diferentes padrões de distribuição

de subtipos foram relatados entre as suas cinco regiões geográficas (MONTEIRO et al., 2009).

Esta alta variabilidade genética viral se deve a elevada taxa de replicação viral que conduz a um grande número de mutações a cada ciclo replicativo e, a ausência de atividade de reparo da TR (NOWAK, 1992; SABINO, 1998; REQUEJO, 2006). Essas mutações conferem ao vírus a capacidade de responder rapidamente as alterações da pressão seletiva exercida pelo sistema imunológico (CLAVEL et al., 1989) ou pelo tratamento antirretroviral (TARV) (PINTO e STRUCHINER, 2006).

A terapêutica antirretroviral (TARV) na infecção pelo HIV bem como o tratamento das infecções oportunistas que emergem devido à debilitação progressiva do sistema imunológico, à medida que a infecção progride vem sendo um problema complexo nos dias atuais (BRASIL, 2008).

Os antirretrovirais (ARVs) atuam nas diferentes etapas do ciclo replicativo do HIV-1, bloqueando a ligação, entrada na célula hospedeira, replicação e maturação viral (FAUCI, 1988; HASELTINE, 1991; HUTCHINSON, 2001).

A TARV tem o objetivo de suprimir a replicação do HIV utilizando diferentes classes de medicamentos (DE CLERCQ, 2009). Atualmente existem 25 antirretrovirais aprovados os quais são divididos em seis classes, conforme o alvo molecular: inibidores de protease (IPs), inibidores de transcriptase reversa análogos de nucleosídeos ou nucleotídeos (ITRNs) e não análogos de nucleosídeos (ITRNNs), inibidores de fusão (IF), inibidores de correceptor (ICR) e inibidores de integrase (II) (SHAFFER e SCHAPIRO, 2008).

A alta afinidade ao sítio catalítico da protease confere aos IPs a capacidade de inibição da atividade enzimática proteolítica, por competição ao substrato natural, gerando partículas imaturas não infectadas e supressão da replicação viral (POMMIER et al., 2005; DE CLERCQ, 2007).

Dez IPs estão atualmente aprovados: amprenavir (APV, Agenerase), atazanavir (ATZ), darunavir (TMC114), fosamprenavir (FPV), indinavir (IDV),

lopinavir (LPV), nelfinavir (NFV), ritonavir (RTV), saquinavir (SQV) e tipranavir (TPV) (ARTS e HAZUDA, 2012). O RTV é utilizado exclusivamente para elevar a farmacocinética (indicado por /r) (SHAFFER e SCHAPIRO, 2008).

Os ITRNs são medicamentos estruturalmente muito semelhantes aos nucleotídeos verdadeiros, sendo o AZT e o d4T análogos a timidina; o 3TC e o FTC análogos a citosina; o ddI e o TDF análogos a adenosina e o ABC análogo a guanosina (DIAZ, 2011). Estes falsos nucleotídeos são incorporados a cadeia promovendo o término da cadeia de DNA viral em formação, permitindo que enzimas celulares destruam as partículas virais (ARTS e HAZUDA, 2012).

Atualmente, existem oito ITRNs aprovados pela FDA: abacavir (ABC), didanosina (ddI), emtricitabina (FTC), lamivudina (3TC), estavudina (d4T), zalcitabina (ddC), zidovudina (AZT), Tenofovir disoproxil fumarato (TDF) (ARTS e HAZUDA, 2012).

A TR ainda pode receber a ligação, não competitiva, de um ITRNN causando uma alteração alostérica na enzima que resulta na inibição da replicação viral. Atualmente, existem cinco ITRNNs aprovados: etravirina (ETV), delavirdina (DLV), efavirenz (EFV), nevirapina (NVP), rilpivirina (RPV) e vários em desenvolvimento (ARTS e HAZUDA, 2012).

Os inibidores de fusão atuam inibindo a gp41 e, conseqüentemente a fusão do envelope viral à célula hospedeira. O único IF aprovado atualmente é a enfuvirtida (T20 ou ENF) (SHAFFER e SCHAPIRO, 2008).

Assim como o IF, apenas um ICR foi licenciado para uso clínico, o maraviroque (MRV) que atua como antagonista ao CCR5, impedindo a ligação da glicoproteína viral gp120 ao correceptor CCR5, impossibilitando a entrada do vírus na célula (DE CLERQ, 2009). No entanto, a utilização deste medicamento está vinculada ao teste de tropismo, já que só apresenta utilidade clínica se o vírus utilizar o correceptor CCR5. Nenhuma atividade é observada em vírus que utilizam o CXCR4 (BRASIL, 2013).

O II inibe a ação da integrase. O medicamento raltegravir (RAL) é o único aprovado atualmente pelo FDA (DE CLERQ, 2009). No entanto, outros

inibidores de integrase, incluindo elvitegravir (EVG) estão em estudos clínicos (ARTS e HAZUDA, 2012).

Atualmente, a terapia tripla conhecida como terapia antirretroviral altamente ativa, do inglês, *Highly Active Antiretroviral Therapy* (HAART), é padrão para tratamento. A terapia inicial deve sempre incluir combinações de três drogas: dois ITRNs associados a um ITRNN ou a um IP reforçado com RTV (IP/r) (CARR, 2003; POMMIER et al., 2005; BRASIL, 2008).

Embora a HAART possua uma considerável atividade antirretroviral, a durabilidade da supressão viral é muitas vezes limitada por várias razões, incluindo mutações de resistência, toxicidade das drogas e as coinfeções que podem comprometer a adesão necessária para manter a eficácia da HAART (CARR, 2003).

Apesar do tratamento com HAART se associar a um rápido declínio da carga viral (CV), emergência de variantes resistentes pode conduzir a falha terapêutica (PENNING, 2012).

A resistência aos ARVs é um mecanismo de seleção natural. Desta forma, a pressão seletiva do meio ambiente em que o vírus vive seleciona variantes mais adaptadas a este meio, e estas prevalecerão na presença dos ARVs. Assim, o vírus pode desenvolver grupos de mutações específicas selecionadas por determinados ARVs (DIAZ, 2011).

As mutações podem ser substituições, inserções ou deleções, podendo envolver um ou mais nucleotídeos. As mutações por substituições são pontuais, resultando na substituição de um único nucleotídeo. Quando ocorrem na porção codificante do gene podem criar códons prematuros de parada, resultando na expressão de um polipeptídeo truncado e fenótipo mutante. Em regiões não codificantes, podem alterar sequências regulatórias funcionais, levando ao aumento ou diminuição da expressão gênica (WALKER, 1999).

Mutações por inserções ou deleções decorrem da adição ou remoção de um ou mais nucleotídeos, respectivamente. Quando ocorrem em regiões codificantes e envolvendo múltiplos de três nucleotídeos podem resultar na

produção de polipeptídeos de comprimento incorreto. Quando não envolvem três nucleotídeos resultarão em mutações com deslocamento do quadro de leitura. Isso altera efetivamente o código, prevenindo a expressão de uma proteína funcional. Tanto inserções como deleções podem também afetar a expressão de determinado gene, se alterarem sequências regulatórias associadas ao gene (WALKER, 1999).

Apesar dos avanços significativos obtidos na terapêutica antirretroviral a seleção de variantes resistentes ainda constitui um obstáculo ao sucesso terapêutico. Além da resistência que aparece como consequência da pressão seletiva do esquema terapêutico que conduz à emergência de variantes resistentes a determinadas drogas (resistência secundária), deve-se, também, considerar a resistência primária, que ocorre devido à transmissão de variantes previamente selecionadas e resistentes, comprometendo o sucesso terapêutico de indivíduos infectados em tratamento e/ou não tratados (YERLY et al., 1999).

Mutações de resistência podem afetar o *fitness* viral uma vez que atingem genes de papel fundamental no ciclo replicativo do HIV. Mutações compensatórias podem conduzir a recuperação do *fitness*, além de constituírem mutações que se somam e, podem comprometer a utilização futura de outras drogas, pelo desenvolvimento de resistência cruzada (LIU; SHAFER, 2006; VAN MAARSEVEEN et al., 2006).

Desta forma, o conhecimento das mutações de resistência aos ARVs disponíveis, em especial os de primeira e segunda escolha para o tratamento, contribuem para a eleição de uma terapêutica de resgate mais eficiente e segura.

Diferentes mutações já foram associadas à resistência aos antirretrovirais em cada uma das classes de medicamentos. Na classe dos IPs as mutações de resistência levam a uma alteração na conformação tridimensional da PR reduzindo o tempo de ligação entre os IPs e a PR, favorecendo a ligação do substrato natural do vírus; ou ainda diminuindo o tempo em que a PR leva para clivar seu substrato natural, reduzindo o *fitness* viral (DIAZ, 2011).

As mutações aos IPs são classificadas em principais (ou primárias) e acessórias (ou secundárias). Na PR, mutações principais geralmente ocorrem em regiões próximas ao sítio ativo podendo alterar a polaridade, flexibilidade e forma do sítio ativo. Alterações mais frequentes envolvem substituições por aminoácidos com cadeias laterais que conferem a mesma polaridade, no entanto com tamanho maior ou menor a molécula original interferindo, assim, na geometria do sítio ativo (SANCHES et al., 2007).

Os códons diretamente envolvidos em resistência podem se localizar próximos ao sítio de ligação do substrato como 23, 30, 32, 47, 48, 50, 82 e 84; no *flap* como o 46 e 54 ou, ainda, na região interna da protease que incluem o 76, 66 e 90 (SHAFER e SCHAPIRO, 2008).

Com relação à resistência aos IPs múltiplas mutações geralmente são necessárias para o HIV desenvolver resistência clinicamente significativa a esta classe de medicamentos (CONDRA et al., 1996). Mutações acessórias compensam o prejuízo da replicação gerado pelas mutações de resistência, melhorando a capacidade de replicação do vírus ou; em combinação com outras mutações principais reduzem a susceptibilidade ao IP (SHAFER e SCHAPIRO, 2008; JOHNSON et al., 2006).

Um perfil mutacional pode ser desenvolvido a partir do uso dos diferentes ARVs, com destaque aos IPs. Os IPs tendem a selecionar mutações específicas principais: D30N, M46I/L, I50L/V, V82A/F/S/T, I84V, L90M e acessórias L10F/I/R/V; K20M/R; L24I/V; L33F; M36I; I47V; G48V; F53L; I54L/M/V; L63P; A71T/V; G73S; N88D/S (SHAFER e SCHAPIRO, 2008; JOHNSON et al., 2006). As mutações da protease nos códons 46, 54, 82 e 90 estão entre as mais frequentes (SHAFER e SCHAPIRO, 2008).

Veras e colaboradores (2007) encontraram o perfil de mutação I50V (principal) e L63P (acessória) associadas à resistência aos IPs no Distrito Federal/ DF. Esses resultados diferem dos dados da região Nordeste do Brasil e Rio de Janeiro/RJ que apontam uma associação do códon 90 (principal) e 63 (acessório) associados à resistência aos IPs nestas regiões (CAVALCANTI et al., 2007; COUTO-FERNANDES et al., 2005). Na região de Botucatu/SP, o

perfil mostra-se distinto com as mutações principais I54V e V82A e as acessórias L10I/V e A71I/V/T sendo as mais frequentes (MUNHOZ, 2011).

Estes resultados demonstram a heterogeneidade no perfil de mutação de resistência e, a importância dos estudos regionais que caracterizam o perfil de mutações de resistência nas diferentes regiões, o que pode ser extremamente útil quando se estabelece um protocolo terapêutico.

Mutações associadas à redução da sensibilidade aos ITRNs podem estar presentes nos códons 41, 43, 44, 62, 65, 67, 69, 70, 74, 75, 77, 115, 116, 118, 151, 184, 208, 210, 215, 218, 219, 221 e 228 da TR (TOLEDO, 2009) e, podem ser classificadas em mutações associadas aos timidínicos (TAMs) ou não.

Os principais mecanismos de resistência dos ITRNs têm sido classificados em duas categorias: (a) Mutações que propiciam um aumento na habilidade da TR do HIV em discriminar os ITRNs dos substratos naturais, como a M184V, que conduz a resistência ao 3TC e FTC; (b) Mutações que aumentam a habilidade da enzima em eliminar o ITRN, ligado ao final da cadeia, impedindo seu alongamento, por um mecanismo de “excisão”. Frequentemente mutações análogas de timidina (TAM) elevam a excisão do AZT, embora mutações como 65R, 74V, 184V diminuam esta excisão, revertendo a resistência adquirida (SHAFER e SCHAPIRO, 2008; DIAZ, 2011).

Entre as mutações de resistência aos ITRNs a M184V é a mais comum, com elevado nível de resistência a 3TC e FTC, resistência de baixo nível ao ddI e ABC e, aumento da susceptibilidade à AZT, d4T e TDF nas terapias de resgate que incluam 3TC ou FTC, causando uma pequena diminuição na capacidade replicativa do HIV (WHITCOMB et al., 2003; SHAFER e SCHAPIRO, 2008).

As mutações da transcriptase reversa nas posições 41, 67, 215 e 219 são TAMs e associam-se à utilização dos análogos AZT e d4T (SHAFER, 2009). As TAMs possuem duas vias mutacionais, sendo a via mutacional I relacionada a mutações M41L, L210W e T215Y gerando níveis altos de

resistência aos análogos de timidina e, resistência cruzada ao ABC, ddI e TDF. Na via TAM II estão as mutações D67N, K70R, T215F e K219Q/E, conferindo susceptibilidade reduzida a todos os ITRNs e resistência cruzada (WHITCOMB et al., 2003). Esta resistência encontra-se aumentada quanto maior for o acúmulo de TAMs (WHITCOMB et al., 2002).

Ainda nos ITRNs encontramos mutações de resistência multi-nucleosídeo e mutações acessórias não polimórficas podendo o primeiro conferir falência de toda uma classe (SHAFFER e SCHAPIRO, 2008).

Mutações pontuais no sítio alostérico de ligação do farmaco à enzima são responsáveis pela emergência de variantes resistentes aos ITRNs. A afinidade do mesmo sítio aos diferentes ITRNs torna comum a possibilidade de resistência cruzada de modo que uma única mutação pode provocar resistência a toda a classe (ADAMS et al., 2010).

As mutações de resistência aos ITRNs podem ser classificadas em: (a) primárias, causando alto nível de resistência a um ou mais ITRNs e aparecem no início da terapia; (b) secundárias, ocorrendo geralmente em combinação com mutações primárias; (c) não polimórficas, podendo ocorrer isoladamente ou em combinação com outras mutações de resistência aos ITRNs, diminuindo a susceptibilidade; e (d) polimórficas acessórias, responsáveis pela modulação dos efeitos de diferentes mutações (SHAFFER e SCHAPIRO, 2008).

As mutações K103N e Y181C são as mais comumente presentes, conferindo resistência aos ITRNs (SHAFFER e SCHAPIRO, 2008).

Os IF, ICR e II são classificados como medicamentos de terceira linha, empregados em terapia de resgate, seguindo protocolos de recomendações do Ministério da Saúde. Assim, a terapia com estas classes de ARVs exige que os pacientes tenham falha virológica confirmada, teste de genotipagem recente e resistência a pelo menos um antirretroviral de cada uma das três classes (ITRN, ITRN e IP) (BRASIL, 2013).

Mutações nos códons 36 a 45 da gp41, responsável pela ligação do IF, interferem na susceptibilidade e, conforme o número de mutações, torna o paciente resistente a esta classe (SHAFER e SCHAPIRO, 2008).

O surgimento de variantes com tropismo ao vírus X4 ou tropismo duplo (R5/X4), assim como inserções ou deleções de aminoácidos da alça V3 da gp120 são os principais fatores associados à resistência ao ICR maraviroque (SHAFER e SCHAPIRO, 2008).

A resistência aos II se associa a mutações no sítio de ligação da enzima. Mutações secundárias também podem diminuir a susceptibilidade do medicamento (SHAFER e SCHAPIRO, 2008).

Embora a progressão da infecção e a terapêutica efetiva se encontre na dependência das variantes virais presentes no paciente infectado pelo HIV outros fatores podem, também, ser importantes nesta avaliação como a presença de coinfeções. Atualmente muitos pacientes infectados com HIV apresentam também, infecção pelo Vírus da Hepatite C (VHC). Na população mundial, aproximadamente 40% das pessoas que são infectadas pelo HIV, são coinfectadas pelo VHC, devido à similaridade nas rotas de transmissão (DIETERICH et al., 1999). No Brasil estima-se que 30 - 50% dos indivíduos infectados pelo HIV apresentem coinfeção com VHC (BABIK e HOLODNIY, 2003). Esta porcentagem pode variar dependendo dos diferentes grupos de risco, sendo elevada entre usuários de drogas injetáveis e hemofílicos (ZYLBERBERG; POL, 1996; DODIG; TAVILL, 2001).

A coinfeção HIV/VHC tornou-se um importante problema de saúde pública devido à possibilidade desses vírus agirem sinergicamente, acelerando a progressão da doença hepática relacionada ao VHC (DIETERICH et al., 1999).

O VHC é uma das principais causas de hepatite crônica, cirrose hepática e carcinoma hepatocelular (HCC) em todo o mundo, constituindo um grave problema de saúde pública (STRAUSS, 2001; MORADPOUR et al., 2007).

Atualmente, estima-se que 180 milhões de pessoas estão infectadas com o VHC em todo o mundo (KIM e CHUNG, 2009).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO, 2012b), todos os anos, 3-4 milhões de pessoas são infectadas com o VHC. Cerca de 150 milhões de pessoas estão cronicamente infectadas e em risco de desenvolver cirrose hepática e/ou HCC. Mais de 350 mil pessoas morrem de doenças hepáticas relacionadas com ao VHC anualmente.

Entre 1999 a 2011 foram notificados no Brasil 82.041 novos casos de VHC, sendo que 55.222 ocorreram na região Sudeste e 18.307 na região Sul, totalizando aproximadamente 90% dos casos confirmados no país. As taxas de incidência mais elevadas também se concentram nessas regiões. Enquanto o país, em 2010, registrou incidência de 5,4 casos confirmados para hepatite C, a região Sudeste apresentou 8,1 e a Sul apresentou 9,4 casos (BRASIL, 2012c).

Enquanto 20-50% dos pacientes com hepatite aguda alcançam resolução espontânea, entre 50% e 80% dos indivíduos desenvolvem infecção crônica. Entre eles, aproximadamente 20% desenvolvem cirrose e, destes, 6% descompensam em doença hepática em estágio final (ESLD) e, um adicional de 4% desenvolve HCC (THOMAS; SEEFF, 2005).

Apesar dos pacientes coinfectados possuírem três vezes mais chance de progressão para cirrose do que os pacientes mono infectados com VHC, com progressão de 33% em menos de 20 anos (OPERSKALSKI e KOVACS, 2011), a influência do VHC na progressão do HIV e a extensão desta relação tem sido debatida e, ainda é uma questão mal resolvida (ANDREONI et al., 2012).

Estudo realizado por Soriano e colaboradores (2004), sugere que o VHC atue como um cofator para a evolução da infecção HIV/Aids, podendo acelerar a queda das células T CD4 e/ou induzir estas a proliferarem no tecido hepático, facilitando a replicação do HIV. Além disto, estes mecanismos podem aumentar os níveis dos dois vírus no paciente coinfectado.

Embora estudos demonstrem redução da morbidade e mortalidade em indivíduos coinfectados em tratamento com HAART, patologias relacionadas ao fígado representam uma das principais causas de morte nesta população. Estas doenças incluem fibrose, cirrose e ESLD (OPERSKALSKI e KOVACS, 2011). O ELSL está associado como uma das principais causas de mortalidade intra-hospitalar entre os pacientes infectados pelo HIV (ANDREONI et al., 2012).

Classificado na família *Flaviviridae*, o VHC mede de 55 a 65nm de diâmetro e, sua estrutura consiste em um envelope lipídico, no qual se encontram as glicoproteínas virais E1 e E2, um capsídeo protéico que envolve o genoma viral constituído por um ácido ribonucleico (RNA) linear, de fita simples, com polaridade positiva e aproximadamente 9500 nucleotídeos (SIMMONDS et al., 2005) (Figura 6).

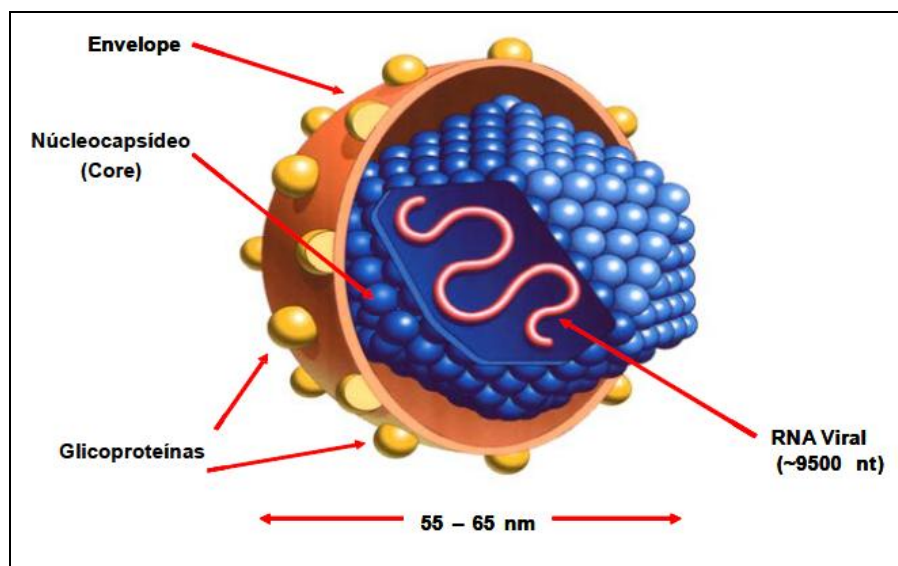


Figura 6: Ilustração da estrutura do Vírus da Hepatite C (VHC), evidenciando RNA viral (vermelho), envelope com glicoproteínas e nucleocapsídeo (*core*). (Fonte: adaptado de James, 2001).

O genoma viral do VHC possui duas regiões não traduzidas nas extremidades 5' e 3' (LINDERBACH; RICE, 2001). Estas regiões apresentam pouca diversidade entre os diferentes isolados virais, cerca de 90% de similaridade, sendo essenciais no processo de tradução de poliproteínas e na replicação do genoma viral (BUKH et al., 1992).

O VHC apresenta ampla heterogeneidade genética. A comparação de sequências nucleotídicas de diferentes isolados demonstra a existência de pelo menos seis grupos geneticamente diferentes (1-6) cuja variação de nucleotídeos do genoma completo nos diferentes grupos está entre 25 - 35% e, a frequência de mutações é variável ao longo do genoma. Os grupos são constituídos por vários subtipos denominados por letras minúsculas (a, b, c, etc.) (SIMMONDS et al., 2004) com variabilidade nucleotídica de 15% a 20% entre eles (PAWLOTSKY, 2004). Apesar de poucos relatados na literatura, o genótipo 7a foi descrito por MURPHY e colaboradores em 2007.

As *quasispecies* podem estar presentes desde início da infecção ou surgir no decorrer da mesma, como mecanismo de adaptação e escape as defesas do organismo (NAITO et al., 1995). Esta capacidade parece facilitar a evolução da infecção aguda para a crônica, condicionar a evolução da doença hepática, explicar a resistência às terapêuticas antivirais e tornar muito difícil o desenvolvimento de vacinas (SIMMONDS et al., 2005; SEEFF, 2009).

A patogenicidade do VHC é principalmente decorrente do dano causado à célula hepática e da persistência viral. Esses mecanismos podem envolver tanto modificações virais como fatores dependentes do hospedeiro, incluindo imunossupressão ao VHC, proteção de células infectadas pelo VHC da morte celular apoptótica ou mutação genética de domínios imunogênicos do VHC (WANG et al., 1992).

O objetivo da terapêutica antiviral é a obtenção de resposta virológica sustentada (RVS) através de uma eliminação prolongada do vírus, o que é alcançado quando o RNA do VHC permanecer não detectável por seis meses após o fim do tratamento. O principal tratamento do VHC é o interferon peguilado alfa e ribavirina. Dois PEG-IFN estão disponíveis: PEG-IFN α -2b (PEG-Intron ®, Merck) e PEG-IFN α -2a (Pegasys ®, Roche) (MAUSS et al., 2013).

Em 2011, foram aprovados os primeiros agentes antivirais diretos (DAA) para pacientes com VHC genótipo 1. Dois inibidores da protease do VHC (IP) boceprevir (Victrelis ®, Merck) e telaprevir (Incivek ®, Vertex; INCIVO®,

Johnson & Johnson) demonstraram melhorar as taxas de RVS em até 75% em pacientes VHC g1. No entanto, ambos os IPs requerem combinação com PEG-IFN + RBV para evitar o surgimento de resistência a drogas. Ambos, boceprevir (BOC) e telaprevir (TLV) podem ser combinados com PEG-IFN α -2a ou PEG-IFN- α 2b (MAUSS et al., 2013).

Para as coinfeções ao HIV, incluindo o VHC, combinações de terapias são amplamente utilizadas trazendo benefícios como redução de resistência a drogas e de seus efeitos colaterais. No entanto, apesar do grande número de possíveis combinações, é importante identificar as drogas com maior eficácia e sinergia para obtenção de resultados favoráveis (TAN et al., 2012).

O tratamento para o VHC em pacientes coinfectados com HIV é menos eficaz devido a disfunção imune, fibrose avançada, esteatose severa, viremia do VHC elevada, menor eliminação do VHC nas fases iniciais da terapia, recidivas freqüentes, modificação e interrupção de drogas devido a efeitos adversos e menor adesão (SORIANO et al. 2004). Quanto ao HIV, apesar do potencial aumentado para o risco de fibrose devido a alta toxicidade do HAART, o benefício do tratamento é muito superior aos riscos observados (ANTONUCCI et al., 2003).

Atualmente, os estudos sobre resistência e mutações vêm sendo conduzidos em pacientes monoinfectados pelo HIV. No entanto, pouco se conhece sobre o perfil de mutações de resistência em indivíduos coinfectados pelo HIV e VHC.

Assim, é bem conhecido que a presença dos dois vírus no paciente infectado conduz a um pior prognóstico e, a presença do VHC pode favorecer a proliferação do HIV. No entanto, não é conhecido se a presença do VHC pode favorecer a emergência de variantes do HIV resistentes às drogas nestes pacientes.

Desta forma, estudos relacionados com mutações de resistência a HAART em pacientes coinfectados ao VHC são importantes para inferir sobre perfil de variantes e, avaliar o sucesso terapêutico da HAART nestes pacientes.

Geral

- Avaliar o perfil de mutações de resistência aos inibidores de transcriptase reversa e inibidores de protease em variantes de HIV circulantes em indivíduos coinfectados com o VHC.

Específicos

- Relacionar os esquemas terapêuticos empregados para tratamento do HIV ao perfil de mutação de resistência encontrado;
- Comparar o perfil de mutações de resistência nos pacientes coinfectados e monoinfectados pelo HIV.

CASUÍSTICA

Foram incluídos neste estudo 19 pacientes coinfectados pelos vírus HIV/VHC, maiores de 18 anos, atendidos no Ambulatório de Gastroenterologia da Faculdade de Medicina de Botucatu e, no Hospital dia “Domingos Alves Meira”. Os critérios de inclusão foram carga viral plasmática do HIV com pelo menos 1.000 cópias de RNA/mL, sorologia anti-VHC reagente e, RNA do VHC detectável por ocasião do diagnóstico. Foram excluídos pacientes que apresentaram qualquer outra doença hepática, gestantes e pacientes com idade inferior a 18 anos.

A amostra utilizada para execução deste trabalho foi o material excedente da coleta de sangue realizada por ocasião da realização do exame de carga viral, teste de rotina para acompanhamento da infecção pelo HIV, o qual foi armazenado no Laboratório de Biologia Molecular do Hemocentro de Botucatu, Faculdade de Medicina, UNESP. De forma que, todos os pacientes incluídos neste estudo apresentavam solicitação médica para execução do teste de carga viral para o HIV.

O grupo controle foi constituído por uma população monoinfectada pelo HIV do estudo de Munhoz e colaboradores (2011).

MÉTODOLOGIA

Processamento das amostras

A coleta das amostras foi realizada por profissional devidamente habilitado do setor de coleta do Hospital das Clínicas da Faculdade de

Medicina de Botucatu ou do Hospital Dia “Domingos Alves Meira” seguindo todo o procedimento operacional padrão dos referidos setores.

Segundo protocolo da rotina laboratorial do Laboratório de Biologia Molecular do Hemocentro de Botucatu, Faculdade de Medicina, UNESP, as amostras de sangue venoso foram coletadas em tubo do tipo *Vacutainer*® (*Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA*) contendo 1,5 mg/mL do anticoagulante ácido etilenodiaminotetracético (EDTA). O plasma foi separado mediante centrifugação a 1312xg, por 15 minutos e armazenado em dois microtubos do tipo eppendorf (*AxygenScientific, Union City, CA, USA*) de 1,5mL, os quais são estocados a -70°C até o momento da utilização.

Extração de RNA, Amplificação e Sequenciamento

RNA viral plasmático foi utilizado para genotipagem do HIV pela tecnologia Trugene HIV-1 (*TruGene HIV-1 genotyping Kit - Siemens Healthcare Diagnostics, Inc. Tarrytown, NY, USA*), segundo as especificações do fabricante.

Utilizou-se o *QIAamp Viral RNA mini kit* (*Qiagen Inc., CA*) para a extração do RNA viral a partir do plasma do paciente. A amplificação da região genômica *pol* do HIV foi realizada por RT-PCR, utilizando o kit comercial *Trugene HIV-1 Genotyping Kit* (*Siemens Healthcare Diagnostics, Inc. Tarrytown, NY, USA*), com *primers* específicos capazes de ampliar o gene completo da protease e os primeiros 250 códons da transcriptase reversa como um único *amplicon*, resultando em um fragmento de 1,3 Kb. Com base no princípio de *Clip*, realizou-se o seqüenciamento em 16 reações utilizando 4 módulos de *primer*: *Protease* que permite obter uma sequência bidirecional do gene da protease (do códon 10 a 99) e uma sequência em pelo menos uma direção do códon (1 a 9); *P2* que permite obter uma sequência bidirecional da região da protease (códon 21 a 99) e uma sequência em pelo menos uma direção do códon 7 a 20, *RT Beggining* permite obter uma sequência bidirecional da região da transcritase reversa (códon 41 a 139) e uma

sequência em pelo menos uma direção do códon 140 a 142 e códon 40; *RT Middle* permite obter uma sequência bidirecional da região da transcriptase reversa (códon 148 a 237) e uma sequência em pelo menos uma direção do códon 138 a 147 e códon 238 a 247. A eletroforese foi conduzida no *Long Read Tower* (Siemens Healthcare Diagnostics, Inc. Tarrytown, NY, USA). Todas as reações foram realizadas segundo especificações do fabricante.

Utilizou-se o software *OpenGene DNA Sequencing System* (Siemens Healthcare Diagnostics, Inc. Tarrytown, NY, USA), na aquisição e análise das sequências, segundo instruções do fabricante.

As sequências obtidas foram analisadas utilizando o *Trugene HIV-1 Genotyping*, versão 17.0 (Siemens Healthcare Diagnostics, Inc. Tarrytown, NY, USA), que analisa as diferenças nas sequências de aminoácidos entre o vírus circulante no paciente e o padrão HXB2, internacionalmente aceito como subtipo selvagem do HIV.

O relatório resultante desta análise origina dados das regiões do gene *pol*, PR e TR, sobre mutações principais e acessórias na região da PR, relacionadas ao IP, e mutações de resistência da TR, relacionadas aos ITRNs e ITRNNs. Além disso, os dados relacionados à resistência aos ARVs destas classes são divididos em “resistência”, “possível resistência” e “sensível”.

Parâmetros clínicos como doenças e condições associadas à aids, categorias clínicas segundo critério CDC, tratamento utilizado pelos pacientes, estadiamento da fibrose hepática (escala Metavir), informações epidemiológicas, assim como, parâmetros laboratoriais como carga viral foram retirados dos prontuários médicos dos pacientes.

Os pacientes foram categorizados conforme classificação do CDC (1992): (a) quanto às doenças e condições associadas à aids em A: assintomático, agudo ou linfadenopatias persistentes; B: sintomático não-A e não-C; e C: caso aids; (b) segundo a contagem de CD4 em 1 (contagem de CD4 igual ou superior a 500 células/mm³), 2 (com níveis de CD4 entre 200 e 499 células/mm³) e 3 (contagem de CD4 igual ou inferior a 200 células/mm³).

O tratamento utilizado pelo paciente foi classificado conforme esquema terapêutico 1º e 2º linha (nestes casos também separados por classes de drogas) ou terapia de resgate. Os esquemas terapêuticos foram caracterizados utilizando o banco de dados do SAE – Botucatu/SP, sendo considerado o último esquema utilizado pelo paciente que antecedeu a coleta da amostra analisada.

O estadiamento da fibrose foi categorizado segundo a escala de METAVIR (1997) em F0 (ausência de fibrose), F1 a F3 (ausência, raros e numerosos septos, respectivamente) e F4 (cirrose).

Dados de adesão à terapia foram, também avaliados e, para esta análise a retirada regular dos medicamentos na farmácia hospitalar caracterizou adesão; a ausência desta retirada regular foi considerada má adesão.

Análises estatísticas univariadas para comparação de grupos foram conduzidas utilizando o teste exato de *Fisher*.

Resultados e Discussão

As características demográficas e clínicas dos pacientes coinfectados HIV/VHC incluídos no estudo estão demonstradas na Tabela 1.

Dos pacientes incluídos no estudo 63,16% eram do sexo masculino. Apesar da atual feminização da infecção pelo HIV (BRASIL, 2012a), quando analisados pacientes coinfectados pelo VHC, tende-se a um maior número de casos no gênero masculino devido a fatores de risco associados à rota de transmissão do VHC. Resultados semelhantes foram encontrados por Calegari e colaboradores (2011), com 75% dos pacientes do sexo masculino na região sul e; por Amaral (2006) que encontrou 83,5% homens coinfectados HIV/VHC na região norte do Brasil.

Quanto às características virológicas dos pacientes deste estudo 94,74% dos vírus HIV circulantes nos pacientes coinfectados eram do subtipo B e, 5,26% do subtipo F (Tabela 2). Estudos anteriores corroboram este achado, nos quais a frequência do subtipo B do HIV oscila entre 70 a 90% (CAVALCANTE et al., 2007; TOLEDO et al., 2009). Da mesma forma, estudo anterior de Corvino e colaboradores (2007) na região de Botucatu, a mesma do presente estudo, encontrou uma frequência de 85,0% do subtipo B do HIV e 12,9% do F em pacientes coinfectados.

Quanto aos genótipos do VHC na população estudada a maior frequência foi do genótipo 1 representando 94,74% (Tabela 2). Estudo anterior realizado por Corvino e colaboradores (2007), no qual demonstra maior frequência do genótipo 1 (58,00%) em coinfectados HIV/VHC, apóiam os resultados aqui encontrados.

Tabela 1: Características demográficas e clínicas dos pacientes coinfectados HIV/VHC incluídos no estudo (n=19)

Características	(N = 19)
Idade (anos), mediana (IQR)	43 (39-47)
Sexo, Masculino [N (%)]	12 (63,16)
Tratamento Antirretroviral* [N (%)]	
3 ITRN	01 (05,26)
2 ITRN + 1 ITRNN	06 (31,58)
2 ITRN + 1 IP	01 (05,26)
2 ITRN + 1 IP/r	08 (42,10)
Resgate**	02 (10,52)
Virgem de Tratamento (<i>naive</i>)	01 (05,26)
Qualidade da adesão ao Tratamento Antirretroviral* [N (%)]***	
Adesão	09 (47,36)
Má adesão	09 (47,36)
Tratamento Antiviral para o VHC* [N (%)]	
<i>naive</i>	15 (78,95)
Tratamento com RVS	01 (05,26)
Tratamento sem RVS	03 (15,79)
Condição Clínica HIV* [N (%)] Critério CDC (1992)	
B2	01 (05,26)
C1	01 (05,26)
C2	03 (15,79)
C3	14 (73,68)
Estadiamento da Fibrose Hepática* [N (%)]	
NR	8 (42,10)
F2	4 (21,05)
F3	3 (15,79)
F4	4 (21,05)

HIV: Vírus da Imunodeficiência Humana; VHC: Vírus da Hepatite C; IQR: Intervalo interquartil; N: número absoluto; ITRN: Inibidor de Transcriptase Reversa análogo nucleosídeo ou nucleotídeo; ITRNN: Inibidor de Transcriptase Reversa não análogo nucleosídeo; IP: Inibidor de Protease; CDC: centro de Controle e Prevenção de Doenças; B2: sintomático com contagem de linfócitos T CD4 entre 200 células/mm³ e 499 células/mm³; C1: condições indicativas de aids com contagem de linfócitos T CD4 superior a 500 células/mm³; C2: condições indicativas de aids com contagem de linfócitos T CD4 entre 200 células/mm³ e 499 células/mm³; C3: condições indicativas de aids com contagem de linfócitos T CD4 inferior a 200 células/mm³; NR: Biopsia hepática não realizada; F2: fibrose portal com raros septos; F3: numerosos septos sem cirrose; F4: cirrose. *Informação obtida no prontuário médico dos pacientes. ** Terapia de resgate com 2 ITRN + 1 II (RAL). ***Informação avaliada segundo a regularidade de retirada dos medicamentos na farmácia hospitalar em 18 dos 19 pacientes do estudo, pois um era virgem de tratamento.

Tabela 2: Características virológicas dos pacientes coinfectados HIV/VHC incluídos no estudo (N=19)

Características	[N (%)]
Subtipo do HIV*	
B	18 (94,74)
F	01 (05,26)
Genótipo do VHC*	
1	18 (94,74)
3	01 (05,26)
Carga Viral do HIV*	
Entre 1.000 e 10.000 cópias de RNA/mL	08 (42,10)
Entre 10.000 e 100.000 cópias de RNA/mL	08 (42,10)
Superior a 100.000 cópias de RNA/mL	03 (15,79)

HIV: Vírus da Imunodeficiência Humana; VHC: Vírus da Hepatite C; N: número absoluto;

*Informação obtida no prontuário médico dos pacientes.

No que se refere à presença de mutações de resistência associadas aos antirretrovirais, todas as amostras apresentaram variantes virais com pelo menos nove mutações associadas à resistência aos ARVs (Tabela 3). Quando se considera as mutações associadas às classes dos medicamentos verifica-se que oito (42,10%) amostras não apresentaram vírus com mutações principais aos IPs; nove (47,36%) não apresentaram mutações associadas aos ITRNNs; e todas apresentaram ao menos quatro mutações associadas aos ITRNs (Tabela 3).

Mutações de resistência aos ITRNs são esperadas devido ao amplo uso destas drogas nos primeiros esquemas terapêuticos, enquanto mutações aos ITRNNs podem desaparecer rapidamente na ausência de medicação, permanecendo nas populações minoritárias.

Tabela 3: Frequência das mutações de resistência nas regiões genômicas codificadoras da transcriptase reversa e protease do HIV dos pacientes coinfectados HIV/VHC incluídos no estudo (N=19)

Total de Mutações		PR			
	[N* (%)]	Principais	[N* (%)]	Acessórias	[N* (%)]
9	1 (05,26)	0	8 (42,10)	2	2 (10,52)
10	1 (05,26)	1	7 (36,84)	3	1 (05,26)
11	1 (05,26)	3	1 (05,26)	4	1 (05,26)
12	1 (05,26)	4	1 (05,26)	5	2 (10,52)
14	1 (05,26)	6	1 (05,26)	6	2 (10,52)
15	2 (10,52)	8	1 (05,26)	7	2 (10,52)
16	1 (05,26)			8	3 (15,79)
17	2 (10,52)			9	2 (10,52)
20	3 (15,79)			10	1 (05,26)
22	1 (05,26)			11	1 (05,26)
24	1 (05,26)			12	1 (05,26)
29	1 (05,26)			15	1 (05,26)
35	1 (05,26)				
36	1 (05,26)				
38	1 (05,26)				
		TR			
		ITRN	[N* (%)]	ITRNN	[N* (%)]
		4	1 (05,26)	0	9 (47,36)
		5	2 (10,52)	1	3 (15,79)
		6	1 (05,26)	2	3 (15,79)
		7	1 (05,26)	3	2 (10,52)
		8	2 (10,52)	4	2 (10,52)
		9	4 (21,05)		
		11	1 (05,26)		
		12	3 (15,79)		
		14	1 (05,26)		
		15	1 (05,26)		
		17	1 (05,26)		
		19	1 (05,26)		

PR: protease; TR: transcriptase reversa; ITRN: Inibidor de Transcriptase Reversa análogo nucleosídeo ou nucleotídeo; ITRNN: Inibidor de Transcriptase Reversa não análogo nucleosídeo; IP: Inibidor de Protease. *N: número absoluto.

Os resultados obtidos demonstraram a presença de vírus com mutações associadas a duas classes de antirretrovirais (ITRN + IP) em 47,37%; e 52,63% dos pacientes incluídos no estudo apresentaram vírus com mutações de resistência às três classes de drogas (ITRN + ITRNN + IP). Nenhuma amostra apresentava vírus com mutações a apenas uma classe de drogas (Tabela 4).

Observou-se, ainda, que mutações de resistência a duas classes de drogas (ITRN + IP) nos pacientes coinfectados HIV/VHC apresentavam uma frequência significativamente superior ($p < 0,05$) quando comparados aos monoinfectados pelo HIV oriundos da mesma região geográfica deste estudo (Tabela 4).

Tabela 4: Frequência da presença de mutações de resistência por classe de droga em pacientes monoinfectados HIV e coinfectados HIV/VHC

Variáveis	Monoinfectados HIV* (n=386)	Coinfectados HIV/VHC (n=19)
	[N (%)]	[N (%)]
Nenhum	11 (2,85)	-
1 Classe		
ITRN	11 (2,85)	-
ITRNN	08 (2,08)	-
IP	14 (3,62)	-
2 Classes		
ITRN+ITRNN	85 (22,02)	-
ITRN+IP	64 (16,58) [#]	09 (47,37) [#]
ITRNN+IP	05 (01,29)	-
3 Classes		
ITRN+ITRNN+IP	188 (48,70) [#]	10 (52,63) [#]

HIV: vírus da imunodeficiência humana; VHC: vírus da Hepatite C; ITRN: Inibidor de Transcriptase Reversa análogo nucleosídeo ou nucleotídeo; ITRNN: Inibidor de Transcriptase Reversa não análogo nucleosídeo; IP: Inibidor de Protease. *Grupo controle (Munhoz, 2011).
#Segmentos avaliados comparativamente utilizando teste exato de Fisher. Diferença significativa ($p < 0,05$).

Este resultado pode constituir uma consequência da própria coinfeção HIV/VHC. Já é documentado que a presença do VHC acelera a progressão para aids e, nos coinfectados a resposta celular via CD4 e CD8 é pior que nos pacientes monoinfectados pelo HIV (HARCOURT et al., 2006; CAPA et al., 2007), mesmo depois da HAART (DUTOIT et al., 2005), o que favorece ainda mais a replicação do HIV. Assim, diante da alta replicação do HIV elevados níveis de variantes resistentes se originam e, podem ser rapidamente selecionadas com a terapêutica. Além disso, deve-se considerar que neste estudo 47,37% dos pacientes estavam utilizando os medicamentos de forma irregular (tabela 1) o que, também, favorece a emergência de resistência (DIAZ, 2011).

Nenhum paciente apresentou a forma selvagem do vírus HIV. Estudos nacionais com pacientes monoinfectados pelo HIV demonstraram presença do vírus selvagem em cerca de 5% dos pacientes (CAVALCANTE et al., 2007; TOLEDO et al., 2009). Um estudo regional que utilizou a população monoinfectada pelo HIV da cidade de Botucatu, SP, a mesma região do presente estudo, demonstrou a presença de vírus selvagens em 2,85% dos pacientes infectados pelo HIV (MUNHOZ et al., 2011).

Quando se considera as mutações de resistência aos ITRNs todas as TAMs foram detectadas e, oito (42,10%) pacientes apresentaram vírus com pelo menos uma TAM. Quando comparados a estudos que avaliaram a frequência das TAMs em monoinfectados pelo HIV nota-se que no presente estudo as TAMs apresentaram uma frequência inferior à encontrada em portadores de HIV isoladamente, a qual se encontra em torno de 67% (MUNHOZ et al, 2011; COUTO-FERNANDEZ et al, 2005; DE SA-FILHO et al., 2008).

Dos oito pacientes que apresentavam TAMs quatro faziam o uso de AZT ou d4T e, portanto, 50% dos pacientes com TAMs estavam utilizando análogos de timidina (AZT e d4T) que selecionam variantes virais com TAMs. Este dado é similar ao encontrado em monoinfectados pelo HIV, nos quais dos pacientes portadores de vírus com TAMs 60,23% faziam uso de AZT ou d4T. Deve-se considerar que estes dados podem estar subestimados devido a possibilidade dos pacientes que não utilizam análogos de timidina já terem sido expostos a estas drogas em esquemas anteriores. As TAMs conferem redução na suscetibilidade a todos ITRNs e resistência cruzada ao ABC, ddl e TDF (WHITCOMB et al., 2003).

Mutações nos códons 70 e 219 da via TAM 2 foram detectadas em maior proporção, presentes com uma frequência de 21,05%. A mutação K70R é uma das mais precoces na monoterapia com o AZT com aparecimento subsequente das mutações T215Y/F (HUANG et al., 1998). As mutações T215Y e T215F estiveram presentes em uma amostra cada, não associadas a

K70R. Estas conferem alta resistência ao AZT (CLAVEL e HANCE, 2004). Entre as mutações acessórias as TAMs foram evidenciadas a L228H (15,79%), L228R (5,26%) e a V118I (5,26%). Todas estavam associadas a códons da via TAM 2 (70 e 219).

Apenas uma amostra (5,26%) apresentou as mutações M41L, L210W e T215Y, via TAM 1. O conjunto destas mutações conferem alto nível de resistência ao AZT e d4T e intermediário/alto nível de resistência a ABC, ddl e TDF. Esta mesma amostra apresentou a mutação D67N, também responsável pela resistência ao AZT e d4T e o polimorfismo K122E, associado a alta resistência aos timidínicos (SVICHER et al., 2006). Resultado similar quanto a frequência da via TAM 1 (6,18%) em pacientes coinfectados HIV/VHC foi encontrado em um estudo anterior (LIU et al., 2011). No entanto, esses resultados devem ser vistos com cautela uma vez que, um paciente representava 5,26%. Estudos que envolvessem a ampliação da amostra utilizada poderiam ser úteis para avaliar os resultados aqui apresentados.

De maneira semelhante, na população de monoinfectados pelo HIV, a via mutacional TAM 2 foi a mais freqüente, embora com uma frequência superior a encontrada neste estudo (MUNHOZ, 2011).

Embora Huang e colaboradores (1998) tenham demonstrado que mutações no códon 215 geralmente levam a mutação M41L, das quatro amostras que apresentaram mutação no códon 215, apenas uma apresentou a mutação M41L associada a mutação T215Y.

Com relação às demais mutações (não TAMs) aos ITRNs, a acessória L214F foi a mais freqüente, presente em 13 amostras (68,42%), seguida por E122K e M184V, presentes em 57,89% (n=11) das amostras.

A mutação M184V tem grande importância por conferir alto nível de resistência a 3TC/FTC e resistência parcial ao ddl e ABC. Apesar de aumentar a susceptibilidade à AZT, d4T e TDF (SHAFER e SCHAPIRO, 2008), também pode retardar o surgimento de resistência a estes medicamentos. A

combinação de TDF, AZT ou d4T mais 3TC/FTC muitas vezes inibe parcialmente os vírus com esta mutação.

Uma amostra (5,26%) apresentou mutação M184V associada a L74V. A L74V é selecionada por ABC e ddl e sua associação ao M184V desenvolve-se comumente em pacientes recebendo ABC/3TC. Além da resistência ao ABC e ddl, esta associação pode aumentar a susceptibilidade ao AZT (SHAFER e SCHAPIRO, 2008). Este resultado é discordante com a frequência desta mutação em pacientes monoinfectados pelo HIV, nos quais a M184V está presente com uma frequência superior a 80% (COUTO-FERNANDEZ et al., 2005; RODRIGUES et al., 2005; CAVALCANTI et al., 2007; MEDEIROS et al., 2007; DE SA-FILHO et al., 2008; VARELLA et al., 2008; TOLEDO et al., 2010; MUNHOZ, 2011).

Algumas mutações, mesmo que não relacionadas diretamente a ocorrência de resistência, são importantes para a recuperação do *fitness viral* e ocorrem no contexto de dupla resistência a AZT e 3TC: H208Y, R211K, L214F e G333E/D (WALTER et al., 2002). No presente estudo as mutações R211K e L214F estiveram presentes em 15 pacientes, sendo dois com a R211K; dez com a L214F e três com as mutações em associação. Destes pacientes, 14 faziam o uso de AZT e/ou 3TC.

Foram encontradas as mutações multirresistentes A62V, V75I, F116Y e Q151M em uma (5,26%) amostra. Esta associação confere alto nível de resistência ao AZT, d4T, ddl e ABC, e resistência intermediária ao TDF, 3TC e FTC (PRADO et al., 2004), comprometendo toda classe de drogas.

Quando se consideram as mutações de resistência aos ITRNNs verifica-se que dez (52,63%) pacientes apresentavam variantes virais com este tipo de mutação e 16 (84,21%) polimorfismos associados a estes. As mutações mais frequentes foram a K103N e a G190A, ambas em 21,05% das amostras (n=4).

A K103N é selecionada pelo NVP e EFV, conferindo alto grau de resistência a estes ITRNNs, com pouco efeito no *fitness viral* (LUCAS, 2005). Esta mutação já foi encontrada anteriormente em pacientes não tratados (LAL

et al., 2005). Esse resultado é concordante com um estudo que avaliou mutações de resistência em coinfectados HIV/VHC, no qual a K103N prevalecia (LIU et al, 2011).

A mutação G190A é selecionada por NVP e EFV e reduz a susceptibilidade destes medicamentos mais de 50 vezes. Também confere resistência a ETR, sendo responsável pela resistência a toda classe de ITRNN.

Enquanto a frequência da mutação no códon 190 foi semelhante a encontrada em monoinfectados pelo HIV (COUTO-FERNANDEZ et al., 2005; MUNHOZ, 2011); a frequência da mutação K103N foi inferior a relatada na literatura para monoinfectados pelo HIV (COUTO-FERNANDEZ et al., 2005; CAVALCANTI et al.,2007; SÁ-FILHO et al., 2008).

A substituição do aminoácido V pelo I no códon 106 selecionada pelo EFV foi observada em dois pacientes. Esta mutação, quando associada ao V179D como ocorreu em um paciente, confere resistência a toda a classe de ITRNN.

O conjunto com as mutações L100I, V106A e G190A não foi encontrado no mesmo paciente. Esta associação confere resistência a toda a classe de ITRNN (GHOSN et al. 2006). Dois pacientes eram portadores de variantes com a associação das mutações L100I e K103N, as quais conferem alto grau de resistência ao EFV. Resultado similar foi encontrado em estudos que avaliaram perfil de mutações em pacientes monoinfectados pelo HIV (MUNHOZ, 2011).

Entre os polimorfismos associados aos ITRNNs, o I135T foi o mais freqüente, n=16 (84,21%). Estes, quando correlacionado a K103N podem intensificar a resistência ao EFV. Neste estudo esta associação foi detectada com uma frequência de 21,05%. O polimorfismo I135T já foi detectado em estudos anteriores na população de monoinfectados pelo HIV não tratados (*naive*) e, o seguimento destes pacientes revelou o aparecimento da mutação K103N, sugerindo que o I135T pode representar um determinante fundamental da evolução da resistência aos ITRNNs (CECCHERINI-SILBERSTEIN et al.,2007),

O EFV ainda pode selecionar mutações nos códons 100, 108, 179 e 181 da TR (BACHELER et al., 2001). No total, 31,57% das amostras apresentaram estas mutações, sendo um (5,26%) paciente com a mutação L100I sem associação a estes códons; um (5,26%) com associação L100I/V108I; e um (5,26%) com L100I/V179D.

A mutação Y181C, encontrada em 10,52% das amostras, é frequentemente associada a resistência ao DLV, NVP e EFV. Estudos têm mostrado que, algumas mutações, como a Y181C ocorrem com mais frequência em pacientes com falha virológica ao NVP e, conduzem a resistência cruzada para EFV (REUMAN et al., 2010). Um estudo com pacientes coinfectados HIV/VHC tratados apenas com o NVP e sem exposição a outros ITRNNs apresentou a Y181C com frequência de 13,63% das amostras com mutação, muito próxima a encontrada em nosso estudo (LIU et al., 2011).

Algumas mutações estão associadas a resíduos na região da ligação do ITRNN com a p66 da TR como a M230L (LARDER, 2001). Esta mutação confere resistência a classe e foi encontrada em uma amostra (5,26%). Munhoz e colaboradores (2011) também encontraram esta mutação em baixa frequência, N=6 (1,55%).

Quanto às mutações de resistência aos IPs foram observadas mutações principais em 11 pacientes, sendo a M46I, I54V e V82A em três (15,79%), seguidas pela L90M em dois (10,52%). A mutação M46I é selecionada principalmente pelo IDV, NFV, FPV, ATV, e LPV e contribui para a susceptibilidade reduzida destes IPs. O IDV e LPV também selecionam a mutação V82A que reduz a susceptibilidade a estes IPs e confere resistência cruzada a ATV e NFV. Quando associado a outras mutações pode diminuir a susceptibilidade ao SQV e FPV. A substituição do aminoácido do códon 90 (L-M), selecionada principalmente por SQV, NFV, IDV e LPV, diminui a susceptibilidade a cada um dos IPs exceto TPV e DRV. Esta mutação está associada ao uso de SQV como 1º IP utilizado no esquema terapêutico (MARCELIN et al., 2004).

Apesar dos estudos nacionais demonstrarem estas duas mutações (M46I e L90M) como as mais freqüentes associadas aos IPs, as frequências aqui observadas são inferiores a maioria dos estudos nos quais a prevalência da L90M pode atingir até 41% (RODRIGUES et al., 2005) e 29% (DE SÁ-FILHO et al., 2008). Munhoz (2011) observou 120 (31,1%) pacientes com mutações no códon 46; e 85 (22%) pacientes com a mutação L90M. Segundo Oliveros (2009), estas mutações podem ser importantes marcadores a resistência transmitida, devido a baixa prevalência em pacientes não tratados.

Apesar de nove (47,36%) dos pacientes fazerem uso de IPs em seus esquemas terapêuticos, foram encontradas 52 mutações acessórias associadas aos IPs, distribuídas entre as 19 amostras. As mutações S37N, I15V e M36I foram os mais freqüentes com 57,89%, 47,36% e 42,10%, respectivamente. Estas mutações podem ser transmitidas ou emergir posteriormente as principais e, isoladamente, têm menor efeito na resistência, mas podem alterar a taxa de replicação viral (JOHNSON et al., 2006).

Embora Pires e colaboradores (2003) tenham observado prevalência de 85,7% de mutações acessórias em pacientes virgens de tratamento (*naive*), indicando alto percentual de resistência transmitida; estudos em pacientes coinfectados HIV/VHC tratados apenas com ITRNs e ITRNNs e sem exposição anterior a IPs não apresentaram nenhuma mutação aos IPs (LIU et al., 2011).

A substituição M36I contribui para a resistência ao RTV e NFV. Conforme Pieniazek e colaboradores (2000), a metionina na posição 36 pode representar um polimorfismo específico do subtipo B, visto que sua frequência é extremamente maior em variantes não-B e, mais especificamente, representa assinatura do subtipo F.

Os resultados do presente estudo demonstraram que mutações de resistência encontradas em pacientes mono infectados pelo HIV também ocorrem em pacientes coinfectados HIV/VHC.

A tabela 5 mostra as frequências absolutas e relativas das principais mutações encontradas neste estudo, comparativamente com o grupo de

monoinfectados pelo HIV (MUNHOZ, 2011). Algumas diferenças quantitativas podem ser observadas. A frequência da mutação de resistência M184V em coinfectados foi significativamente inferior ($p < 0,05$) a que foi descrita em monoinfectados pelo HIV procedentes da mesma região geográfica. A não adesão ao tratamento antirretroviral, característica de 47,36% da população estudada, pode estar relacionada a este achado, uma vez que na ausência da pressão seletiva do esquema terapêutico as variantes resistentes podem constituir população minoritária, não sendo detectada no teste de resistência.

As demais mutações não puderam ser avaliadas do ponto de vista quantitativo (comparação de frequências) devido ao pequeno número de pacientes coinfectados portadores de vírus com tais mutações.

Quando se considera o perfil de resistência as drogas, este estudo demonstrou que, três (15,79%) pacientes apresentavam vírus com sensibilidade total às três classes de drogas avaliadas. Entre as três classes, os IPs foram os que apresentaram melhor desempenho, com 15 (78,94%) pacientes sensíveis as oito drogas avaliadas para esta classe. Este resultado pode se relacionar a baixa exposição dos pacientes do presente estudo aos IPs (Tabela 1).

Tabela 5: Frequência absoluta e relativa das principais mutações relacionadas aos ITRNs, ITRNNs e IPs nos grupos monoinfectados HIV e coinfectados HIV/VHC

Variáveis	Monoinfectados* (N=386)		Coinfectados (N=19)	
ITRN				
L74I/V	55	14,25	1	5,26
M184V	314	81,35 [#]	11	57,89 [#]
A62V	27	6,99	1	5,26
Q151M	7	1,81	1	5,26
M41L	157	40,67	1	5,26
L210W	96	24,87	1	5,26
T215Y	149	38,6	1	5,26
D67N	132	34,2	1	5,26
K70R	110	28,5	4	21,05
T215F	71	18,39	1	5,26
K219E	59	15,28	4	21,05
K219Q	51	13,21	4	21,05
ITRNN				
L100I	18	4,66	3	15,79
K103N	162	41,97	4	21,05
V106I	4	1,03	2	10,52
V108I	46	11,92	1	5,26
V179D	18	4,66	1	5,26
Y181C/I	45	11,66	2	10,52
G190A/S/V	73	18,91	4	21,05
P225H	48	12,43	2	10,52
M230L	6	1,55	1	5,26
IP				
V32H/I/L	32	8,3	1	5,26
M46I/L	120	31,1	4	21,05
I54A/L/M/T/V	117	30,3	3	15,79
V82A/C/F/L/M/T	114	29,5	3	15,79
I84V	25	6,5	1	5,26
L90M	85	22	2	10,52
L10F/I/R/V/Y	215	55,7	5	26,31
A71T/V	150	38,86	1	5,26
T74T/S	34	8,81	1	5,26

HIV: vírus da imunodeficiência humana; VHC: vírus da Hepatite C; ITRN: Inibidor de Transcriptase Reversa análogo nucleosídeo ou nucleotídeo; ITRNN: Inibidor de Transcriptase Reversa não análogo nucleosídeo; IP: Inibidor de Protease. *Grupo controle (Munhoz, 2011). #Segmentos avaliados comparativamente utilizando teste exato de Fisher. Diferença significativa ($p < 0,05$)

A figura 7 ilustra o perfil de resistência aos ITRNs encontrado no presente estudo. A classe dos ITRNs foi a que apresentou maior nível de resistência, sobretudo para os análogos de citosina 3TC/FTC, os quais apresentam perfil idêntico e a maior proporção de resistência (57,89%).

Estes resultados são concordantes com dados nacionais de estudos anteriores que demonstram a alta prevalência da resistência ao 3TC (BRASIL, 2013). Este achado se justifica quando se considera que o 3TC possui baixa barreira genética e foi um medicamento amplamente utilizado, selecionando a mutação M184V, a qual isolada já confere resistência total ao 3TC e, resistência cruzada ao FTC.

Apesar destes resultados, o 3TC foi o ARV mais utilizado pelos pacientes (94,73%) deste estudo. A manutenção do 3TC no esquema terapêutico apresenta importância estratégica, principalmente em pacientes multirresistentes. A manutenção da mutação M184V selecionada pelo uso desta droga reduz significativamente a capacidade replicativa do HIV (CARVALHO, 2008).

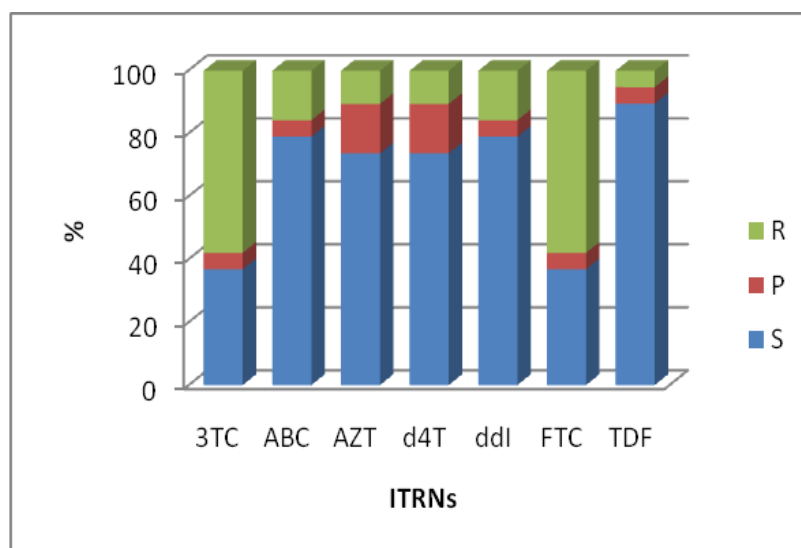


Figura 7: Perfil de resistência aos ITRNs. ITRNs: Inibidores de Transcriptase Reversa análogos nucleosídeos ou nucleotídeos; 3TC: Lamivudina; ABC: Abacavir; AZT: Zidovudina; d4T: Estavudina; ddi: Didavudina; FTC: Emtricitabina; TDF: Tenofovir. R: resistente; P: possível resistência; S: sensível.

Para os análogos de timidina AZT e d4T foi observado um nível de resistência idêntico (10,52%), o que é concordante com o baixo índice das TAMs encontradas neste estudo.

A droga desta classe com menor nível de resistência foi o TDF (89,47%), embora 26,31% dos pacientes fizessem uso do TDF no momento da coleta. O TDF foi o último ITRN aprovado para uso clínico (FDA, 2010) e, por seu perfil de resistência pode ser considerada uma droga com potencial de uso em esquemas de resgate.

Por outro lado, uma amostra apresentou vírus com alta resistência ao TDF e, o paciente em questão não havia utilizado este medicamento, sugerindo a ocorrência de resistência transmitida.

No que se relaciona ao perfil de resistência aos ITRNNs os resultados deste estudo mostraram um perfil de resistência idêntico para o EFV e NVP, com 52,63% (Figura 8), resultado concordante com estudos anteriores conduzidos em monoinfectados pelo HIV, nos quais a resistência a estas drogas oscilam próximo a 60% (MUNHOZ, 2011; BRASIL, 2013).

O alto nível de resistência para estes medicamentos se relaciona a baixa barreira genética destas drogas e, apenas uma mutação pode conduzir a resistência a toda classe.

Pela figura 8 nota-se um perfil de alta sensibilidade a ETR (73,68%), o que se justifica pela alta barreira genética deste ITRNN de segunda geração. Assim a ETR pode constituir uma opção terapêutica essencial nos esquemas de resgate. A resistência total ao ETR pode se relacionar com o acúmulo das mutações L100I, K101E, V179D, Y181C, G190A e M230L (SHAFER e SCHAPIRO, 2008). Neste estudo o acúmulo destas mutações não foi observado, mas as mutações L100I, V179D e M230L simultâneas foram observadas em um (5,26%) e, a ocorrência da Y181C em conjunto com a G190A em dois (10,52%) pacientes.

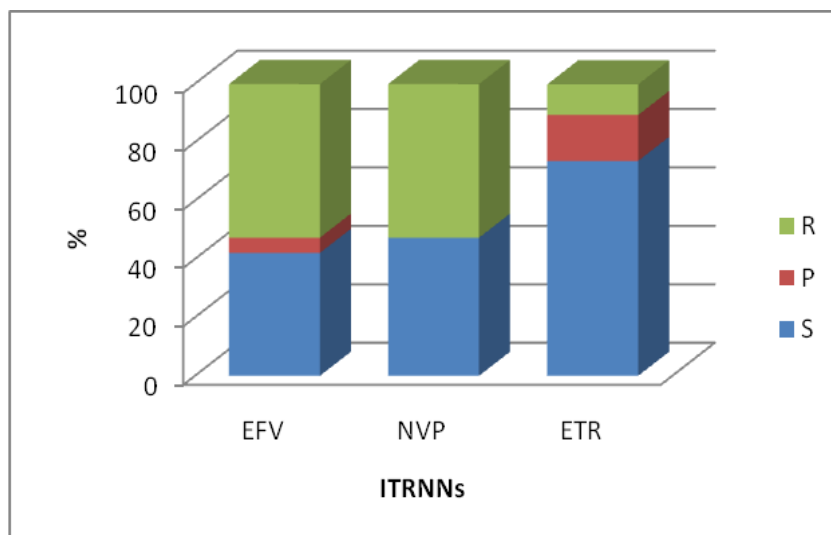


Figura 8: Perfil de resistência aos ITRNNs. ITRNNs: Inibidores de Transcriptase Reversa não análogos nucleosídeos; EFV: Efavirenz; NVP: Nevirapina; ETR: Etravirina; R: resistente; P: Possível resistência; S: sensível.

Entre as três classes de antirretrovirais avaliadas neste estudo, os IPs foram as drogas que demonstraram menores níveis de resistência (Figura 9). A alta barreira genética destes medicamentos justifica este resultado, sendo necessário um acúmulo de mutações para conduzir a resistência.

O IDV/r, ATV/r e o LPV/r apresentaram os maiores níveis de resistência (21,05%), tendo mostrado perfil idêntico, seguidos pelo SQV/r com nível de resistência em 15,79% (Figura 9). Neste estudo, a resistência ao IDV/r esteve sempre associada à resistência ao SQV/r. O IDV e o SQV são intrinsecamente potentes, sendo necessário múltiplas mutações para conduzir à resistência, no entanto, resistência a IDV geralmente confere resistência ao SQV e vice-versa (POTTER et al. 2004).

Estudos anteriores conduzidos em monoinfectados pelo HIV mostraram resultados semelhantes aos aqui obtidos (MUNHOZ et al., 2011). O LPV/r e SQV/r constituem drogas utilizadas em esquemas de resgate e, os resultados aqui reforçam dados de outros trabalhos, que demonstram que estes medicamentos ainda representam alternativas para a elaboração de um esquema de resgate, prorrogando a utilização do DRV/r ou TPV/, possibilitando a utilização destes ARVs em esquemas futuros.

No outro extremo, o DRV/r foi a droga que apresentou sensibilidade total, seguida pelo TPV/r com nível de sensibilidade em 89,47% (Figura 9), resultado que, também, foi semelhante à resultados de estudos anteriores entre pacientes monoinfectados pelo HIV (MUNHOZ, 2011). DRV/r e TPV/r foram os últimos IPs a serem liberados para uso clínico, constituindo drogas reservadas para casos de multirresistência e esquemas de resgate.

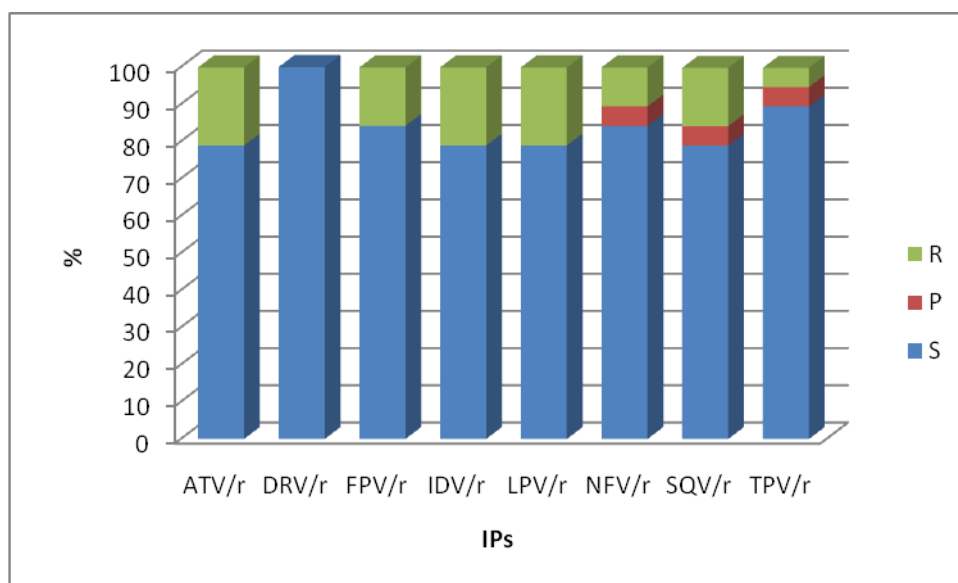


Figura 9: Perfil de resistência aos IPs. IPs: Inibidores de Protease. ATV/r: atazanavir/ritonavir; DRV/r: darunavir/ritonavir; FPV/r: fosamprenavir/ritonavir; IDV: indinavir/ritonavir; LPV/r: lopinavir/ritonavir; NFV: nelfinavir/ritonavir; SQV/r: saquinavir/ritonavir; TPV/r: tipranavir/ritonavir. NVP: Nevirapina. R: resistente; P: possível resistência; S: sensível.

A tabela 6 mostra as frequências absolutas e relativas do perfil de resistência às três classes de drogas avaliadas encontradas neste estudo, comparativamente com o grupo de monoinfectados pelo HIV (MUNHOZ et al., 2011). Algumas diferenças quantitativas podem ser observadas. A frequência de resistência total ao 3TC e ao FTC em coinfectados foi significativamente inferior ($p < 0,05$) a que foi descrita em monoinfectados pelo HIV procedentes da mesma região geográfica, resultado concordante com o obtido para a mutação M184V que, também, foi menos frequente em coinfectados. A mutação M184V é responsável pela resistência completa ao 3TC (SHAFFER e SCHAPIRO, 2008).

Já para os ITRNNs: NVP e EFV, não houve diferença significativa ($p > 0,05$) na resistência total entre mono e coinfectados. Este resultado pode ser consequência de uma somatória de fatores: a maior proporção de co-infectados expostos a esta classe de medicamentos e, a baixa barreira genética destas drogas.

Tabela 6: Frequências absolutas e relativas da resistência genotípica aos ARVs dos vírus circulantes em pacientes monoinfectados pelo HIV (n=386) e coinfectados HIV/VHC (n=19)

Variáveis				
	Monoinfectados*		Coinfectados	
	N	%	N	%
ITRN				
3TC	316	81,8 [#]	11	57,89 [#]
ABC	117	30,3	3	15,79
AZT	160	41,4	2	10,52
d4T	134	34,7	2	10,52
ddl	110	28,5	3	15,79
FTC	316	81,8 [#]	11	57,89 [#]
TDF	7	1,8	1	5,26
ITRNN				
EFV	223	57,7	10	52,63
NVP	245	63,4	10	52,63
ETR	26	6,9	2	10,52
IP				
ATV/R	109	28,2	4	21,05
DRV/R	2	0,52	-	-
FPV/R	70	18,3	3	15,79
IDV/R	116	30	4	21,05
LPV/R	66	17,1	4	21,05
NFV/R	174	45	2	10,52
SQV/R	73	18,9	3	15,79
TPV/R	9	2,3	1	5,26

ITRN: Inibidor de Transcriptase Reversa análogo nucleosídeo ou nucleotídeo; ITRNN: Inibidor de Transcriptase Reversa não análogo nucleosídeo; IP: Inibidor de Protease. 3TC: Lamivudina; ABC: Abacavir; AZT: Zidovudina; d4T: Estavudina; ddl: Didavudina; FTC: Emtricitabina ; TDF: Tenofovir; EFV: Efavirenz; NVP: Nevirapina; ETR: Etravirina; ATV/r: atazanavir/ritonavir; DRV/r: darunavir/ritonavir; FPV/r: fosamprenavir/ritonavir; IDV: indinavir/ritonavir; LPV/r: lopinavir/ritonavir; NFV/r: nelfinavir/ritonavir; NVP: Nevirapina. SQV/r: saquinavir/ritonavir; TPV/r: tipranavir/ritonavir. *Grupo controle (MUNHOZ, 2011). #Segmentos avaliados comparativamente utilizando teste exato de Fisher. Diferença significativa ($p < 0,05$).

Para as demais drogas a resistência genotípica não pode ser avaliada do ponto de vista quantitativo (comparação de frequências) devido ao pequeno número de pacientes coinfectados com vírus resistentes a estas drogas.

Desta forma, os resultados aqui obtidos demonstraram que variantes resistentes emergem durante a terapia antirretroviral em pacientes coinfectados HIV/VHC seguindo o modelo da resistência em monoinfectados pelo HIV. No entanto, a frequência de algumas mutações podem ser distintas destas mesmas em monoinfectados pelo HIV, sugerindo que a presença do VHC pode favorecer ou prejudicar a seleção de determinadas mutações. Novos estudos com um maior número de casos devem ser conduzidos para avaliar o real significado destes achados e, avaliar o papel do VHC neste cenário.

Considerações Finais

- Variantes resistentes aos antirretrovirais emergem durante o tratamento para a infecção pelo HIV em pacientes coinfectados HIV/VHC.
- Entre os pacientes coinfectados deste estudo nenhum apresentava o vírus selvagem.
- Altas taxas de sensibilidade aos IPs demonstram um importante potencial de utilização desta classe de drogas, podendo anteceder o uso de drogas destinadas a terapias de resgate.
- Nível significativo de má adesão ao tratamento pode ter um impacto importante na terapêutica dos pacientes coinfectados com HIV/VHC.
- O teste de genotipagem pode ser útil para estes pacientes para evitar a utilização de drogas de resgate quando as de primeira e segunda linha ainda podem ser utilizadas.

Referências Bibliográficas

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Cellular and molecular immunology**. 6.ed. Canadá: Elsevier, 2008.

ADAMS, J.; PATEL, N. et al. Nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor resistance and the role of the second-generation agents. **Ann Pharmacother**, v. 44, n.1, p.157-165, 2010.

AMARAL, K. M.; REIS, J. G.; PICON, P. D. Avaliação farmacêutica no Sistema Único de Saúde: um exemplo de experiência bem sucedida com pacientes portadores do vírus da hepatite C. **Rev. Bras. Farm.**, n. 87, p. 17-21, 2006.

ANDREONI, M. et al.; HIV-HCV co-infection: epidemiology, pathogenesis and therapeutic implications. **Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.**, v.16, p.1473-1483, 2012.

ANDREWS, C. A.; KOUP, R. A. The immunopathology of HIV infection. **J. Antimicrobial Chemotherapy**, v. 37, p. 13-25, 1996.

ANTONUCCI, G.; GOLETTI, D.; LANINI, S.; GIRARDI, E.; LOIACONO, O. HIV/HCV co-infection: putting the pieces of the puzzle together. **Cell Death and Differentiation**, v.10, p.25-26, 2003.

ARTS, E. J.; HAZUDA, D. J. HIV-1 Antiretroviral Drug Therapy. **Cold Spring Harb Perspect Med**, v.2, p.1-23, 2012.

BABIK, J. M.; HOLODNIY, M. Impact of highly active antiretroviral therapy and immunologic status on hepatitis C virus quasispecies diversity in human immunodeficiency virus/ hepatitis C virus-coinfected patients. **J. Virol.**, v.77, n.3, p.1940-1950, 2003.

BACHELER, L. et al. Genotypic correlates of phenotypic resistance to efavirenz in virus isolates from patients failing nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor therapy. **J Viral**, v. 74, p. 4999- 5008, 2001.

BERGER, E. A. et al. Chemokine receptors as hiv-1 coreceptors: Roles in Viral Entry, Tropism, and Disease. **Annu.Rev. Immunol**, v. 17, p.657–700, 1999.

BRASIL. Boletim epidemiológico Aids– versão preliminar. **Ministério da Saúde**, p.1-28, 2012a.

BRASIL. Política brasileira de enfrentamento da Aids. Resultados, avanços e perspectivas. **Ministério da Saúde**, p.1-16, 2012b.

BRASIL. Boletim Epidemiológico Hepatites Virais. **Ministério da Saúde**, v.1, p. 1-176, 2012c.

BRASIL. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Adultos Vivendo com HIV/aids - Versão preliminar 2013. **Ministério da Saúde**, Secretaria de Vigilância em Saúde, Programa Nacional de DST e Aids, 2013.

BRASIL. Recomendações para Terapia Antirretroviral em Adultos Infectados pelo HIV: 2008. **Ministério da Saúde**, Secretaria de Vigilância em Saúde, Programa Nacional de DST e Aids. 7a Ed. - Brasília: Ministério da Saúde, 2008.

BUKH, J.; PURCELL, R. H.; MILLER, R. H. Sequence analysis of the 5' noncoding region of hepatitis C virus.**Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.89, p.4942-4946, 1992.

CALEGARI, C. B. et al. Epidemiological profile of patients with human immunodeficiency Virus (HIV) coinfectd with hepatitis C virus (HCV) in the clinic of dst/aids city of criciú. **DST - J bras Doenças Sex Transm.**, v.23, n.2, p. 90-94, 2011.

CAPA, L. et al. Influence of HCV genotype and co-infection with human immunodeficiency virus on CD4_ and CD8_ T-cell responses to hepatitis C virus. **J. Med. Virol.** n.79, p.503–510, 2007.

CARR, A. Toxicity of antiretroviral therapy and implications for drug development. Drug Discovery - **Nature Reviews**, v.2, p.624-634, 2003.

CARVALHO, A. Effect of M184v mutation selection and maintenance on the antiretroviral treatment response. *Cadernos de Saúde*. Lisboa. v.1, n.2, p.167-184, 2008.

CAVALCANTI, A. M. S. et al. Antiretroviral resistance in individuals presenting therapeutic failure and subtypes of the human immunodeficiency virus type 1 in the Northeast Region of Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.102, 2007.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. 1993 revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and adults. **MMWR Recomm Rep.**, v. 18, n. 41, p.1-19, 1992.

CECCHERINI-SILBERSTEIN, F. et al. Characterization and Structural Analysis of Novel Mutations in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Reverse Transcriptase Involved in the Regulation of Resistance to Nonnucleoside Inhibitors. **J Virol**. v. 81, n.20, p. 11507–11519, 2007.

CHAN, D. C. et al. Core Structure of gp41 from the HIV Envelope Glycoprotein. **Cell**, v. 89, p. 263–273, 1997.

CLAVEL, F.; HOGGAN, M. D.; WILLEY, R. L.; STREBEL, K.; MARTIN, M. A.; REPASK, E. R. Genetic recombination of human immunodeficiency virus. **J. Virol.**, v.63, n.3, p.1455-1459, 1989.

CLERICI, M. et al. Type 1 cytokine production and low prevalence of viral isolation correlate with long term non progression in HIV infection. **AIDS Res. Hum. Retroviruses**, v.12, p.1053-1061, 1996.

CONDRA, J.; HOLDER, D.; SCHLEIF, W.; et al. Genetic correlates of in vivo viral resistance to indinavir, aHIV-1 protease inhibitor. **J Virol**,v. 70, p. 8270-8276, 1996.

CORVINO, S. M.; HENRIQUES, R. M. S.; GROTTTO, R. M. T.; PARDINI, M. I. M. C. Co-infecção HIV/HCV em pacientes de Botucatu e região. **Rev. bras. epidemiol.** vol.10, n.4, p. 537-543, 2007.

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

CRAIGIE, R.; BUSHMAN, F. D. HIV DNA Integration.**Cold Spring Harb.Perspect.Med.** v.2, p. 1-18, 2012.

CULLEN, B. R. Regulation of HIV-1 gene expression. **The FASEB Journal**, v. 5, p. 2361-2368, 1991.

DE CLERQ, E. The history of antiretrovirals: key discoveries over the past 25 years. **Rev. Med. Virol.**, v.19, p.287–299, 2009.

DE CLERQ, E. Three decades of antiviral drugs. Drug Discovery - **Nature Reviews**,v.6, p.941, 2007.

DE SA-FILHO, D. J. et al. HIV type 1 pol gene diversity and antiretroviral drug resistance mutations in Santos, Brazil. **AIDS Res. Hum. Retroviruses.**, v.24, n.3, p.347-353, 2008.

DIAZ, R. S. **Guia para o manuseio de resistência antirretroviral**. 3.ed. Brasil: Permanyer Brasil publicações. 2011.

DIETERICH, D. T.; PUROW, J. M.; RAJAPAKSA, R. Activity of combination therapy with interferon alfa-2b plus ribavirin in chronic hepatitis C patients co-infected with HIV. **Semin. Liver Dis.**, v.1, p.7-94, 1999.

DODIG, M.; TAVILL, A. Hepatitis C and human immunodeficiency virus coinfection. **J Clin Gastroenterol.**, v. 33, p.367–374, 2001.

DUTOIT, V.; CIUFFREDA, D.; COMTE, D.; GONVERS, J. J.; PANTALEO, D. G. Differences in HCV-specific T cell responses between chronic HCV infection and HIV/HCV co-infection. **Eur. J. Immunol.** n.35, p.3493–3504, 2005.

FAUCI, A. S. The human immunodeficiency virus: infectivity and mechanisms of pathogenesis. **Science**, v. 239, n. 4840, p. 617-22, 1988.

FAUCI, A. S; PANTALEO, G; STANLEY, S; WEISSMAN, D. Immunopathogenic mechanisms of HIV infection. **Ann Intern Med.**, n. 124, v.7, p. 654-663, 1996.

FDA. **Antiretroviral drugs used in the treatment of HIV infection.** 2010. Disponível em: <<http://www.fda.gov/ForConsumers/byAudience/ForPatientAdvocates/HIVandAIDSActivities/ucm118915.htm>>. Acesso: 20/08/2013.

FREED, E. O. HIV-1 Gag Proteins: Diverse Functions in the Virus Life Cycle. **Virology**, v. 251, 1–15, 1998.

GALLO, R. C.; MONTAGNIER L. The discovery of HIV as the cause of AIDS. **N. Engl. J. Med.**, v. 349, n. 24, p.2283-2285, 2003.

GHOSN, J. et al. HIV-1 resistance strains acquired at the time of primary infection massively fuel the cellular reservoir and persist for lengthy periods of time. **AIDS**, v. 20, n. 2, p. 159-170, 2006.

HARCOURT, G; GOMPERTS, E.; DONFIELD, S.; KLENERMAN, P. Diminished frequency of hepatitis C virus specific interferon gamma secreting CD4_ T cells

in human immunodeficiency virus/hepatitis C virus coinfecting patients. **Gut**, n.55, p.1484–1487, 2006.

HASELTINE, W. A. Molecular biology of the human immunodeficiency virus type 1. **The FASEB Journal**, v. 5, p. 2349-2360, 1991.

HELBERT, M.; BREUER, J. Monitoring patients with HIV disease. **J. Clin. Pathol.**, v. 53, p. 266–272, 2000.

HEMELAAR, J. The origin and diversity of the HIV-1 pandemic. **Trends in Molecular Medicine**, v. 18, n. 3, p. 182-192, 2012.

HUANG, H., CHOPRA, R., VERDINE, G. L., HARRISON, S. C. Structure of a covalently trapped catalytic complex of HIV-1 reverse transcriptase: implications for drug resistance. **Science**, v.282, p.1669-75, 1998.

HUTCHINSON, J. The biology and evolution of HIV. **Annu. Rev. Anthropol.**, p. 85-108, 2001.

JOHNSON, V. A. et al. Update of the Drug Resistance Mutations in HIV-1: Fall 2006. **Special Contribution – Resistance Mutations**, v.14, n.3, p. 125-130, 2006.

JOHNSON, V. A. et al. Update of the Drug Resistance Mutations in HIV-1: Spring 2008. **Top HIV Med.** v. 16, n. 1, p. 62 – 68, 2008.

KIM, A. Y.; CHUNG, R. T. Coinfection with HIV-1 and HCV--a one-two punch. **Gastroenterology**, v.137, n.3, p.795-814, 2009.

KOUP, R. A. et al. Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome. **J. Virol.**, v. 68, p. 4650–4655, 1994.

LAL, R. B.; CHAKRABART, S.; YANG, C. Impact of genetic diversity of HIV-1 on diagnosis, anti-retroviral therapy e vaccine development. **Indian J Med Res**, v. 121, p. 287 – 314, 2005.

LARDER, B. Mechanisms of HIV-1 drug resistance. **AIDS**, v. 15, p. 27-34, 2001.

LINDENBACH, B. D.; RICE, C. M. Flaviviridade.In: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. (Eds.). **The viruses and theis replication**.Philadelphia: Fields Virology, Lippincott Williams& Wilkins, p.991-1042, 2001.

LIU, J. et al. Drug Resistance and HCV Coinfection in Former Blood Donors Infected with HIV Type 1 in China. **AIDS Res. Hum. Retroviruses** v. 27, n. 8, p. 925-930, 2011.

LIU, T. F.; SHAFER R. W. Web resours for HIV type 1 genotypc-resistance test interpretation. Clin. Infect. Dis., v. 42, n.11, p. 1608-18, 2006.

LUCAS, G. M. Anti-retroviral adherence, drug resistance, viral fitness and HIV disease progression: a tangled web is woven. **J Antimicrob Chemother**, v. 55, p. 413 – 416, 2005.

MARCELIN, A. G. et al. Clinically relevant interpretation of genotype and relationship to plasm drug concentrations for resistance to saquinavir-ritonavir in human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitor-experinced patients. **Antimicrob. Agents Chemother**, v. 48, n. 12, p. 4687-92, 2004.

MAUSS, S.; BERG, T.; ROCKSTROH, J.; SARRAZIN, C.; WEDEMEYER, H. Short Guide to Hepatitis C. **Flying Publisher**, 2013.

MONTEIRO, J. P. et al. Genetic Variability of Human immunodeficiency Virus-1 in Bahia State, Northeast, Brazil:High Diversity of HIV Genotypes. **Journal of MedicalVirology**, v. 81, p.391–399, 2009.

MORADPOUR, D.; PENIN, F.; RICE, C. M. Replication of hepatitis C virus. **Nat. Rev. Microbiol.**, v.5, n.6, p.453-463, 2007.

MUNHOZ, L. S. R. Perfil de resistência genotípica do HIV-1 em pacientes com falha na terapia antirretroviral atendidos pela Rede Nacional de Genotipagem (RENAGENO) na região de Botucatu, SP-Brasil. (Dissertação de Mestrado – Programa Pesquisa e Desenvolvimento: Biotecnologia Médica, Faculdade de Medicina de Botucatu, Unesp), 2011.

MURPHY, D. et al. A new genotype of hepatitis C virus originating from central Africa. **Hepatol.**, v.46, p.623, 2007.

NAITO, M.; HAYASHI, N.; KAMADA, T. Hepatitis C viral quasispecies in patients with type C chronic liver disease. **Nippon Rinsho**, v.53, suppl, pt. 1, p.613-617, 1995.

NOWAK, M. A. Variability of HIV Infections. **J. theor. Biol.** v. 155, p.1-20, 1992.

OLIVEROS, M. P. R. “Evolução das mutações de resistência aos inibidores de protease em paciente infectados pelo HIV-1 subtipo F”. (Tese de Doutorado, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2009).

OPERSKALSKI, E. A.; KOVACS, A. HIV/HCV Co-infection: Pathogenesis, Clinical Complications, Treatment, and New Therapeutic Technologies. **Curr HIV/AIDS Rep**, v. 8, p12–22, 2011.

PAWLOTSKY, J. M. Pathophysiology of hepatitis C virus infection and related liver disease. **Trends Microbiol.**, v.12, p.96-102, 2004.

PENNINGS, P. S. Standing Genetic Variation and the Evolution of Drug Resistance in HIV. **PLoS Computational Biology**, v. 8, n.6, p.1-13, 2012.

PIENIAZEK, D. et al. Protease sequences from HIV-1 group M subtypes A-H reveal distinct amino acid mutation patterns associated with protease resistance in protease inhibitor-naïve individuals worldwide. HIV Variant Working Group. **AIDS**, v.14, n.11, p.1489-95, 2000.

PINTO, M. E.; STRUCHINER, C. J. HIV-1 diversity: a tool for studying the pandemic. **Cad.SaúdePública**, v. 22, n.3, p. 473-484, 2006.

PIRES, I. L. et al., Prevalence of Human Immunodeficiency Virus Drug Resistance Mutations and Subtypes in Drug-Naïve, Infected Individuals in the Army Health Service of Rio de Janeiro, Brazil. **J. Clin. Microbiol.**, v.42, n. 1, p.426-430 2004.

POMMIER, Y.; JOHNSON, A. A.; MARCHAND, C. Integrase inhibitors to treat HIV/AIDS. Drug Discovery - **Nature Reviews**, v.4, p.236-248, 2005.

POTTER, S. J.; CHEW, C. B.; STEAIN, M.; DWYER, D. E.; SAKSENA, N. K. Obstacles to successful antiretroviral treatment of HIV-1 infection: problems & perspectives. **Indian J Med Res.**, v.119, n.6, p.217-37, 2004.

PRADO, J. G. et al. Relative replication fitness of multi-nucleoside analogue-resistant HIV-1 strains bearing a dipeptide insertion in the fingers subdomain of the reverse transcriptase and mutation at codons 67 and 215. **Virology**, v. 326, n.1, p.103-112, 2004.

QUINN, C. T. HIV epidemiology and the effects of antiviral therapy on long-term consequences. **AIDS**, n.22, p.7-12, 2008.

RABSON, A. B. HIV virology: Implications for the pathogenesis of HIV infection. **J. American Academy of Dermatology**, v. 22, n. 6, p. 1196-1202, 1990.

REQUEJO, H. I. Z. Worldwide molecular epidemiology of HIV.**Rev. Saúde Pública**, v. 40, p.331-345, 2006.

REUMAN, E. C. et al. Constrained patterns of covariation and clustering HIV-1 non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor resistance mutations. **J. Antimicrob. Chemother**, v. 65, n.7, p. 1477-1485, 2010.

ROBERTSON, D. L. et al. HIV-1 Nomenclature Proposal.**Science**. v. 288, n. 5463, p. 55-56, 2000.

ROBINSON, H. L. New hope for an Aids vaccine. **Nature Reviews Immunology**, n. 2, p. 239-250, 2002.

RODRIGUES, R. et al. Prevalence of ARV resistance mutations and impact of genotyping test in HIV patients with advanced disease in São Paulo, Brazil. **J. Clin. Virol.**, v. 32, n.4, p. 336-337, 2005.

SABINO, E. C. Subtipos de hiv-1 no Brasil. Epidemiologia: contextos e pluralidade. **FIOCRUZ./ABRASCO**, v. 1 p. 29-33, 1998.

SANCHES, M. et al. Structural characterization of B and non-B subtypes of HIV-protease: insights into the natural susceptibility to drug resistance development. **J Mol Biol.**, n.15; p.1029-40, 2007.

SEEFF, L. B. The history of the “natural history” of hepatitis C (1968-2009).**Liver International**, Oxford, v. 29, p. 89-99, 2009.

SHAFFER, R. W.; SCHAPIRO J. M. HIV-1 Drug Resistance Mutations: an Updated Framework for the Second Decade of HAART. **AIDS Rev.**, n.10, v.2, p.67–84, 2008.

SIMMONDS, P. et al. Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes.**Hepatology**, Baltimore, v. 42, p. 962-973, 2005.

SIMMONDS, P. Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus – 15 years. **J. Gen. Virol.**, v.85, p.3173-3188, 2004.

SORIANO, V. et al. Care of patients with hepatitis C and HIV co-infection. **AIDS**, v.18, n.1, p.1-12, 2004.

STRAUSS, E. Hepatite C. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.34, p.69-82, 2001.

SVICHER, V. et al. Involvement of Novel Human Immunodeficiency Virus Type 1 Reverse Transcriptase Mutations in the Regulation of Resistance to Nucleoside Inhibitors *Journal of Virology*, v. 80, n.14, p. 7186–7198, 2006.

TAN, X. et al.; Systematic identification of synergistic drug pairs targeting HIV. **Nature Biotechnology**, v.30, n.11, p.1125-1134, 2012.

THOMAS, D. L.; SEEFF, L. B. Natural history of hepatitis C. **Clin.Liver Dis.**, v.9 p.383–398, 2005.

TOLEDO, P. V. M. Estudo epidemiológico do perfil genotípico do HIV-1 em adultos com falha virológica a anti-retrovirais no Paraná. (Dissertação de Mestrado – Programa em Medicina Interna do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná), 2009.

UNAIDS. World AIDS Day Report. **UNAIDS**, p.1-48, 2012.

VAN MAARSEVEEN, K. et al. An increase in viral replicative capacity drives the evolution of protease inhibitor-resistant in HIV-1 infected patients. **Antivir. Ther.**, v.7, n.2, p. 123-129, 2006.

VARELLA, R. B. et al. Prevalence of resistance-associated mutations in human immunodeficiency virus type 1-positive individuals failing HAART in Rio de Janeiro, Brazil. **Braz. J. Infect. Dis.**, v.12, n.5, p.380-384, 2008.

VERAS, N. M. C. “História evolutiva do HIV-1 no Brasil”. (Tese de Doutorado, Universidade de Brasília, 2010).

WAHEED, A. A.; FREED, E. O. HIV Type 1 Gag as a Target for Antiviral Therapy. **Aids research and human retroviruses**, v. 28, n. 1, p. 54-57, 2012.

WALKER, M. R. **Guia de rotas na tecnologia de genes**. Tradução de fernando Salvador Moreno. São Paulo: Atheneu, 1999.

WALTER, H.; SCHMIDT, B.; WERWEIN, M.; SCHWINGEL, E.; KORN, K. Prediction of abacavir resistance from genotypic data: impact of zidovudine and lamivudine resistance in vitro and in vivo. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 46, p.89-94, 2002.

WANG, J. T. et al. Detection of replicative form of hepatitis C virus RNA in peripheral blood mononuclear cells. **J. Infect. Dis.** v.166, p. 1167-1169, 1992.

WHITCOMB, J. M. et al. Broad NRTI cross-resistance in HIV-1 clinical isolates. **J Infect Dis**, v. 188, p.992–1000, 2003.

WHITCOMB, J. M. et al. Hypersusceptibility to non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors in HIV-1: clinical, phenotypic and genotypic correlates. **Aids**.v. 16, p. 41-47, 2002.

WHO – World Health Organization. Hepatitis C. **Fact sheet** n. 164, 2012b.

WHO – World Health Organization. HIV Drug Resistance Report 2012.**WHO Library Cataloguing-in-Publication Data**.p.1-84, 2012a.

YERLY, S. et al. Transmission of antiretroviral-drug-resistant HIV-1 variants. **Lancet.**, v.28, n.354, p.729-733, 1999.

ZYLBERBERG, H.; POL, S. Reciprocal interaction between human immunodeficiency virus and hepatitis C virus infections. **Clin Infect Dis.**, v. 23, p. 1117–1125, 1996.

Apêndice e anexos

APÊNDICE A – Frequência de mutações conforme adesão a TARV

	Adesão adequada (n=10)*		Adesão inadequada (n=9)		P
	n	%	n	%	
ITRN					
S68G	2	20	1	11	1
K70R	2	20	2	22	1
A98S	2	20	2	22	1
E122K	5	50	6	67	0,65
D123E	4	40	3	33	1
I135T	9	90	7	78	0,582
S162C	2	20	2	22	1
K166R	2	20	2	22	1
D177E	1	10	4	44	0,141
V179I	1	10	2	22	0,582
M184V	6	60	5	56	1
T200A	3	30	4	44	0,65
I202V	3	30	1	11	0,582
R211K	3	30	2	22	1
L214F	6	60	7	78	0,628
K219E	3	30	1	11	0,582
K219Q	1	10	3	33	0,303
L228H	2	20	1	11	1
V245M	2	20	2	22	1
ITRNN					
L100I	3	30	0	0	0,211
K103N	4	40	1	11	0,303
G190A	1	10	3	33	0,303
IP					
M36I	5	50	3	33	0,65
M46I	1	10	2	22	0,582
I54V	2	20	1	11	1
V82A	2	20	1	11	1
L10I	2	20	1	11	1
T12A	2	20	1	11	1
I13V	3	30	2	22	1
K14R	2	20	3	33	0,628
I15V	6	60	3	33	0,37
G16E	4	40	0	0	0,087
E35D	2	20	1	11	1
S37E	2	20	2	22	1
S37N	7	70	4	44	0,37
R41K	4	40	3	33	1
R57K	3	30	3	33	1
Q61N	2	20	1	11	1
I62V	2	20	3	33	0,628
L63P	3	30	4	44	0,65
I64V	0	0	3	33	0,087
I72V	3	30	2	22	1
V77I	2	20	2	22	1
L89M	3	30	0	0	0,211

ITRN: Inibidor de Transcriptase Reversa análogo nucleosídeo ou nucleotídeo; ITRNN: Inibidor de Transcriptase Reversa não análogo nucleosídeo; IP: Inibidor de Protease. * Foi incluso o paciente naïve.

ANEXO A – Código de aminoácidos (Letra, símbolo e nome)

Letra	Símbolo	Nome do aminoácido
A	Ala	Alanina
C	Cis ou Cys	Cisteína
D	Asp	Aspartato
E	Glu	Glutamato
F	Fen ou Phe	Fenilalanina
G	Gli ou Gly	Glicina
H	His	Histidina
I	Ile	Isoleucina
K	Lis ou Lys	Lisina
L	Leu	Leucina
M	Met	Metionina
N	Asn	Asparagina
P	Pro	Prolina
Q	Gln	Glutamina
R	Arg	Arginina
S	Ser	Serina
T	Ter ou Thr	Treonina
V	Val	Valina
W	Trp	Triptofano
Y	Tir ou Tyr	Tirosina

ANEXO B – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)



Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Medicina de Botucatu

Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P.
CEP: 13.618-970

Fone/Fax: (0xx14) 3811-6143

e-mail: secretaria_capelluppi@fmb.unesp.br

e-mail: coordenadora_tsarcon@fmb.unesp.br



Registrado no Ministério da Saúde
em 01 de abril de 1997

Botucatu, 02 de julho de 2012

327/2012-CEP

Ilustríssima Senhora

Prof^ª. Dr^ª. Rejane Maria Tommasini Grotto

Divisão de Hemocentro da

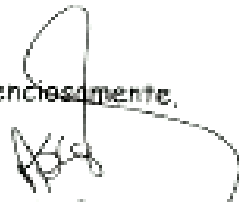
Faculdade de Medicina de Botucatu

Prezada Dr^ª. Rejane,

De ordem do Senhor Coordenador deste CEP, informo que o Projeto de Pesquisa (Protocolo CEP 4265-2012) "Avaliação do perfil de mutações e resistência aos inibidores de transcriptase reversa e protease em variantes do Virus da Imunodeficiência Humana (HIV) circulantes em pacientes coinfectados pelo Virus da Hepatite C (VHC)", a ser conduzido por Andressa Alves de Almeida Cruz, orientada por Vossa Senhoria, co-orientada pela Prof^ª. Dr^ª. Maria Inês de Moura Campos Pardini, com a colaboração de Alexandre Naime Barbosa, Giovanni Faria Silva, Lenice do Rosário de Souza e Sarita Fiorelli Dias Barreto, recebeu do relator parecer favorável, aprovado em reunião de 02/07/2012.

Situação do Projeto: APROVADO. Os pesquisadores deverão apresentar ao CEP ao final da execução do Projeto o "Relatório Final de Atividades".

Atenciosamente,


Alberto Santos Capelluppi
Secretário do CEP