

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Instituto de Bioquímica Médica

**DISTRIBUIÇÃO DOS POLIMORFISMOS DO GENE *ABCB1* NA POPULAÇÃO
BRASILEIRA E SUA IMPORTÂNCIA NA FARMACOCINÉTICA DOS
INIBIDORES DE PROTEASE VIRAL**

RITA DE CÁSSIA ELIAS ESTRELA
Tese de Doutorado

Guilherme Suarez Kurtz
Prof. Titular de Farmacologia, UFRJ

Rio de Janeiro 2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

DISTRIBUIÇÃO DOS POLIMORFISMOS DO GENE *ABCB1* NA POPULAÇÃO
BRASILEIRA E SUA IMPORTÂNCIA NA FARMACOCINÉTICA DOS INIBIDORES
DE PROTEASE VIRAL

Rita de Cássia Elias Estrela

Tese submetida ao corpo docente do Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos
necessários à obtenção do grau de Doutor em Ciências

Aprovada por:

Prof. Guilherme Suarez Kurtz (Orientador)

Prof^a. Mara Helena Hutz

Prof. Francisco José Roma Paumgarten

Prof. Carlos Frederico Leite Fontes

Prof. Marcelo Alex Carvalho (Suplente Externo)

Prof. Franklin David Rumjanek (Revisor)

Rio de Janeiro, novembro de 2007.

FICHA CATALOGRÁFICA

Estrela, Rita de Cássia Elias
DISTRIBUIÇÃO DOS POLIMORFISMOS DO GENE *ABCB1* NA
POPULAÇÃO BRASILEIRA E SUA IMPORTÂNCIA NA
FARMACOCINÉTICA DOS INIBIDORES DE PROTEASE VIRAL / Rita de
Cássia Elias Estrela Marins– Rio de Janeiro, 2003.
xx, 227f.

Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade do Rio de Janeiro – UFRJ.
Centro de Ciências da Saúde, Instituto de Bioquímica Médica, 2007

Orientador: Guilherme Suarez-Kurtz

1. lopinavir 2. ritonavir 3. P-glicoproteína 4. *CYP3A5* 5. polimorfismos
genéticos– Teses. I. Guilherme Suarez-Kurtz (orientador). II. Universidade
Federal do Rio de Janeiro. Centro de Ciências da Saúde. Instituto de
Bioquímica Médica. III. Título.

Tese realizada no INSTITUTO DE BIOQUÍMICA MÉDICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO-UFRJ e no INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER - INCa, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Grau de Doutor em Ciências, sob a orientação do Professor Guilherme Suarez-Kurtz.

Esta tese é dedicada à minha querida avó
Francelina (*in memoriam*) e ao meu amigo,
companheiro e grande amor da minha vida,
Mauro.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Guilherme Suarez Kurtz por ter me acolhido em seu laboratório, a cerca de 11 anos, desde minha iniciação científica. Por compartilhar sua experiência profissional ao longo desses anos, por tudo que aprendi com ele a respeito de vários assuntos, e por todas as oportunidades que me proporcionou e por ter me impulsionado no início da minha carreira. Considero o Guilherme um amigo e ao mesmo tempo meu ídolo.

Ao Dr. Paulo Feijó Barroso pela colaboração no HUCFF.

A todos os médicos que encaminharam seus pacientes para o protocolo desenvolvido neste trabalho, em especial a Dra Branca e Tânia Vergara.

Ao Dr. Emmanuel Dias Neto e a Sheila Purin Gregório pela oportunidade de aprendizado e desenvolvimento de boa parte de minha tese em seu laboratório, no Instituto de Psiquiatria da USP.

À Dra. Mari Tuyama que me ajudou durante o período de recrutamento e coleta de amostras dos pacientes HIV⁺.

A toda equipe do laboratório do HUCFF chefiado por Maria de Fátima Melo, responsável pela coleta de sangue e pelos exames laboratoriais dos pacientes.

Aos meus fiéis amigos e alunos Fabio Schneider Ribeiro, Renato Sampaio Carvalho e Brayan Seixas Viegas que sem dúvida alguma foram essenciais nesta tese não só pelo trabalho e discussão científica, mas também pelo carinho.

Às técnicas, Nívea, Taline, Ana Carolina e Vanessa, que passaram pelo laboratório bioanalítico durante o período de execução desta tese, pelo excelente trabalho.

À minha querida amiga Myriam Salvatori, que mesmo estando longe e não fazendo mais parte do laboratório revisou um dos trabalhos enviados para publicação.

À Lílían, secretária da Divisão de Farmacologia por sua eficiência e amizade.

Aos amigos do laboratório e de toda a vida que eu tanto amo, Cristiano (Bagé), Cyntia e Ticiane que mesmo sem saber sempre me ajudaram a prosseguir neste longo caminho.

A todos os companheiros de laboratório pelo agradável convívio.

À Ana Beatriz Santoro por ter aceitado colaborar em uma parte do trabalho, que resultou em uma publicação.

A todos os voluntários que participaram desta tese.

Aos doadores anônimos de sêmen que deixaram os pudores de lado em prol da ciência.

Aos pacientes portadores do vírus HIV que participaram deste trabalho possibilitando um melhor entendimento a respeito de seu tratamento com os anti-retrovirais.

Aos meus irmãos “pequenos” Hanna, Bruno e André que são pessoas maravilhosas e sempre souberam levantar minha auto-estima.

Ao Paulo meu “paidrastrô” que sempre foi meu exemplo profissional a ser seguido.

À minha linda e queridíssima mãe que é a mulher mais guerreira que eu conheço e sem dúvida nenhuma sem ela nada disso teria acontecido.

E finalmente ao Mauro meu marido, companheiro, namorado e amigo. Até a última linha desta tese estive ao meu lado me apoiando e muitas vezes não dormindo para me acompanhar. Em todos os momentos, felizes ou nem tanto, sempre tivemos um ao outro e depois desta tese esse amor consegue ser ainda maior.

RESUMO

Desde o advento da terapia anti-retroviral altamente ativa (HAART), tem sido observada significativa diminuição na morbidade e mortalidade devido o HIV. O HIV é predominantemente transmitido através da via sexual. O trato genital masculino é considerado um compartimento biologicamente separado, no qual o vírus pode estar sob outras pressões de seletividade quando comparado com os vírus do sangue. Um exemplo é o da baixa penetração dos anti-retrovirais neste compartimento.

Em um estudo piloto, nós observamos uma pobre penetração e ampla variabilidade interindividual nos níveis de lopinavir (LPV) e ritonavir (RTV) no trato genital masculino. A penetração dos inibidores de protease no compartimento genital é modulada por vários fatores, especialmente ligação a proteínas plasmáticas e afinidade pelos transportadores de múltiplas drogas, glicoproteína P (Pgp). Além disso, essa variabilidade farmacocinética pode ser parcialmente atribuída à extensa metabolização hepática dos inibidores de protease através das CYP3A4/5 (isoformas do citocromo P450).

A Pgp, uma proteína transmembrana codificada pelo gene *ABCB1* (*MDR1*), é uma bomba de efluxo de vários substratos estruturalmente não relacionados, tais como antidepressivos, antiepiléticos, inibidores de protease do HIV e outros. O gene *ABCB1* é altamente polimórfico, com mais de 50 polimorfismos de uma única base (SNPs). Três SNPs exônicos, têm sido os mais estudados: dois deles (236C>T and 3435C>T) são silenciosos, e um terceiro, 2677G>T/A no exon 21 levando a troca de aminoácidos (Ala893Ser/Thr).

Para estudar os polimorfismos de *ABCB1*, nós investigamos primeiro o impacto da estratificação da população na distribuição de três polimorfismos de *ABCB1* (1236C>T, 2677G>T/A e 3435C>T) entre brasileiros sadios. Nós comparamos a eficácia da etnia auto-declarada e a classificação baseada em marcadores de ancestralidade bio-geográficos, e mostramos que a frequência desses polimorfismos varia de acordo com a abordagem utilizada para determinar a ancestralidade.

Nós também investigamos o efeito dos polimorfismos de *ABCB1* na farmacocinética de LPV e RTV e na expressão e atividade da Pgp em células CD4⁺ de pacientes HIV1⁺. Nenhuma correlação foi observada entre os polimorfismos de *ABCB1* e as concentrações plasmáticas mínimas de LPV e RTV ou a expressão e atividade de Pgp em células CD4⁺.

O gene *CYP3A5* também é altamente polimórfico. Nós estudamos o efeito da presença de dois, um ou zero alelos funcionais de *CYP3A5* na farmacocinética de LPV e RTV em homens infectados com o HIV. Nós não encontramos diferenças significativas entre os grupos para LPV ou RTV. Esses resultados indicam que os polimorfismos de *CYP3A5* não afetam a farmacocinética de LPV ou RTV em homens infectados com HIV em um regime estável de HAART.

ABSTRACT

Since the advent of highly active antiretroviral therapy (HAART), significant decreases in morbidity and mortality due to HIV have been observed. The HIV is predominantly transmitted through sexual route. The male genital tract is considered a biologically separate compartment, in which the virus may be under different other selective pressures than the virus in the blood. This is consistent with the small penetration of antiretrovirals drugs in this compartment.

In a pilot study, we observed a poor penetration and marked interindividual variability in the levels of lopinavir (LPV) and ritonavir (RTV) in the male genital tract. The penetration of protease inhibitors in the genital compartment is modulated by several factors, especially binding to plasma proteins and affinity for the multidrug transporter, P glycoprotein (Pgp). Moreover, this pharmacokinetic variability may also result from the extended hepatic metabolism of the protease inhibitors through CYP3A4/5 (cytochrome P450 isoforms).

Pgp, a transmembrane protein encoded by the *ABCB1* (MDR1) gene, is an efflux pump for a wide range of structurally unrelated substrates, such as antidepressants, antiepileptics, HIV protease inhibitors and others. The *ABCB1* gene is highly polymorphic, displaying over 50 single nucleotide polymorphisms (SNPs). Three exonic SNPs, have been most extensively studied: two of them (1236C>T and 3435C>T) are silent, whereas the third, 2677G>T/A in exon 21 leads to aminoacid changes (Ala893Ser/Thr).

To study the *ABCB1* polymorphisms, we first investigated the impact of population stratification on the distribution of three *ABCB1* polymorphisms (1236C>T, 2677G>T/A and 3435C>T) among healthy Brazilians. We compare the

effectiveness of self-reported ethnicity and marker-based biogeographical ancestry classifications and show that the frequency of these polymorphisms varies according to the approach used to determine ancestry.

We also investigated the effect of *ABCB1* polymorphism on LPV and RTV pharmacokinetics and on the expression and activity of Pgp in CD4⁺ cells of HIV positive patients. No correlation was observed between the *ABCB1* polymorphisms and trough concentrations of LPV and RTV, or CD4⁺ cells Pgp expression and activity.

The *CYP3A5* gene is also highly polymorphic. We have studied the effect of the presence of two, one or zero functional alleles of *CYP3A5* on LPV and RTV pharmacokinetics in HIV infected men. No statistical significance inter-group differences for either LPV or RTV were observed. These results indicate that the *CYP3A5* polymorphisms do not affect the pharmacokinetics of LPV or RTV in HIV-infected males on a stable HAART regimen.

ABREVIACES E SBOLOS

3TC	lamivudina
ABC	abacavir
<i>ABCB1</i>	gene que codifica a glicoproteína P
ACA	componente de ancestralidade africana
AIDS	síndrome da imunodeficiência adquirida (acquired immunodeficiency syndrome)
AIMS	marcadores informativos de ancestralidade
ANRT	inibidor análogo nucleosídico de transcriptase reversa
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ARV	anti-heroviral
AZT	zidovudina
CYP450	citocromo P450
CLAE-EM/EM	cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector por espectrometria de massas em série
$C_{máx}$	concentração máxima
C_{min}	concentração mínima
D4T	estavudina
DDI	didanosina
dNTP	desoxirribonucleotídeos fosfatados
ddNTP	dideoxi nucleosídeo trifosfatos
DP	desvio padrão
EDTA	etilenodiaminotetra cético
EFL	efluxo
FDA	food and drug administration
FS	forward scatter
HAART	terapia anti-retroviral altamente ativa
HIV	vírus da imunodeficiência humana
IPs	inibidores da protease
LPV	lopinavir
MDR1	transportador de resistência a mtiplas drogas do tipo 1
MIF	mediana de intensidade de fluorescência
MRM	monitoramento de mtiplas reações
NANTR	inibidor não análogo nucleosídico de transcriptase reversa

OMS	Organização Mundial de Saúde
PBMCs	células mononucleares do plasma sanguíneo
PCR	Reação de Polimerização em Cadeia
Pgp	glicoproteína P
RTV	ritonavir
SD	side scatter
SNPs	single nucleotide polymorphisms
SQV	saquinavir
TNF	tenofovir
VPL	verapamil

ÍNDICE DE FIGURAS	página
Figura 1 - Microfotografia do vírus HIV ao sair de um linfócito	25
Figura 2. - Estrutura do HIV	25
Figura 3.- Ciclo de replicação do HIV	27
Figura 4.- Ciclo do HIV e ação da terapia anti-retroviral	30
Figura 5.- Função da Pgp	34
Figura 6.- Distribuição da Pgp nos tecidos	35
Figura 7.- Representação esquemática da estrutura secundária da Pgp, com as substituições de nucleotídeo conhecidas (sinônimas e não-sinônimas).	39
Figura 8.- Representação diagramática de proteínas envolvidas na disposição de ARVs e sua localização no organismo	41
Figura 9. - Gel de agarose 1% com os amplicons dos exons 12, 21 e 26 do gene <i>ABCB1</i> de uma reação de PCR multiplex	51
Figura 10. - Genotipagem por seqüenciamento de base única para os três SNPs estudados (C1236T, G2677T/A e C3425T)	53
Figura 11.- Dot plot e Histograma na análise da expressão de Pgp	58
Figura 12.- Dot plot em FL1 e Histograma na análise do efluxo de Rod123 pela Pgp	59
Figura 13.- Regressão linear para LPV (A) e RTV (B) no plasma sangüíneo versus fração livre	77
Figura 14.- Regressão linear para LPV (A) e RTV (B) no plasma sangüíneo versus saliva	78
Figura 15.- Regressão linear para LPV (A) e RTV (B) na fração livre versus saliva	78
Figura 16.- Distribuição das concentrações de Lopinavir em relação ao genótipo do locus 1236 no plasma, sêmen, saliva e fração livre	81
Figura 17. - Distribuição das concentrações de Ritonavir em relação ao genótipo do locus 1236 no plasma, sêmen, saliva e fração livre	82

Figura 18. - Distribuição das concentrações de Lopinavir em relação ao genótipo do locus 2677 no plasma, sêmen, saliva e fração livre	83
Figura 19. - Distribuição das concentrações de Ritonavir em relação ao genótipo do locus 2677 no plasma, sêmen, saliva e fração livre	84
Figura 20. - Distribuição das concentrações de Lopinavir em relação ao genótipo do locus 3435 no plasma, sêmen, saliva e fração livre	85
Figura 21. - Distribuição das concentrações de Ritonavir em relação ao genótipo do locus 3435 no plasma, sêmen, saliva e fração livre	86
Figura 22. - Expressão da Pgp em células CD4+ (expressa em média de intensidade de fluorescência) em relação aos polimorfismos do gene <i>ABCB1</i>	88
Figura 23. - Funcionalidade da Pgp expressa pela porcentagem de efluxo de Rod123, em células T CD4+ em relação aos polimorfismos do gene <i>ABCB1</i>	89

ÍNDICE DE TABELAS	página
Tabela 1.- Medicamentos anti-retrovirais disponíveis	29
Tabela 2.- Substratos, inibidores e indutores de Pgp	37
Tabela 3.- Coletas de sangue dos pacientes HIV1 ⁺ , volume de amostra e finalidade da coleta	48
Tabela 4.- Oligos utilizados na PCR multiplex de <i>ABCB1</i>	51
Tabela 5.- Oligo interno para genotipagem de <i>ABCB1</i> por seqüenciamento de uma única base	52
Tabela 6.- Oligos utilizados nas PCRs de <i>CYP3A5</i>	53
Tabela 7.- Distribuição das células mononucleares para a análise de citometria de fluxo	55
Tabela 8.- Anticorpos utilizados no ensaio de citometria de fluxo	56
Tabela 9.- Distribuição das freqüências alélica e genotípica dos polimorfismos de <i>ABCB1</i> para pacientes HIV1 ⁺	70
Tabela 10.- Freqüência haplotípica de <i>ABCB1</i> para pacientes HIV1 ⁺	70
Tabela 11.- Estatística das concentrações de LPV no plasma sangüíneo, seminal, saliva e fração livre	72
Tabela 12 - Estatística das concentrações de RTV no plasma sangüíneo, seminal, saliva e fração livre	73
Tabela 13.- Estatística descritiva para as razões das concentrações (%) de LPV em saliva/plasma, saliva/fração livre, sêmen/plasma, fração livre/plasma e sêmen/fração livre	74
Tabela 14.- Estatística descritiva para as razões das concentrações (%) de RTV em saliva/plasma, saliva/fração livre, sêmen/plasma, fração livre/plasma e sêmen/fração livre	74
Tabela 15.- Correlação (R) e nível de significância (P valor) dos níveis de Lopinavir ou Ritonavir em diferentes matrizes	77
Tabela 16.- Medianas (faixa) das concentrações de Lopinavir (ng/mL) para os genótipos do locus 1236 de <i>ABCB1</i>	80

Tabela 17.- Medianas (faixa) das concentrações de Ritonavir (ng/mL) para os genótipos do locus 1236 de <i>ABCB1</i>	81
Tabela 18.- Medianas (faixa) das concentrações de Lopinavir (ng/mL) para os genótipos do locus 2677 de <i>ABCB1</i>	82
Tabela 19 - Medianas (faixa) das concentrações de Ritonavir (ng/mL) para os genótipos do locus 2677 de <i>ABCB1</i>	83
Tabela 20.- Medianas (faixa) das concentrações de Lopinavir (ng/mL) para os genótipos do locus 3435 de <i>ABCB1</i>	84
Tabela 21.- Medianas (faixa) das concentrações de Ritonavir (ng/mL) para os genótipos do locus 3435 de <i>ABCB1</i>	85

ÍNDICE GERAL	página
1. INTRODUÇÃO	21
1.1. SÍNDROME DA IMUNODEFICIÊNCIA ADQUIRIDA (AIDS)	21
1.2. A AIDS NO BRASIL	22
1.3. VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA ADQUIRIDA (HIV)	23
1.4. OS ANTI-RETROVIRAIS (ARVs)	28
1.4.1 Os Inibidores de Protease (IPs)	31
1.4.1.1 Distribuição dos IPs em sítios santuários virais/trato genital masculino	31
1.4.1.2 O IP Kaletra®, suas indicações terapêuticas e farmacocinética	32
1.5 GLICOPROTEÍNA-P (Pgp)	33
1.5.1 Função da Pgp	34
1.5.2 Localização da Pgp	34
1.5.3 Substratos de Pgp	35
1.5.4 Polimorfismo no gene <i>ABCB1</i>	38
1.5.5 Importância da Pgp no tratamento com IPs	39
1.6 Outros transportadores com relevância no tratamento ARV	40
1.7 A <i>CYP3A5</i> no tratamento com inibidores de protease	41
1.8 Relação da etnia com os polimorfismos de <i>ABCB1</i>	42
2. OBJETIVOS	43
2.1 Objetivo Principal	43
2.2 Objetivos Secundários	43

3. MATERIAIS E MÉTODOS	45
3.1. População estudada	45
3.2 Coleta e tratamento das amostras de pacientes	46
3.2.1 Sêmen	47
3.2.2 Saliva	48
3.2.3 Sangue	48
3.2.3.1 Extração de DNA	49
3.2.3.2 Amostra de plasma	49
3.2.3.3 Amostra de células mononucleares de sangue periférico (PBMCs)	49
3.3. Ética	50
3.4. Genotipagem	50
3.4.1 <i>ABCB1</i>	50
3.4.2 <i>CYP3A5</i>	53
3.5 Metodologia analítica utilizada na determinação de LPV e RTV em plasma sangüíneo e seminal, saliva e fração livre	54
3.6. Determinação de funcionalidade e expressão da Pgp em linfócitos T CD4 ⁺	55
3.7. Análises estatísticas	59
 4. RESULTADOS e DISCUSSÃO	 61
4.1 Estudo piloto da penetração de LPV e RTV no trato genital de homens infectados com HIV-1	61
4.2 Impacto da miscigenação brasileira na distribuição de polimorfismos de <i>ABCB1</i> em voluntários sadios	64
4.3 Influência dos polimorfismos de <i>ABCB1</i> na distribuição de LPV e RTV em indivíduos HIV1 ⁺	69

4.3.1 Distribuição alélica e genotípica dos polimorfismos de <i>ABCB1</i> em pacientes HIV ⁺	70
4.3.2 Níveis de LPV e RTV nos plasmas sangüíneo e seminal, na saliva e na fração livre no sangue	71
4.3.3 Relação dos polimorfismos de <i>ABCB1</i> e os níveis de LPV e RTV em diferentes matrizes	79
4.3.4 Correlação entre o genótipo de <i>ABCB1</i> e a expressão e funcionalidade da Pgp em linfócitos de indivíduos HIV1 positivos	87
4.4 Relevância do genótipo de <i>CYP3A5</i> nas concentrações plasmáticas de LPV e RTV em indivíduos HIV1 ⁺	91
5. CONCLUSÃO	93
6. REFERÊNCIAS	94

ANEXOS	103
ANEXO A – Projeto submetido ao Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF)- UFRJ e Instituto Nacional do Câncer (INCA)	103
ANEXO B – Aprovação do projeto pelo HUCFF	133
ANEXO C – Aprovação do projeto pelo INCA	135
ANEXO D – Termo de consentimento livre e esclarecido no recrutamento de indivíduos HIV1 ⁺	137
ANEXO E – Questionários aplicados no estudo	141
ANEXO F – Parecer sobre a emenda no protocolo clínico submetido ao HUCFF	155
ANEXO G – Tabela com os dados individuais dos pacientes HIV1 ⁺	158
APÊNDICES	163
APÊNDICE A – “Determination of lopinavir and ritonavir in blood plasma, seminal plasma, saliva and plasma ultra-filtrate by Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry Detection.”	163
APÊNDICE B – “Limited Penetration of Lopinavir and Ritonavir in the Genital Tract of Men Infected with HIV-1 in Brazil”	186
APÊNDICE C – “The distribution of <i>ABCB1</i> polymorphisms among Brazilians: Impact of population admixture.”	188
APÊNDICE D – “ <i>CYP3A5</i> Genotype has no Impact on Plasma Concentrations of Lopinavir and Ritonavir in HIV-infected Subjects”	216
CURRICULUM VITAE	226

1. INTRODUÇÃO

1.1. SÍNDROME DA IMUNODEFICIÊNCIA ADQUIRIDA (AIDS)

A síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) foi reconhecida em meados de 1981, nos EUA, a partir da identificação de um número elevado de pacientes adultos do sexo masculino, homossexuais moradores de São Francisco e Nova York, que apresentavam sarcoma de Kaposi, pneumonia por *Pneumocytis carinii* e comprometimento do sistema imune, o que levou à conclusão de que se tratava de uma nova doença.

A AIDS é a manifestação clínica (manifestação de sinais, sintomas e/ou resultados laboratoriais que indiquem deficiência imunológica) da infecção pelo vírus HIV que leva, em média, oito anos para se desenvolver, e que resulta no enfraquecimento do sistema imunitário responsável pela defesa do organismo contra as infecções e doenças em geral (<http://www.aids.org.br>).

Existem vários sinais do desenvolvimento da síndrome, incluindo-se entre os mais freqüentes: emagrecimento com perda de mais de 10% do peso corporal, diarreia prolongada, febre persistente, tosse seca e sem motivo aparente, suores noturnos, fadiga permanente, candidíase persistente – oral ou vaginal (<http://www.aids.org.br>).

Esta síndrome tem alarmado todo o mundo, por se tratar de uma doença que ainda não possui cura e por ser transmitida principalmente por via sangüínea, sexual e vertical (da mãe para o filho, durante a gestação) (<http://www.saude.gov.br>).

1.2. A AIDS NO BRASIL

No Brasil, desde a identificação do primeiro caso de AIDS, em 1980, até junho de 2006, já foram reconhecidos cerca de 433 mil casos da doença.

Até metade da década de 90, as taxas de incidência - número de casos novos de AIDS dividido pela população - foram crescentes, chegando a alcançar, em 1998, cerca de 19 casos de AIDS por 100 mil habitantes. Do total de casos, cerca de 80% estavam concentrados nas regiões Sudeste e Sul. Contudo, apesar das altas taxas de incidência e de serem as regiões mais atingidas desde o início da epidemia, o Sudeste e o Sul são as regiões que seguem em um processo de estabilização, ainda que lento, desde 1998. Para as demais regiões, mantém-se a tendência de crescimento nas taxas de incidência, principalmente nas regiões Norte (com destaque para Roraima) e Centro-Oeste.

No Brasil, a AIDS tem se configurado como sub-epidemia, tendo atingido, de forma bastante intensa, os usuários de drogas injetáveis, homossexuais e, no início da década de 80, os indivíduos que receberam transfusão de sangue e hemoderivados (hemácias, plasma, plaquetas, etc). Mais recentemente, a taxa de incidência de AIDS mantém-se, ainda, em patamares elevados - em 18 casos por 100 mil habitantes - basicamente devido à persistência da tendência de crescimento entre as mulheres. Apresentou declínio em menores de 5 anos e no sexo masculino, com redução das taxas de incidência nas faixas etárias de 13 a 29 anos e crescimento nas faixas superiores, principalmente a partir de 40 anos. Observou-se também, para o sexo masculino, estabilidade na proporção de casos devido à transmissão homo/bissexual, aumento proporcional da heterossexual e redução importante e persistente dos casos em usuários de drogas injetáveis. Entre as mulheres, observa-se, após 1998, a tendência à estabilidade entre

aquelas na faixa de 13 a 24 anos, com crescimento persistente em praticamente todas as outras faixas etárias.

O país acumulou cerca de 183 mil óbitos devido à AIDS até dezembro de 2005, com taxas de mortalidade crescentes até meados da década de 90, estabilizando-se em cerca de 11 mil óbitos anuais desde 1998. Após a introdução da política de acesso universal ao tratamento anti-retroviral (ARV), que combina fármacos com diferentes mecanismos de ação (HAART), observou-se uma importante queda na taxa de mortalidade. A partir do ano 2000, essa taxa se estabilizou em cerca de 6,4 óbitos por 100 mil habitantes, sendo esta estabilização mais evidente em São Paulo e no Distrito Federal.

A notificação de casos de AIDS é obrigatória, desde 1986, para médicos e outros profissionais de saúde no exercício da profissão, bem como para responsáveis por organizações e estabelecimentos públicos e particulares de saúde em conformidade com a lei e recomendações do Ministério da Saúde (Lei 6259 de 30/10/1975 e Portaria nº 05 de 21/02/2006 e publicada no D.O.U. de 22/02/2006, Seção 1 página 34) (<http://www.aids.gov.br/data/Pages/LUMISD3352823PTBRIE.htm>).

1.3. VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA ADQUIRIDA (HIV)

Os vírus são microorganismos que possuem apenas um tipo de ácido nucléico (RNA ou DNA), necessitam de ribossomas ou outras organelas subcelulares e não possuem sistema de produção de energia. Portanto, os vírus dependem das células que infectam para obter as moléculas precursoras e enzimas destinadas à sua replicação (Smith *et al.*, 1985).

O HIV é um retrovírus (Figura 1), ou seja, é um vírus com genoma de RNA, que infecta as células e através da sua enzima transcriptase reversa, produz uma cópia do seu genoma em DNA e incorpora o seu próprio genoma no genoma humano, localizado no núcleo da célula infectada. O HIV é quase certamente derivado do vírus da imunodeficiência símia. Há dois vírus HIV, o HIV que causa a SIDA/AIDS típica, presente em todo o mundo, e o HIV-2, que causa uma doença semelhante, mais frequente na África Ocidental e também existente em Portugal. Existem nove subtipos principais do HIV1 classificados de subtipos "A" a "H", além do subtipo "O", que muitas vezes não é detectado pelos testes anti-HIV mais comuns.

A estrutura do HIV é basicamente formada por um envelope protéico, com duas proteínas principais, a GP120 e GP41 que formam o conjunto GP160 - e uma cápsula interna de proteínas e lipídios, dentro da qual se encontra seu genoma estruturado em RNA (Figura 2). Dentro da cápsula interna existem mais cinco proteínas importantes: a transcriptase reversa, a VER, a TAT, a integrase e a protease. Todas essas cinco proteínas participam do processo de conversão do RNA do vírus para DNA, que se une ao DNA da célula (linfócito T4). Dentre estas proteínas, a transcriptase reversa desempenha o papel principal para que o HIV realize o seu processo de infecção (Figura 2) (<http://www.spcd.org.br/prevencao02.htm>).

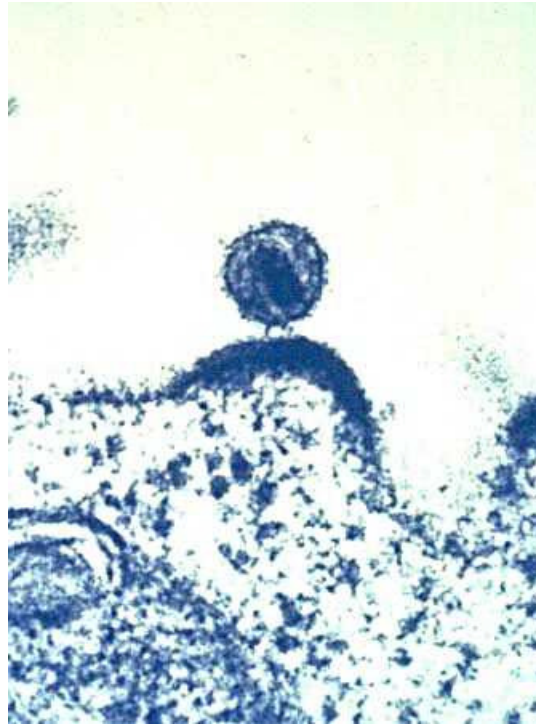


Figura 1. Microfotografia do vírus HIV ao sair de um linfócito (pt.wikipedia.org/wiki/S%C3%ADndrome_da_imunodefici%C3%A2ncia_adquirida)

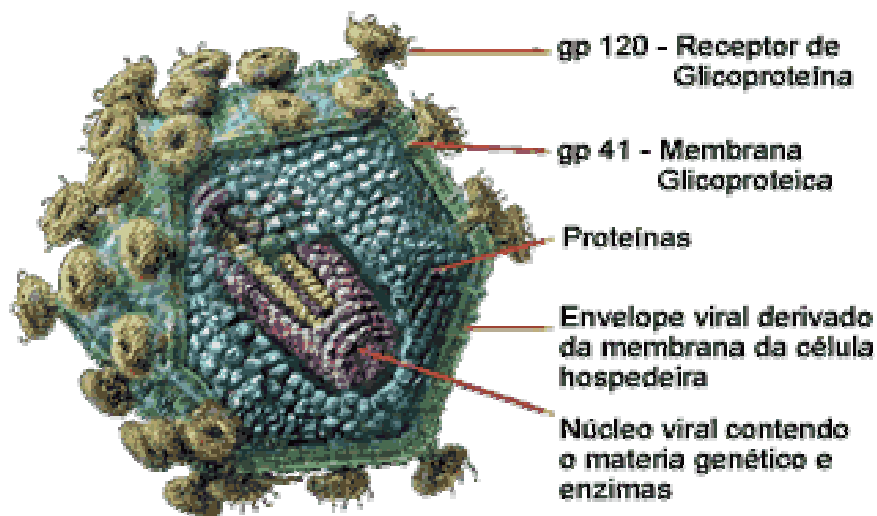


Figura 2. Estrutura do HIV (<http://www.spcd.org.br/prevencao02.htm>)

O ciclo vital de replicação do HIV na célula humana passa pelas seguintes etapas (VOET & VOET, 1990; HAYDEN, 1996; <http://www.aidsmap.com/cms1173853.asp>) (Figura 3):

- Ligação de glicoproteínas virais (gp120) ao receptor específico da superfície celular (principalmente células T-CD4⁺);

- Uma vez unido à CD4, o HIV ativa outras proteínas na superfície da célula humana, conhecidas como CCR5 e CXCR4;
- Fusão do envelope do vírus com a membrana da célula hospedeira;
- Liberação do nucleocapsídeo do vírus para o citoplasma da célula hospedeira;
- Transcrição reversa do RNA viral em DNA complementar, dependente da enzima transcriptase reversa;
- Transporte do DNA complementar para o núcleo da célula, onde pode haver integração do genoma celular (provírus), dependente da enzima integrase, ou a permanência em forma circular, isoladamente;
- O provírus é reativado, e produz RNA mensageiro viral, indo para o citoplasma da célula;
- Proteínas virais são produzidas e quebradas em subunidades, por intermédio de protease viral;
- As proteínas virais produzidas regulam a síntese de novos genomas virais, e formam a estrutura externa de outros vírus que serão liberados pela célula hospedeira;
- O vírus recém formado é liberado para o meio circundante da célula hospedeira, podendo permanecer no fluído extracelular, ou infectar novas células;

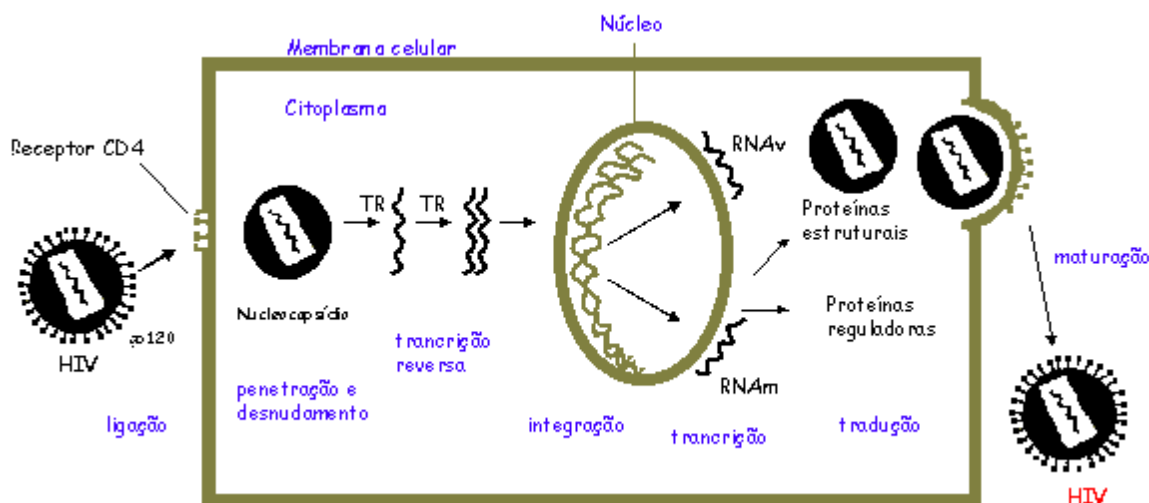


Figura 3. Ciclo de replicação do HIV (Hayden *et al*, 1996).

Como descrito acima, a evolução natural da infecção pelo HIV caracteriza-se por intensa e contínua replicação viral, que resulta, principalmente, na destruição de células T-CD4⁺. A depleção progressiva do pool de células T-CD4⁺, em conjunto com outras alterações do sistema imune, leva à imunodeficiência.

A interferência em qualquer uma das etapas do ciclo de replicação do vírus impede a multiplicação e/ou liberação de novos vírus. Dessa forma, a supressão da replicação viral é fundamental para que se possa diminuir ou reverter o dano imunológico.

1.4. OS ANTI-RETROVIRAIS (ARVs)

O vírus HIV tem a capacidade de infectar células selecionadas do sistema imune, levando a progressiva disfunção imune, doenças oportunistas e morte. Como a epidemia de HIV já ocorre há mais de duas décadas, muitos conhecimentos têm sido ganhos sobre a replicação e patogênese virais e esses conhecimentos têm dado base para o desenvolvimento de fármacos. Agentes que têm como alvo a etapa inicial do ciclo viral, podem prevenir infecções de novas células, enquanto que agentes que bloqueiam fases posteriores podem prevenir infecções crônicas. Entretanto, algumas propriedades do vírus HIV trazem dificuldades para o sucesso da terapia farmacológica, tais como: variação antigênica, capacidade de difundir-se célula-a-célula e latência viral, mutação rápida com geração de linhagem resistente, e infecção completa de células do sistema imune (Neuzil *et al*, 1994).

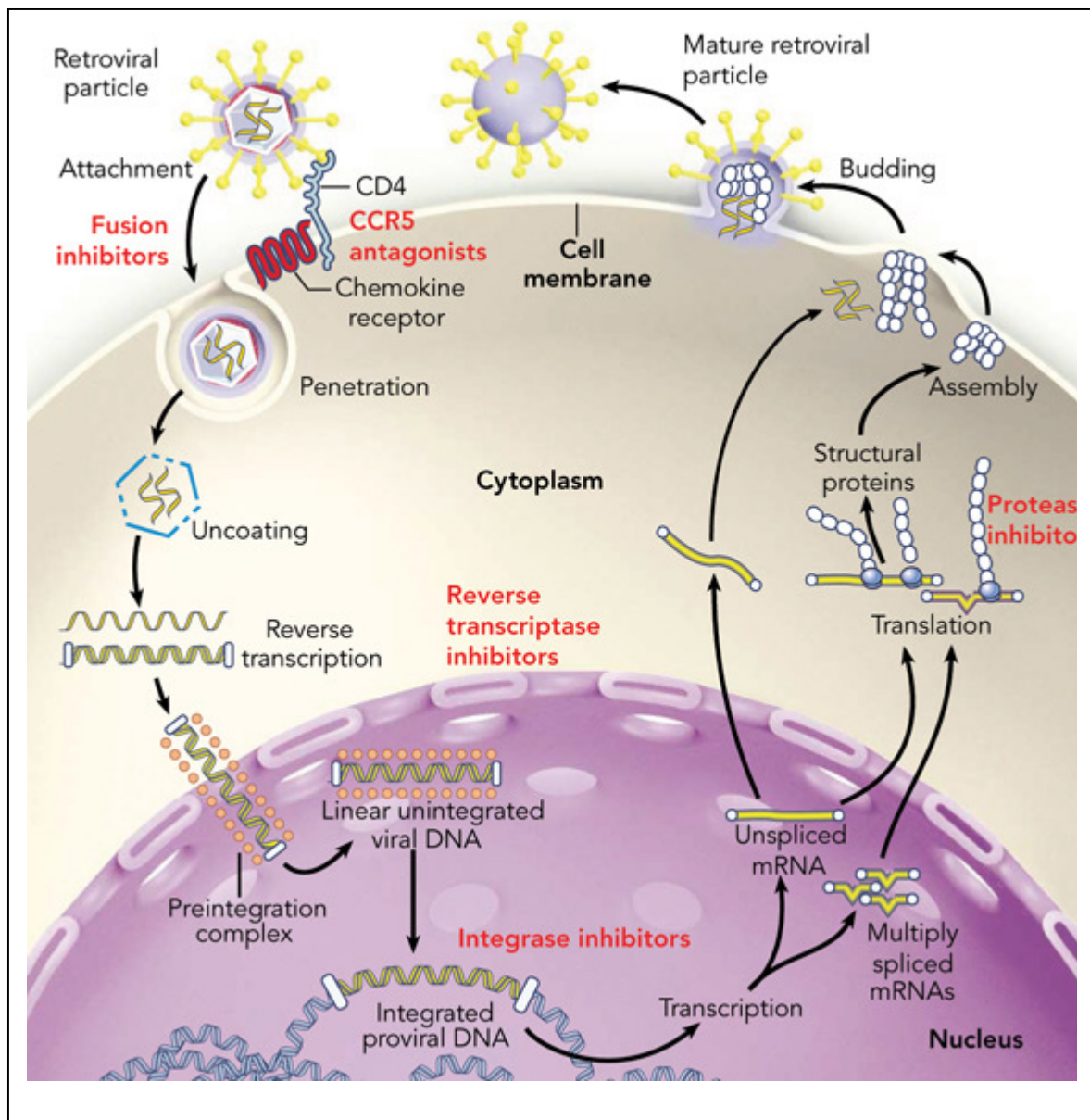
O tratamento atual de indivíduos infectados com o vírus HIV consiste em quimioterapia de longa duração com administração combinada de diferentes agentes anti-retrovirais (Perrin & Telenti, 1998). A combinação de fármacos ARVs têm se mostrado superior a regimes com um único agente no tratamento efetivo e durável das infecções com o HIV-1 e na redução da transmissão vertical do vírus (Meng *et al*, 2000).

A tabela 1 mostra as cinco classes de medicamentos anti-retrovirais, compostos no total por 24 fármacos que foram aprovados pelo FDA (Food and Drug Administration – USA).

Tabela 1. Medicamentos anti-retrovirais disponíveis:

ANTR	NANTR	Inibidor de Protease	Inibidor de Integrase	Inibidor de Fusão
Abacavir	Delavirdina	Amprenavir	Raltegravir	Enfuvirtida
Didanosina	Efavirenz	Atazanavir		Maraviroc
Emtricitabina	Nevirapina	Darunavir		
Lamivudina		Fosamprenavir		
Estavudina		Indinavir		
Tenofovir		Lopinavir/Ritonavir		
Zalcitabina		Nelfinavir		
Zidovudina		Ritonavir		
		Tripanavir		
		Saquinavir		
ANTR-inibidor análogo nucleosídico de transcriptase reversa				
NANTR- inibidor não análogo nucleosídico de transcriptase reversa				

A redução dos níveis virais é geralmente observadas após o início do tratamento com administração combinada dos ARVs (Figura 4), sendo um indicador da supressão efetiva da replicação do HIV (McDermott et al, 1999). A erradicação completa do vírus não é possível com tal tratamento, em virtude do rápido desenvolvimento de cepas mutantes resistentes (Gröschel *et al*, 1997). A estratégia inicial de associação mais freqüente inclui inibidores das enzimas virais transcriptase reversa e protease. A alta eficácia desta associação anti-retroviral determinou uma redução dramática da morbidez e da mortalidade relacionadas à AIDS (Moore *et al*, 1999).



Chen (2007); Adapted with permission (2006) from: Furtado MR, Callaway DS, Phair JP, et al. Persistence of HIV-1 transcription in peripheral-blood mononuclear cells in patients receiving potent antiretroviral therapy. *N Engl J Med* 1999; 340: 1614-1622. © 1999, Massachusetts Medical Society. All rights reserved.

Figura 4. Ciclo de replicação do HIV e ação da terapia anti-retroviral (em vermelho)

1.4.1 Os Inibidores de Protease (IPs)

Os IPs constituem uma importante classe de fármacos contra o HIV, atuando num estágio tardio do processo de replicação do vírus. Para que as proteínas virais precursoras produzidas pela célula do hospedeiro possam integrar o vírus, precisam ser clivadas por uma enzima proteolítica. A classe de medicamentos IPs inibe a capacidade da célula em clivar as proteínas virais. O fato de todas as proteínas virais terem que ser clivadas enzimaticamente cria um afunilamento e leva a um mecanismo altamente específico e efetivo na interrupção da replicação viral. O aspecto negativo mecanismo é que ele bloqueia somente o resultado final e não o início da infecção. Em essência, os IPs podem ser considerados virostáticos (Wynn *et al*, 2004).

1.4.1.1 Distribuição dos IPs em sítios santuários virais/trato genital masculino

Um santuário viral é um sítio anatômico altamente impermeável para alguns ARVs, e nos quais a replicação viral continua durante o tratamento, permitindo o desenvolvimento ou seleção de vírus resistentes à fármacos (Lowe *et al*, 2004). A penetração de ARVs em todos os compartimentos do organismo é importante no tratamento da infecção pelo HIV1. O sistema nervoso central e o trato genital masculino são considerados santuários anatômicos para o HIV, pois as barreiras sangue-cérebro e sangue-testículos podem impedir a entrada de ARVs nesses órgãos. A penetração sub-ótima dos ARVs nestes compartimentos pode permitir replicação continuada do vírus apesar da supressão eficaz do HIV no plasma. Existem poucos estudos sobre a concentração de ARVs no sêmen. A zidovudina foi o primeiro fármaco a ser avaliado (Henry *et al*, 1988), e as

publicações sugerem que sua concentração é maior no sêmen do que no sangue (Henry *et al*, 1988; Pereira *et al*, 1999; Anderson *et al*, 2000). Dados sobre a lamivudina sugerem que esta também alcança altas concentrações no plasma seminal (Pereira *et al*, 1999; Reijers *et al*, 2000). Dentre os IPs, o indinavir demonstrou alcançar concentrações terapêuticas no sêmen, e a adição de ritonavir a um esquema que contenha indinavir aumentou concentrações deste IP no compartimento seminal (Taylor *et al*, 2000; van Praag *et al*, 2000). Os poucos dados disponíveis sobre ritonavir, saquinavir e nelfinavir sugerem que estes atingem menores concentrações no sêmen do que no sangue (Taylor *et al*, 1999; Reijers *et al*, 2000). Poucos estudos foram publicados a respeito da penetração de lopinavir/ritonavir no trato genital masculino e os resultados obtidos indicam baixas concentrações no compartimento genital, além de grande variabilidade entre os indivíduos (Sankatsing *et al*, 2002; Solas *et al*, 2003; Ghosn *et al*, 2004).

1.4.1.2 O IP Kaletra®, suas indicações terapêuticas e farmacocinética

Kaletra® é uma co-formulação de Lopinavir e Ritonavir (LPV e RTV), indicado para o tratamento de adultos e crianças com mais de 2 anos de idade com infecção pelo HIV-1, em combinação com outros ARVs. A maior parte da experiência com Kaletra® foi obtida com o uso do produto em doentes que não haviam recebido tratamento anti-retroviral. Os dados relativos a doentes previamente tratados com vários inibidores da protease são limitados. A escolha de Kaletra® para tratar doentes infectados pelo HIV-1, que receberam anteriormente IPs, deve basear-se nos testes individuais de resistência viral e no histórico de tratamento dos doentes (Abbott Laboratories Limited, Queenborough, Kent ME11 5EL, Reino Unido).

O RTV é usado como incremento (boosting) na formulação, devido à sua capacidade de inibir as enzimas *CYP3A4* e *CYP3A5* que são os principais responsáveis pela metabolização do próprio RTV e também de LPV, e assim, aumentar os níveis plasmáticos de LPV.

A biodisponibilidade de LPV combinado com baixas doses de RTV em humanos ainda não foi determinada. A biodisponibilidade oral de LPV sem RTV é inferior a 25%. Após múltiplas doses orais de 400/100mg a concentração máxima de LPV no sangue é em média de 9,8 mg/L e do RTV 0,7mg/L; a concentração mínima de LPV é em média 7,1 mg/L e de RTV, 0,3 mg/L. No estado estacionário, LPV/RTV são extensamente (>99%) ligados a proteínas plasmáticas, tanto albumina quanto α -glicoproteína ácida, com maior afinidade pela última. Para pacientes em uso crônico de 400/100mg LPV/RTV o tempo de meia vida médio e o clearance oral para LPV são de 4,1-5,8 horas e 6,0-7,1 L/h (Cvetkovic *et al*, 2003) e para RTV são 3,0-5,0 horas e 7,0-9,0 L/h (Hsu *et al*, 1998).

1.5. GLICOPROTEÍNA-P (Pgp)

O gene humano de resistência a múltiplas drogas (*MDR1* ou *ABCB1*) codifica uma proteína integral de membrana, Pgp, que depende de energia para seu funcionamento, exportando substâncias do interior das células ou das membranas para o meio extracelular. Este gene foi identificado primeiramente por sua superexpressão em células tumorais humanas, onde foi encontrado associado à resistência a agentes quimioterápicos (Fromm *et al*, 2002).

1.5.1 Função da Pgp

A Pgp humana é uma proteína transmembrana de 170 KDa fosforilada e glicosilada, com 1280 aminoácidos, composta de duas seqüências homólogas e simétricas, cada qual contendo seis domínios transmembrana e uma região de ligação ao ATP. Como a Pgp é uma bomba de efluxo ela é capaz de mover fármacos do domínio intracelular para o extracelular e também interagir com moléculas presas à bicamada lipídica da membrana celular (Marzolini *et al*, 2004) (Figura 5).

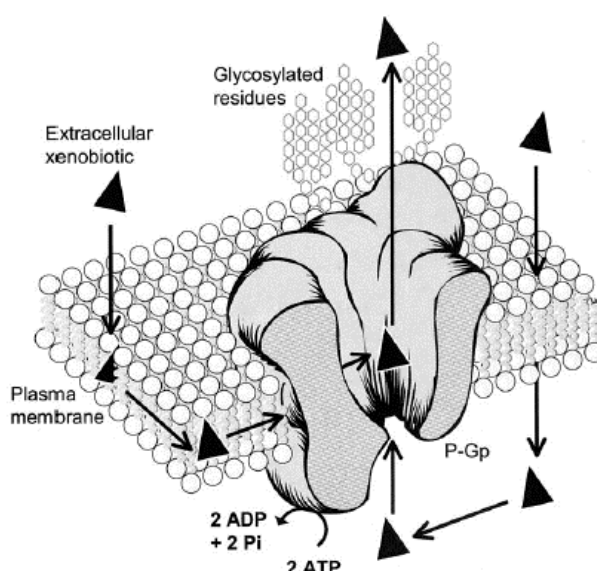


Figura 5. Função da Pgp. Esse modelo mostra o transporte de drogas mediado por Pgp que pode ocorrer em nível de membrana plasmática ou do compartimento intracelular (Marzolini *et al*, 2004).

1.5.2 Localização da Pgp

A co-localização da Pgp e do CYP3A4 (enzima metabolizadora de fármacos) no intestino delgado e fígado sugere que esse transportador também tem papel importante na biodisponibilidade oral, distribuição e excreção de fármacos (Marzolini *et al*, 2004).

A Pgp é expressa nas células endoteliais de capilares do sistema nervoso central e na superfície apical epitelial do plexo coróide, que formam as barreiras sangue-cérebro e sangue-fluido cérebro espinhal, respectivamente. Além disso, é expressa em células endoteliais de capilares formando a barreira sangue-testículos. As microvilosidades no sinciotrofoblástico da placenta humana também expressam Pgp. Linfócitos também expressam Pgp em altos níveis como as células CD56⁺ e em níveis menores como as células CD8⁺, CD4⁺, CD15⁺, CD19⁺ e CD14⁺ (Fromm *et al*, 2002).

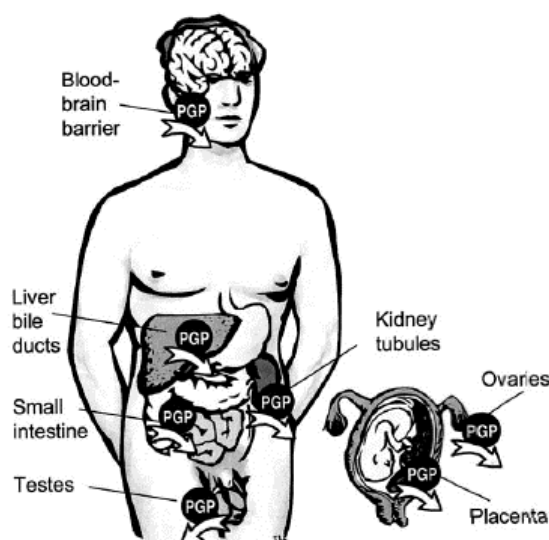


Figura 6. Distribuição da Pgp nos tecidos. Atividade de efluxo associada a Pgp vai reduzir a absorção intestinal de drogas enquanto aumenta a eliminação através do fígado e rins. Para os sítios de barreira, tais como barreira hemato-encefálica, testículos, ou placenta, a Pgp vai limitar a exposição do tecido a drogas (Marzolini *et al*, 2004).

1.5.3 Substratos de Pgp

A relação estrutura-atividade para os substratos de Pgp ainda não estão claramente definidas. A lipofilicidade e o número de hidrogênios ligados parecem ser parâmetros relevantes, já que ambos têm sido correlacionados proporcionalmente à afinidade de alguns compostos pela Pgp. Em geral, os

substratos de Pgp são hidrofóbicos, e/ou cátions orgânicos no pH fisiológico, contendo um ou mais anéis aromáticos, com peso molecular maior que 400 (Ileiri *et al*, 2004). A Tabela 2 mostra uma lista de compostos que são substratos, inibidores, ou indutores da Pgp, segundo Marzolini e colaboradores (2004). A faixa de substratos transportados pela Pgp é ampla e inclui uma variedade de agentes farmacológicos distintos usados na quimioterapia do câncer, hipertensão, alergia, infecção, imunossupressão, neurologia, e inflamação. É também evidente que os substratos da Pgp são também substratos de enzimas metabolizadoras, particularmente, CYP3A4/5 (Marzolini *et al*, 2004).

Tabela 2. Substratos, inibidores e indutores de Pgp.

Fármaco	Substrato	Inibidor	indutor	Fármaco	Substrato	Inibidor	indutor
Agente anti-câncer				Antivirais			
actinomicina D	x			amprenavir			x
daunorubicina	x			indinavir		x	x
docetaxel	x			nelfinavir		x	x
etoposido	x			ritonavir		x	x
imantinib	x			saquinavir		x	x
irinotecano	x			Antibióticos			
mitomicina C	x			claritromicina		x	
mitoxantrona	x			eritromicina		x	
paclitaxel	x			levofloxacina	x		
teniposido	x			rifampina			x
topotecano	x			tetraciclina	x		
vinblastina	x			Antimicóticos			
vincristina	x			intraconazol		x	
Antihipertensivos				cetoconazol		x	
carvedilol		x		Imunossupressores			
celiprolol	x			ciclosporina		x	
diltiazem	x			sirolimus		x	
losartan	x			tacrolimus		x	
nicardipina		x		valspodar		x	
reserpina		x		Antidepressivos			
talinolol	x			amitriptilina	x		
Antiarítmicos				fluoxetina		x	
amiodarona		x		paroxetina		x	
digoxina	x			sertralina		x	
propafenona		x		erva de São João			x
quinidina		x		Neurolépticos			
varapamil		x		clorpromazina		x	
Glicocorticóides				flupentixol		x	
aldosterona	x			fenotiazina			x
cortisol	x			Antiepiléticos			
dexametasona			x	fenobarbital	x		
metilprednisolona	x			fenitoína	x		
Opióides				Antiácidos			
metadona		x		cimetidina	x		
morfina			x	ranitidina	x		
pentazocina		x					
Antieméticos							
domperidona	x						
ondansetron	x						

1.5.4 Polimorfismo no gene *ABCB1*

O gene *ABCB1* está localizado no cromossomo 7q21, com 28 exons. Pgp é um membro da superfamília de proteínas transportadoras ATP-binding cassette (leiri *et al*, 2004).

Um primeiro método de screening para polimorfismos, feito por Hoffmeyer e colaboradores (2000), numa população Caucasiana sadia, revelou 15 diferentes polimorfismos de uma única base (SNPs) em exons e introns. Os SNPs denotam diferenças de nucleotídeos entre indivíduos e representa a classe mais comum de variações na seqüência de todo o genoma humano (Marzolini *et al*, 2004). Hoje são conhecidos um total de 50 SNPs e 3 inserções/deleções no gene *ABCB1*. Alguns dos polimorfismos no gene *ABCB1* são silenciosos, não causam mudança de aminoácido, mas outros são responsáveis por alteração de aminoácido (Ambudkar *et al*, 2003). A Figura 7 mostra alguns dos polimorfismos de *ABCB1*.

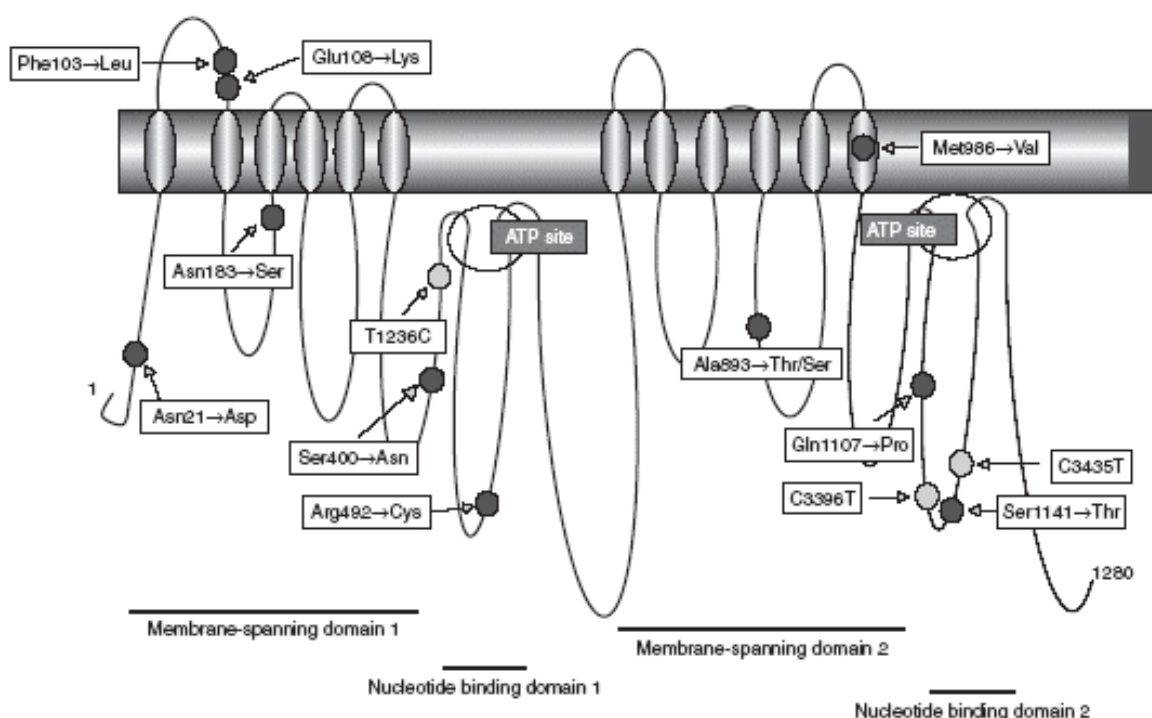


Figura 7. Representação esquemática da estrutura terciária da Pgp, com as substituições de nucleotídeo conhecidas (sinônimas e não-sinônimas). As substituições não-sinônimas são indicadas pela mudança de aminoácido correspondente (leiri *et al*, 2004).

1.5.5 Importância da Pgp no tratamento com IPs

Os IPs utilizados no HAART são substrato da Pgp. Por essa razão, o grau de expressão e a funcionalidade do produto do gene *ABCB1* podem afetar diretamente a atividade terapêutica de alguns agentes (Hoffmeyer *et al*, 2000). Um grande número de estudos tem mostrado que mutações nos domínios transmembrana ou de ligação de nucleotídeos da Pgp, podem influenciar a capacidade de ligação e transporte dessa proteína (Fellay *et al*, 2002 e Hitzl *et al*, 2001). Fellay (2002) mostrou associação entre a resposta ao tratamento anti-retroviral e variantes alélicas de *ABCB1* em 123 pacientes infectados com HIV que foram tratados com efavirenz ou nelfinavir. Surpreendentemente, um SNP silencioso na posição 3435 (exon 26) tem sido correlacionado em vários estudos

com expressão e função alteradas da Pgp (Hoffmeyer *et al*, 2000 e Hitzl *et al*, 2001). Como descrito anteriormente, o SNP C3435T (presente no exon 26) está ligado (em desequilíbrio) ao SNP C1236T (presente no exon 12), uma variante sinônima, e ao SNP G2677T/A (presente no exon 21), que causa alteração de aminoácido na posição 893 de Ala para Ser (Kim *et al*, 2001). Esses polimorfismos têm sido os principais alvos de estudo em relação a farmacocinética e eficácia do tratamento com IPs.

1.6. Outros transportadores com relevância no tratamento ARV

Outros transportadores de membrana da superfamília ABC podem influenciar a concentração intracelular dos ARVs em uma variedade de células e tecidos. Estes transportadores, ainda pouco estudados, também são polimórficos e podem ter sua expressão e funcionalidade alteradas (Cascorbi *et al*, 2006). A Figura 6 mostra a distribuição de transportadores e enzimas no organismo que parecem estar envolvidos na variabilidade de resposta aos ARVs pelos indivíduos.

Os PIs são substratos da Pgp, mas também de outros transportadores como ABCC1 (MRP1) e ABCC2 que são amplamente distribuídos nos tecidos, inclusive sendo expressos em linfócitos (Figura 8).

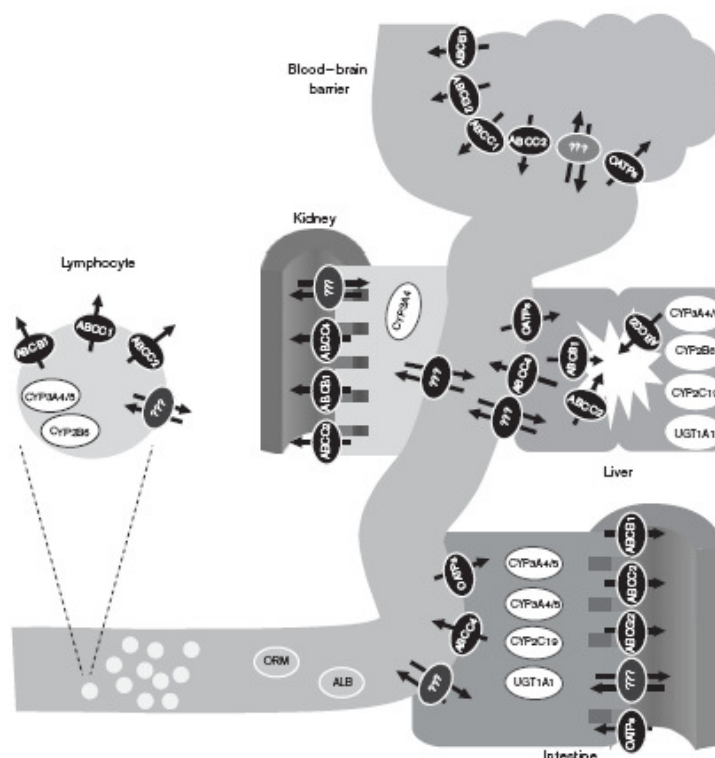


Figura 8. Representação diagramática de proteínas envolvidas na disposição de ARVs e sua localização no organismo (Owen *et al*, 2006).

1.7. A *CYP3A5* no tratamento com inibidores de protease

O complexo enzimático do citocromo P450 é a principal via de metabolização envolvida no clearance hepático dos IPs. Vários polimorfismos nas diferentes isoenzimas CYP450 são conhecidos por influenciar o metabolismo de fármacos no fígado, causando aumento ou diminuição do clearance (Rodriguez-Novoa *et al*, 2006).

O indinavir, um IP, é metabolizado no fígado principalmente por *CYP3A5*, que mostra alta variabilidade genética. O alelo *3 é um dos mais bem conhecidos da *CYP3A5*; sua frequência varia entre diferentes etnias (Rodriguez-Novoa *et al*, 2006). Uma guanina na posição 6983 neste alelo cria um sítio de splice crítico no intron 3, que acarreta num splicing aberrante na maioria dos transcritos e baixa expressão da proteína *CYP3A5*. Deste modo, a presença dessa variante tem sido

associada com baixa ou nula expressão de *CYP3A5* e como consequência, um menor clearance de indinavir. O resultado é que indivíduos com esse polimorfismo (ou outros) tendem a uma maior concentração plasmática de indinavir e sofrem mais freqüentemente de cálculos renais durante a terapia com indinavir.

1.8. Relação da etnia com os polimorfismos de *ABCB1*

Diversos estudos na determinação das freqüências alélicas, genotípicas e haplotípicas de *ABCB1* têm sido realizados em diferentes grupos populacionais. Já foi observada a existência de relação entre a etnia e a distribuição alélica e genotípica de *ABCB1*, em que indivíduos caucasianos apresentam maior freqüência do alelo T no polimorfismo C3435T, do que africanos sub-saharianos. Esta observação é de grande relevância quando existe a intenção de se estudar os polimorfismos de *ABCB1* em populações miscigenadas como a brasileira.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar a distribuição de polimorfismos genéticos na população brasileira e investigar a influência desses polimorfismos na manutenção dos níveis de LPV e RTV, em sêmen e saliva de indivíduos infectados pelo vírus HIV1.

2.2. Objetivos Específicos

1. Estudar as frequências alélicas, genóticas e haplotípicas de variantes do gene *ABCB1* em voluntários sadios, auto-classificados segundo os critérios do Censo brasileiro;
2. Estudar a distribuição dos polimorfismos de *ABCB1* na população brasileira em relação à ancestralidade genética, através de marcadores informativos de ancestralidade (AIMs);
3. Desenvolver uma metodologia bionalítica que permita quantificar acuradamente LPV e RTV em matrizes complexas como plasma, sêmen e saliva;
4. Determinar as concentrações de LPV e RTV no plasma sangüíneo, na fração livre de plasma sangüíneo, no plasma seminal e saliva de indivíduos em tratamento estável com LPV/RTV;
5. Avaliar a existência de correlação dos níveis de LPV ou RTV entre plasma, saliva e o sêmen;
6. Investigar a relação entre a distribuição genotípica de *ABCB1* e os níveis de LPV e RTV nas diferentes matrizes;

7. Determinar a funcionalidade e expressão da Pgp em células T CD4⁺ de pacientes HIV1⁺;
8. Avaliar a existência de associação entre os genótipos de *ABCB1* com a funcionalidade e expressão da Pgp em células CD4⁺;
9. Investigar a associação entre as variantes de *CYP3A5* e os níveis de LPV ou RTV no plasma sanguíneo.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. População estudada

Voluntários sadios e pacientes HIV1⁺ participaram deste trabalho. Amostras de sangue de voluntários sadios recrutados nos centros de saúde da Varig e da Embratel foram previamente coletadas e seu DNA genômico extraído e depositado no banco de DNA da Divisão de Farmacologia do INCA. 320 amostras de DNA de indivíduos sadios (192 homens e 128 mulheres) foram usadas neste estudo.

No total 113 indivíduos infectados com o HIV1 foram selecionados no Rio de Janeiro para participar de um estudo transversal. Os pacientes estavam utilizando um esquema HAART contendo Kaletra® por mais de quatro semanas. Os participantes foram recrutados de uma coorte de indivíduos soropositivos dos seguintes hospitais e centros de saúde: Hospital Universitário Clementino Fraga Filho-UFRJ, Hospital São Francisco de Paula, Hemo Rio, CPN Niterói, PAM 13 de Maio, Posto de Saúde de Irajá, Projeto Praça XI, Hospital Marcílio Dias. Os indivíduos foram convidados a participar no momento em que compareceram ao ambulatório do hospital para suas consultas de rotina. Após obtenção do consentimento informado, os indivíduos incluídos fizeram uma entrevista inicial e um exame físico. Amostras de sangue, sêmen e saliva foram coletadas de 30 a 5 minutos antes do horário regular matinal de tomada do Kaletra®, após quatro ou mais semanas de tratamento. A adesão ao tratamento foi estimada pela informação prestada pelos pacientes a um questionário pré-testado e pela dosagem dos níveis de LPV e RTV sangüíneos. Nenhuma mudança nas doses padrão de Kaletra®, que seguem as recomendações para uso de antiretrovirais

do Ministério da Saúde do Brasil, foi feita durante este estudo. Tivemos como critérios de inclusão dos pacientes neste estudo: infecção pelo HIV, sexo masculino, uso de esquema antiretroviral contendo Kaletra® por mais de quatro semanas e idade acima de 18 anos. E como critérios de exclusão: incapacidade ou recusa em fornecer o consentimento informado, não estar disposto a cumprir os procedimentos do estudo, evidência clínica ou laboratorial de outras doenças sexualmente transmissíveis, uso concomitante de efavirenz ou nevirapina. No dia da coleta de amostras, uma entrevista foi feita com o voluntário incluindo perguntas a respeito da adesão à terapia anti-retroviral atual, de mudanças no esquema inicial, da toxicidade dos fármacos, do uso de outros medicamentos que poderiam interferir na farmacocinética de LPV/RTV. Além disso, foram feitas perguntas a respeito de dados demográficos e étnicos (Anexo E).

3.2. Coleta e tratamento das amostras de pacientes

Todas as amostras foram coletadas no Departamento de Doenças Infecciosas e Parasitárias (DIP) do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho-UFRJ (HUCFF), independentemente do local de recrutamento do paciente. Com o auxílio da Dra. Mary Tuyama e a equipe do laboratório chefiado por Maria de Fátima Melo, as coletas foram realizadas em uma única visita do paciente ao HUCFF. Nesta visita foram coletadas amostras de sangue, saliva e sêmen.

3.2.1 Sêmen

Como em estudo prévio realizado por nosso colaborador Dr. Paulo Feijó Barroso. (Barroso *et al*, 2000), o sêmen foi coletado em uma sala especial, privativa da DIP/HUCFF. Para a coleta seguimos as orientações abaixo, do AVEG Mucosal Immunology Laboratory da Universidade do Alabama em Birmingham:

1. Foi pedido aos pacientes que não tivessem relações sexuais nas 48 horas anteriores a coleta.
2. Os pacientes foram orientados a lavar as mãos e a genitália com sabão e água morna antes da masturbação e não misturar sêmen com saliva. Nenhum preservativo ou lubrificante foi utilizado.
3. O ejaculado foi coletado por masturbação em um frasco com tampa de rosca identificado com uma etiqueta contendo o número de identificação do paciente.
4. A amostra foi levada ao laboratório imediatamente após a coleta.
5. O espécime foi refrigerado a 4°C por uma hora até se liquefazer.

Para obtenção do plasma seminal, o espécime foi diluído em um volume igual de solução salina com tampão fosfato (PBS) e centrifugado a 1200 g por 12 minutos. O sobrenadante foi separado do pellet usando uma seringa estéril, em até cinco criotubos de 0,4 mL, que foram congelados a -20°C.

3.2.2 Saliva

A amostra de saliva foi coletada simultaneamente à amostra de sangue. Aproximadamente 1,5 mL de saliva foi coletada em um tubo com tampa de rosca contendo etiqueta com o número de identificação do paciente. Os pacientes foram orientados a lavar a boca com água (bochechar) e desprezar a água. A primeira amostra de cuspo foi feita fora do tubo de coleta, ou seja, descartada, as amostras de cuspo subsequentes foram coletadas no tubo. As amostras foram imediatamente centrifugadas a 1000 g por 20 minutos a 4°C e o sobrenadante separado em até cinco criotubos de 0,4 mL de estocado a -20°C.

3.2.3 Sangue

A Tabela 3 mostra as coletas de sangue periférico que foram realizadas usando o dispositivo de coleta de sangue a vácuo, Vacunteiner®. As amostras para hemograma e contagem de linfócitos foram tratadas e analisadas pelo laboratório do DIP do HUCFF chefiado por Maria de Fátima Melo. Estes resultados ficaram a disposição dos pacientes e de seus médicos.

Tabela 3. Coletas de sangue dos pacientes HIV1⁺, volume de amostra e finalidade da coleta

COLETA DE SANGUE		
volume de coleta	Tipo de anticoagulante	Análise
3 mL	EDTA	hemograma
3 mL	EDTA	contagem de linfócitos
3 mL	EDTA	extração de DNA - genotipagem
10 mL	heparina	dosagem dos níveis de lopinavir e ritonavir
10 mL	heparina	separação de células mononucleares

3.2.3.1 Extração de DNA

O DNA genômico foi extraído de 3,0 mL de sangue coletado com o anticoagulante EDTA, usando o Kit de purificação de DNA genômico GFX™ (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA) seguindo as instruções do fabricante.

3.2.3.2 Amostra de plasma

Um dos tubos de sangue coletado com heparina foi centrifugado a 2000 g por 20 minutos para a obtenção do plasma sangüíneo. Este plasma foi transferido para até 5 criotubos de 1 mL e estocados a -20°C. Este plasma foi usado na dosagem dos níveis de LPV e RTV no plasma total e sua fração livre (não ligada a proteína plasmática).

3.2.3.3 Amostra de células mononucleares de sangue periférico (PBMCs)

O segundo tubo de sangue coletado com heparina foi usado para a separação de PBMCs. Adicionamos 3 mL de reagente de Ficoll (Histopaque®, Sigma Cell Culture) em um tubo de 10 mL. Lentamente adicionamos 9 mL de sangue ao tubo, com auxílio de uma pipeta pasteur com inclinação de 45°. O tubo foi centrifugado a 2500 RPM por 20 minutos, em centrífuga com aceleração e desaceleração baixas. Retiramos o anel formado pelo gradiente com auxílio de uma pipeta pasteur, incluindo uma camada de plasma acima e uma camada de Ficoll abaixo do anel, a fim de retirar todo o material mononuclear (PBMCs) formado. As PBMCs foram transferidas para um tubo de 10 mL e lavadas com 10 mL de PBS. Nova centrifugação foi realizada a 1600 RPM por 5 minutos e o

sobrenadante é descartado. O pellet formado no fundo do tubo foi lavado com 10 mL de PBS e a centrifugação anterior foi repetida. O pellet foi ressuspensionado com 5 mL de RPMI e a amostra congelada a -20°C.

3.3. Ética

Todas as amostras utilizadas neste estudo foram codificadas, garantindo sua confidencialidade. Dois projetos foram submetidos a Comitês de Ética, um deles que previa a coleta de sangue de voluntários sadios e genotipagem de *ABCB1* (submetido ao Comitê do Instituto Nacional de Câncer/INCA) e outro que previa o estudo com pacientes (submetido ao Comitê do HUCFF e INCA, ANEXO A), tendo sido os dois aprovados (Anexo B e C). Todos os participantes (voluntários sadios e pacientes) deste estudo receberam um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, esclarecendo todos os procedimentos que seriam realizados (Anexo D).

3.4. Genotipagem

3.4.1 *ABCB1*

A metodologia utilizada para a genotipagem de *ABCB1* foi o seqüenciamento de uma única base (SnapShot Kit, Applied Biosystems, Foster City, CA USA). Inicialmente as regiões genômicas contendo os polimorfismos foram amplificadas por PCR multiplex (exons 12, 21 e 26), e os produtos analisados em géis de agarose 1% corados com brometo de etídeo (Figura 9). Os oligos utilizados na reação de PCR multiplex foram previamente descritos por

Wadelius e colaboradores (2004) e estão relacionadas na Tabela 4. Na composição dos reagentes da PCR foram utilizados: 100 ng de DNA genômico, 5 μ M de cada oligo (Alpha DNA, Montreal, Quebec), deoxinucleotídeos (dNTP) 5 mM (Invitrogen, Invitrogen do Brasil, São Paulo), enzima Taq DNA polimerase 5 U/ μ L e tampão de PCR (Gold, Applied Biosystems Foster City, CA USA), em volume final de 50 μ L completado com água ultra pura (Milli-Q, Millipore). As condições do termociclador para a PCR foram: etapa inicial a 95°C por 10 minutos (desnaturação inicial), amplificação por 35 ciclos a 95°C por 30 segundos (desnaturação), 55°C por 30 segundos (anelamento dos oligos), 72°C por 30 segundos (extensão) e a etapa final 72°C por 7 minutos (extensão final).

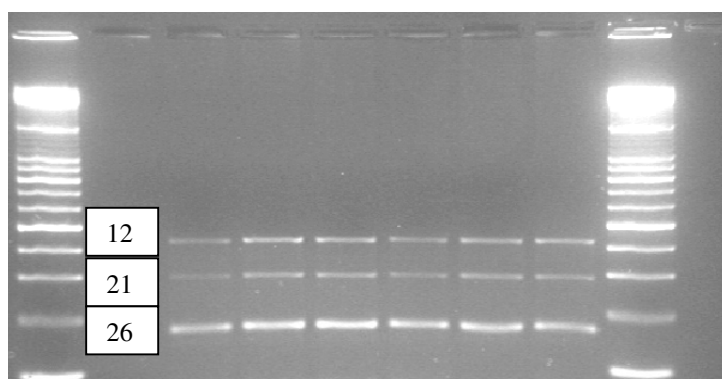


Figura 9. Gel de agarose 1% com os amplicons dos exons 12, 21 e 26 do gene *ABCB1* de uma reação de PCR multiplex.

Tabela 4. Oligos utilizados na PCR multiplex de *ABCB1*

Exon	oligo 5' $\rightarrow$ 3'	oligo 3' $\rightarrow$ 5'
12	TATTCGAAGAGTGGGCACAA	CTGATCACCGCAGGGTCTA
21	AGCAAATCTTGGGACAGGAA	AAGATTGCTTTGAGGAATGGTT
26	GAGCCCATCCTGTTTGACTG	CATGCTCCCAGGCTGTTTAT

Após a PCR, os SNPs foram genotipados usando um oligo interno, cuja extremidade 3' era adjacente à base polimórfica. A extensão de uma única base foi feita por um ciclo de reação de seqüenciamento, com os três oligos e dideoxinucleotídeos trifosfatados fluorescentes (ddNTPs). Devido à ausência de deoxinucleotídeos, somente uma única base é adicionada a extremidade 3' dos oligos. Uma cauda (GACT)_n foi adicionada aos oligos (Tabela 5) para evitar a sobreposição entre os produtos finais da extensão, que foi detectada com um instrumento de eletroforese capilar ABI3100 (Applied Biosystems) e os resultados foram analisados através do programa GenScan (Applied Biosystems) (Figura 10).

Tabela 5. Oligo interno para genotipagem de *ABCB1* por seqüenciamento de uma única base

Exon	Posição	Oligo	tamanho do oligo
12	1236C>T	5' → 3' GTCAGTCAGTCAGTC GTCCTGGTAGATCTT GAAGGG	36
21	2677G>T/A	3' → 5' GACTGACTGACTGACTGACT AGTTTGACTCACCTTC CCAG	40
26	3435C>T	3' → 5' GACTGACTGACTGACTGACTGACTG ACTGACTGCCTCCTTTGCTGCCCTCAC	52

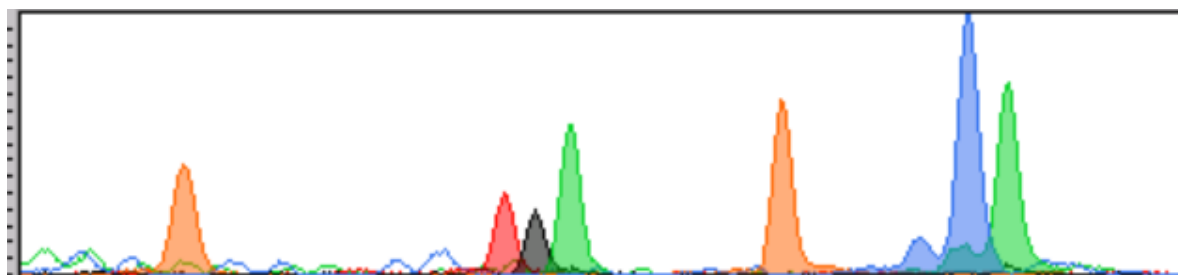


Figura 10. Genotipagem por seqüenciamento de base única para os três SNPs estudados (C1236T, G2677T/A e C3425T). Picos laranja representam o padrão de tamanhos em pares de bases. Picos de outras cores correspondem aos alelos genotipados (verde-A; azul-G; preto-C; vermelho-T)

3.4.2 A *CYP3A5*

A metodologia utilizada para a genotipagem dos alelos não-funcionais da *CYP3A5* foi PCR-RFLP, descrita por Liu e colaboradores (2002). Os SNPs estudados estão localizados em sítios reconhecidos por enzima de restrição.

Para detecção dos polimorfismos A6986G (alelo *3) e G14690A (alelo *6) de *CYP3A5*, foram usados os oligos descritos na Tabela 6.

Tabela 6. Oligos utilizados nas PCRs de *CYP3A5*

Alelo	oligo 5' → 3'	oligo 3' → 5'
*3	CTCTTTAAAGAGCTCTTTTGTCTCTCA	GTTGTACGACACCACGCAACC
*6	GTGGGTTTCTTGCTGCATGT	GCCCACATACTTATTGAGAG

Na composição dos reagentes da PCR foram utilizados para as duas ampliações: 100 ng de DNA genômico, 0,28 μ M de cada oligo (Alpha DNA, Montreal, Quebec), deoxinucleotídeos (dNTP) 0,2 mM (Invitrogen, Invitrogen do Brasil, São Paulo), enzima Taq DNA polimerase 2,5 U/ μ L e tampão de PCR

(Gold, Applied Biosystems Foster City, CA USA), em volume final de 20 μ L completado com água ultra pura (Milli-Q, Millipore). As condições do termociclador para a PCR da região contendo A6986G foram: etapa inicial a 98°C por 5 minutos (desnaturação inicial), amplificação por 35 ciclos a 95°C por 30 segundos (desnaturação), 57,5°C por 30 segundos (anelamento dos oligos), 72°C por 30 segundos (extensão) e a etapa final 72°C por 5 minutos (extensão final). As condições do termociclador para a PCR da região contendo G14690A foram: etapa inicial a 95°C por 5 minutos (desnaturação inicial), amplificação por 35 ciclos a 94°C por 30 segundos (desnaturação), 51°C por 30 segundos (anelamento dos oligos), 72°C por 30 segundos (extensão) e a etapa final 72°C por 5 minutos (extensão final).

Para a caracterização dos dois polimorfismos usamos a enzima Dde I (C/TNAG) (Promega, Madison USA). Na reação de digestão usamos 5 U/ μ L da enzima e 10 μ L da PCR, incubamos por 4 horas a 37°C e o produto da digestão é visualizado em gel de agarose a 3%.

3.5. Metodologia analítica utilizada na determinação de LPV e RTV em plasma sanguíneo e seminal, saliva e fração livre

Foi desenvolvida e validada uma metodologia de extração líquido-líquido, seguida de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em tandem para a determinação de LPV e RTV nas diferentes matrizes biológicas. Esta metodologia está descrita no artigo “Determination of lopinavir and ritonavir in blood plasma, seminal plasma, saliva and plasma ultra-filtrate by Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry Detection.” enviando para

publicação em novembro de 2007 na revista *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. Autores: Rita C. E. Estrela, Fabio S. Ribeiro, Brayan S Viegas, Guilherme Suarez-Kurtz (Apêndice A).

3.6. Determinação de funcionalidade e expressão da Pgp em linfócitos T CD4⁺

A metodologia utilizada para determinar a funcionalidade da Pgp em linfócitos foi a do efluxo de Rodamina 123 (Rod123), um substrato fluorescente (emissão na faixa do verde a 530nm) da Pgp que pode ser detectado por citometria de fluxo. Além disso, a expressão de Pgp foi determinada através de marcação de superfície com anticorpo monoclonal específico para Pgp.

As etapas do protocolo desenvolvido estão descritas a seguir:

Uma parte da suspensão celular é usada para contagem em hemocítômetro (câmara de Neubauer). O volume da suspensão celular correspondente a 10^6 células é transferido para 5 tubos de ensaio em polipropileno de 5 mL nomeados conforme a Tabela 7.

Tabela 7. Distribuição das células mononucleares para a análise de citometria de fluxo

Tubo	Descrição
B	Branco
FL2	Compensação FL2 (canal laranja)
FL3	Compensação FL3 (canal vermelho)
VPL	Bloqueio com Verapamil
EFL	Efluxo

As células em cada tubo foram lavadas com 2 mL de PBS gelado e centrifugadas a 1600 RPM por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e os tubos B, FL2 e FL3 tiveram o pellet ressuspensionado em 1mL de RPMI. Os tubos VPL e EFL tiveram o pellet ressuspensionado em 1 mL de Rodamina 200 ng/mL e foram incubados em estufa com atmosfera de CO₂ 5% por 30 min. As células dos tubos VPL e EFL foram lavadas com 2 mL de PBS gelado e centrifugadas a 1600 RPM por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células do tubo VPL foram ressuspensionadas em 1mL de Verapamil 30 µM (inibidor da Pgp). As células do tubo EFL foram ressuspensionadas em RPMI. Para que a fizesse o efluxo da Rod123 os tubos VPL e EFL foram incubados em estufa com atmosfera de CO₂ 5% por 1 hora. 2 mL de PBS foi adicionado em cada tubo, que foram centrifugados a 1600 RPM por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e os anticorpos (Becton & Dickinson Franklin Lakes, NJ USA) adicionados a cada um dos tubos conforme a Tabela 8:

Tabela 8. Anticorpos utilizados no ensaio de citometria de fluxo

Tubo	Anticorpos
B	-----
FL2	10 µL de anti CD4 PE
FL3	10 µL de anti CD4 PercP
VPL	10 µL de anti CD4 PercP
EFL	10 µL de anti CD4 PercP + 10mL de anti Pgp PE

PE: Ficoeritrina. Fluoróforo com emissão na faixa do laranja 578nm;

PercP: Proteína Piridina clorofila. Fluoróforo com emissão na faixa do vermelho 675nm;

OBS.: A marcação de Pgp é exclusiva nas amostras EFL (e não VPL).

Após a adição dos anticorpos, as células foram incubadas em gelo ao abrigo da luz por 20 minutos. 2 mL de PBS foi adicionado em cada tubo e centrifugado a

1600 RPM por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspendidas em 500 µL de PBS.

Os dados foram adquiridos no equipamento BD FACSCalibur (Becton&Dickinson, Franklin Lakes, NJ USA). Os valores de intensidade de fluorescência foram obtidos no canal 1 (FL1) com picos detectados num comprimento de onda de 530nm. Os sinais Forward scatter (FS) e side scatter (SS) foram detectados em uma escala linear dot plot e a fluorescência foi detectada em um histograma com escala logarítmica.

Todas as análises foram feitas com o programa Cell Quest Pro Software (Becton&Dickinson, Franklin Lakes, NJ USA). O anticorpo utilizado para marcar Pgp fluoresce no comprimento de onda do canal FL2 (Figura 11). Durante os ajustes do ensaio, observamos que a Rod123 interfere no canal FL2. Então, para determinar os níveis de expressão da Pgp, sem o sinal inespecífico de Rod123, usamos a seguinte equação: expressão de Pgp = MIF EFL – MIF VPL, em que MIF EFL é a média de intensidade de fluorescência das células no tubo EFL e MIF VPL é a média de intensidade de fluorescência das células no tubo VPL, analisadas no canal FL2.

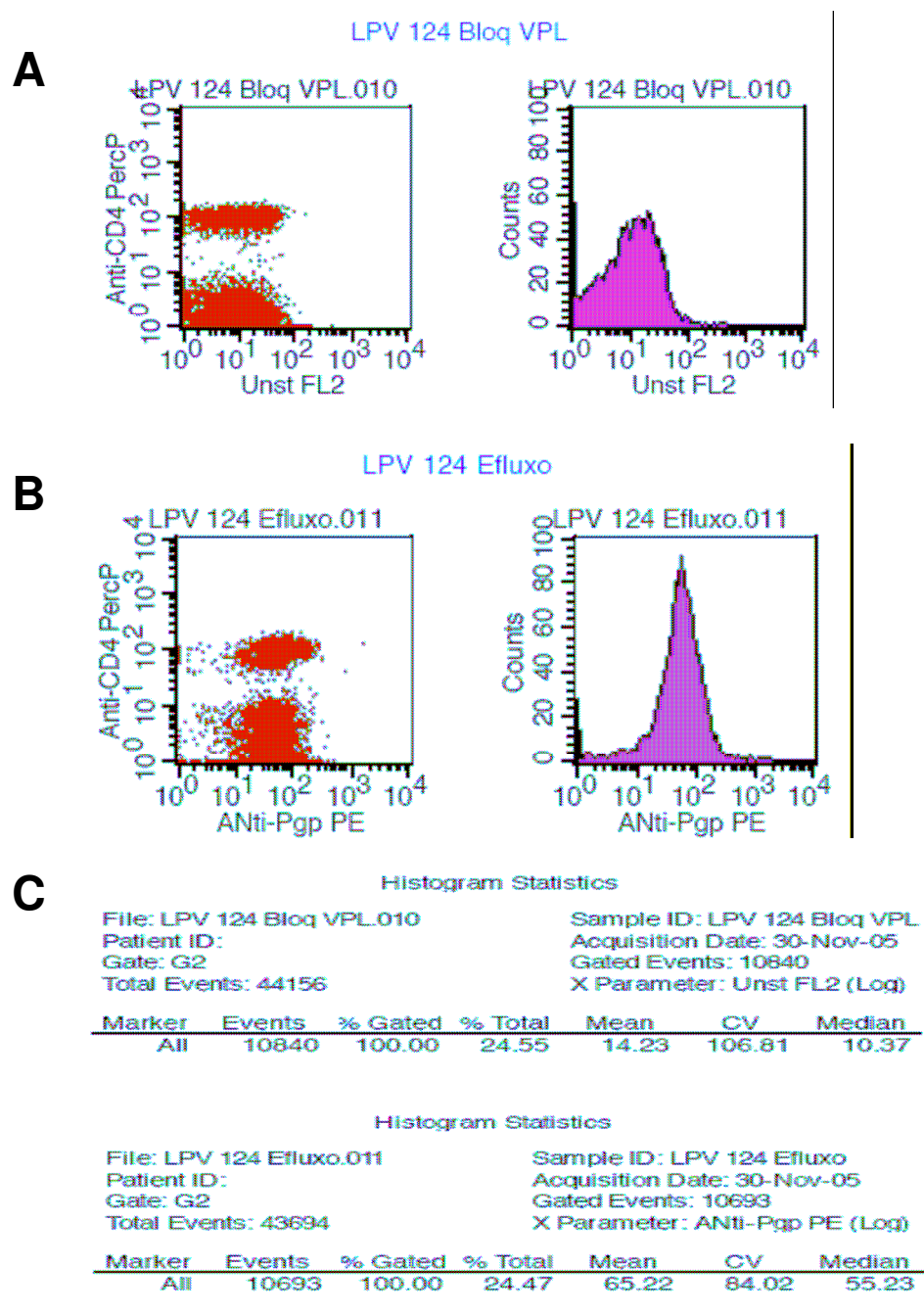


Figura 11. Dot plot e Histograma na análise da expressão de Pgp. (A) tubo, VPL, amostra controle da marcação para Pgp; (B) tubo EFL, amostra marcada com anticorpo anti-Pgp; (C) Análise estatística dos histogramas, informando a MIF usada para no cálculo dos níveis de expressão da Pgp

A porcentagem de efluxo de Rod123 foi calculada a partir da MIF em FL1 das células que fizeram efluxo de Rod123 em relação as que foram bloqueadas com

VPL (Figura 12). A seguinte equação foi usada para calcular a porcentagem de efluxo de Rod123:

$$\% \text{ expressão} = 100 - \left(\frac{(\text{MIF EFL} \times 100)}{\text{MIF VPL}} \right)$$

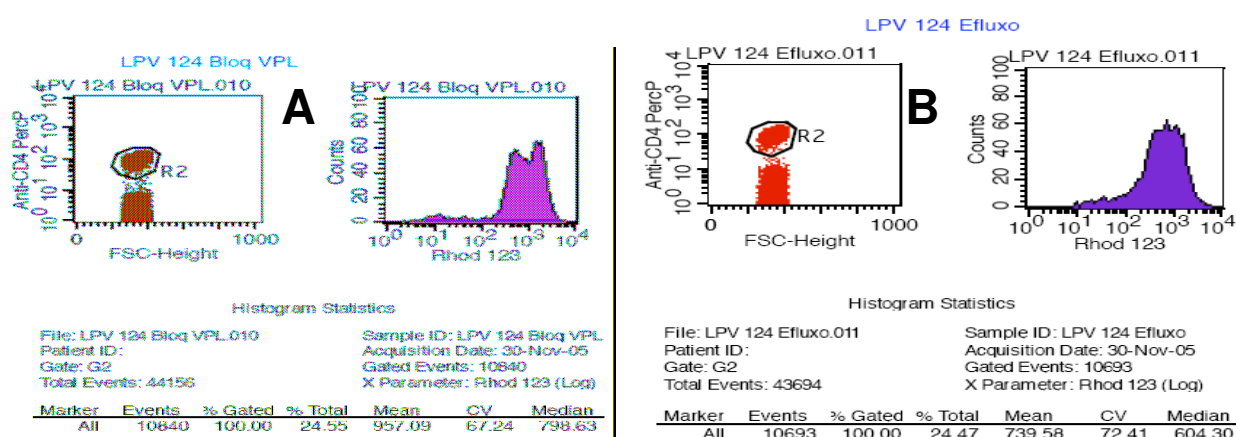


Figura 12. Dot plot em FL1 e Histograma na análise do efluxo de Rod123 pela Pgp. (A) tubo, VPL, células na presença de Verapamil (impedindo o efluxo de Rod123); (B) tubo EFL, células com efluxo de Rod123 permitido

3.7. Análises estatísticas

Os polimorfismos estudados neste trabalho foram descritos inicialmente em função das frequências genótípicas e alélicas. A conformidade entre as frequências genótípicas observada e as frequências genótípicas esperadas sob a hipótese de equilíbrio de Hardy-Weinberg foi investigada utilizando o teste de qui-quadrado. Estes cálculos foram realizados através de algoritmos implementados em uma ferramenta web (<http://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>).

O teste estatístico não paramétrico de Kruskal Wallis foi feito para análise de associação entre os polimorfismos de *ABCB1* e os níveis de LPV e RTV em diferentes matrizes, assim como para a expressão e funcionalidade da Pgp,

através do programa GraphPad Prism versão 4.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego California USA).

As análises de correlação dos níveis de LPV ou RTV entre as diferentes matrizes (sangue, fração livre no sangue, sêmen e saliva) foram realizadas no programa Origin 7.0, através de regressão linear.

Outros testes estatísticos específicos empregados neste trabalho estão descritos nos artigos que estão nos Apêndices.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados desta tese estão divididos em quatro partes, das quais uma já foi publicada (item 4.1. abaixo), uma está no prelo (item 4.4.), uma está submetida para publicação (item 4.2.) e uma está integralmente descrita nesta tese (item 4.3.):

1. Estudo piloto da penetração de LPV e RTV no trato genital de homens infectados com HIV-1
2. Impacto da miscigenação brasileira na distribuição de polimorfismos de *ABCB1* em voluntários sadios
3. Influência dos polimorfismos de *ABCB1* na distribuição LPV e RTV em indivíduos HIV1⁺
4. Relevância do genótipo de *CYP3A5* nas concentrações plasmáticas de LPV e RTV em indivíduos HIV1⁺

4.1. Estudo piloto da penetração de LPV e RTV no trato genital de homens infectados com HIV-1

Apresentação do artigo “Limited Penetration of Lopinavir and Ritonavir in the Genital Tract of Men Infected with HIV-1 in Brazil” publicado na revista *Therapeutic Drug Monitoring* volume 28, páginas 175-179, 2006. Autores: Tânia R. C. Vergara, Rita C. E. Estrela, Guilherme Suarez-Kurtz, Mauro Schechter, José Cerbino-Neto, Paulo F. Barroso. (Apêndice B)

Este trabalho foi um estudo piloto da penetração dos IPs, LPV e RTV, no trato genital masculino, a partir da avaliação das concentrações destes fármacos, no plasma sanguíneo e seminal. Participaram deste estudo dezesseis homens infectados com HIV1 que faziam uso crônico de LPV e RTV (por pelo menos

quatro semanas). Amostras de sangue e sêmen de cada indivíduo foram coletadas em duas ocasiões: 30 a 5 minutos antes (concentração mínima) e 5 a 6 horas depois (concentração máxima) da administração de doses regulares de LPV/RTV. A partir destas amostras determinou-se a contagem de células CD4⁺, a carga viral sangüínea e seminal e a concentração mínima ($C_{\min}$) e máxima ($C_{\max}$) de LPV e RTV em plasma sangüíneo e seminal. Desta forma, foi possível avaliar a existência de associação entre os níveis de LPV e RTV encontrados nos dois compartimentos e a carga viral em cada um deles.

A mediana da contagem de células CD4⁺ foi de 214 (faixa, 112-676) células/mm³. A carga viral no plasma sangüíneo foi abaixo do limite de quantificação em 10 pacientes. A Tabela 1 do artigo (Apêndice B) mostra as concentrações de LPV no sangue e sêmen. A mediana da $C_{\min}$ e da $C_{\max}$ de LPV no sêmen foi de 120,6 (20-1481,8) ng/mL e 233,1 (48,4-1133,4) ng/mL, respectivamente. A mediana da $C_{\min}$ e da $C_{\max}$ de LPV no sangue foi de 6082,1 (1798,2-10412,4) ng/mL e 8256,1 (5191,8-14460,7) ng/mL, respectivamente. A mediana das razões plasma seminal/plasma sangüíneo para LPV foi de 1,9% (1-21%) e 3% (0,04%-20%) nos pontos mínimo e máximo, respectivamente. A Tabela 2 do artigo (Apêndice B) mostra as concentrações de RTV no sangue e sêmen. A mediana da concentração no vale e no pico de RTV no sêmen foi de 9,2 (5-47) ng/mL e 17,1 (6,6-6,7) ng/mL, respectivamente. A mediana da $C_{\min}$ e da $C_{\max}$ de RTV no sangue foi de 251,1 (88,4-673) ng/mL e 434,1 (190,2-1491,2) ng/mL, respectivamente. A mediana das razões plasma seminal/plasma sangüíneo para RTV foi de 3,7% (2-9%) e 4,4% (1%-13%) nos pontos mínimo e máximo, respectivamente. Não foi encontrada associação entre as concentrações de LPV e RTV no sêmen e a carga viral no mesmo fluido. Muitos dos pacientes

que participaram do trabalho apresentaram carga viral no sêmen abaixo do nível de detecção, apesar dos baixos níveis de LPV e RTV neste compartimento. Esta observação foi explicada pelo fato de todos os participantes estarem utilizando combinações de anti-retrovirais que contêm além dos IPs, análogos nucleosídicos; estes se distribuem para o compartimento genital e podem ser responsáveis pela supressão do vírus neste compartimento. Outra explicação proposta foi que mesmo uma baixa concentração de LPV no sêmen é suficiente para suprimir a replicação local.

Estes dados mostram que LPV e RTV alcançam concentrações muito menores no compartimento genital quando comparadas com o sangue (menos do que 5%) o que pode levar ao desenvolvimento de vírus resistentes no trato genital. Além disso, existe uma grande variabilidade interindividual na penetração de LPV e RTV no compartimento genital, com uma variação de até 40 vezes na razão sêmen/sangue de LPV e de até 13 vezes para RTV. A penetração dos IPs no compartimento genital é modulada por vários fatores, especialmente ligação a proteínas plasmáticas (Taylor *et al*, 2001; Solas *et al*, 2003) e afinidade por transportadores de múltiplas drogas como a Pgp (Huisman *et al*, 2000; Sankating *et al*, 2004). Assim, a baixa penetração de LPV e RTV no compartimento genital é consistente com sua extensiva ligação às proteínas plasmáticas (maior do que 98%) (Hsu *et al*, 1998; Boffito *et al*, 2004). Além disso, todos os IPs são substrato de Pgp, que pode atuar limitando a penetração e retenção desses fármacos no compartimento genital. Consolidando esta idéia, inibidores da Pgp são capazes de aumentar o acúmulo de IPs nos testículos de camundongos (Choo *et al*, 2000). Portanto, é possível que a Pgp esteja contribuindo na ampla variabilidade interindividual na razão sêmen/sangue para ambos os fármacos estudados neste

trabalho. Mais ainda, que esta variabilidade observada entre os indivíduos possa estar relacionada com polimorfismos no gene *ABCB1*.

Estes dados nos levaram a investigar a relação entre os polimorfismos de *ABCB1* e a distribuição dos IPs para o sêmen e saliva de homens infectados com o HIV1, constituindo um dos objetivos principais deste trabalho.

4.2. Impacto da miscigenação brasileira na distribuição de polimorfismos de *ABCB1* em voluntários sadios

Apresentação do artigo “The distribution of *ABCB1* polymorphisms among Brazilians: Impact of population admixture.” Enviado para publicação em novembro de 2007 na revista *Pharmacogenomics*. Autores: Rita C. E. Estrela, Fabio S. Ribeiro, Renato S. Carvalho, Sheila P. Gregório, Emmanuel Dias-Neto, Cláudio J. Struchiner, Guilherme Suarez-Kurtz. (Apêndice C)

Polimorfismos do gene *ABCB1*, principalmente os três SNPs exônicos (1236C>T, 2677G>T/A e 3435C>T) que estão em forte desequilíbrio de ligação, têm sido extensivamente estudados sob a perspectiva da farmacogenética. A frequência com que esses polimorfismos aparecem varia entre populações continentais (Kroetz *et al*, 2003). De modo que, diversidades populacionais, se não reconhecidas e controladas, podem levar a resultados espúrios em estudos de associação genética (Freedman *et al*, 2004). Leschziner e colaboradores (2007) recomendam que futuros estudos de associação com o gene *ABCB1* incluam controles de estratificação, seja com o uso de marcadores genéticos distintos (marcador informativo de ancestralidade ou AIMs) ou limitando a população estudada para uma etnia. Essas recomendações são particularmente pertinentes para populações miscigenadas como a brasileira (de origem ancestral

tri-híbrida: ameríndios, europeus e africanos). A distribuição dos polimorfismos de *ABCB1* na população brasileira foi feita anteriormente por dois grupos (Fiegenbaum *et al*, 2005; Rodrigues *et al*, 2005), mas estes trabalhos não contemplavam a variabilidade racial da população, já que os participantes eram exclusivamente descendentes de europeus. No atual trabalho avaliou-se o impacto da estratificação da população brasileira na distribuição dos três polimorfismos mais estudados de *ABCB1*. Um total de 320 indivíduos adultos saudáveis residentes no estado do Rio de Janeiro, que se auto-classificaram (pelo mesmo método utilizado no censo pelo IBGE) como branco, pardo (intermediário) ou preto participaram deste estudo. Todos os participantes foram previamente tipados com um painel validado de marcadores informativos de ancestralidade, e o componente de ancestralidade africana (ACA) foi avaliado.

A Tabela 1 do artigo (Apêndice C) mostra as frequências alélicas e genótípicas dos polimorfismos de *ABCB1* 1236C>T, 2677G>T/A e 3435 C>T em brancos, pardos e pretos. Os genótipos observados para os polimorfismos nos exons 12, 21 e 26 encontram-se em equilíbrio de Hardy–Weinberg. A distribuição alélica e genotípica de 1236C>T não difere significativamente entre os três grupos populacionais. Em contraste, diferenças significativas foram observadas na distribuição das frequências alélicas e genótípicas de 2677G>T/A ($P=0,0001$ e $0,0004$) e 3435C>T ($P=0,004$ e $0,005$). A comparação pareada entre os três grupos mostra diferenças significativas entre brancos e pretos para a distribuição alélica e genotípica no loci 2677 ($P<0,0001$) e 3435 ($P=0,012$ para alelo e $P=0,002$ para genótipo). Os grupos preto e intermediário diferem significativamente na distribuição alélica e genotípica para o polimorfismo 2677G>T ($P=0,02$ e $P=0,04$). Os grupos branco e intermediário diferem significativamente na

distribuição alélica e genotípica para 3435 ($P=0,02$ para ambos) e na frequência alélica de 2677 ($P=0,05$), mas não na distribuição genotípica.

Análises usando o programa VG2 mostraram que os SNPs 1236C>T, 2677G>T/A e 3435C>T estão em desequilíbrio de ligação entre si nas três populações. O programa EH foi usado para a análise de haplótipos, os alelos 2677A (frequência menor do que 2% em toda a população estudada) e 2677T foram agrupados como *nonG*. Baseado nos três sítios exônicos, oito haplótipos foram detectados dos quais um (T/G/T) não estava presente nos auto-classificados como brancos e outro (C/T/T) não foi detectado em pretos. Quatro haplótipos (C/G/C, T/*nonG*/T, C/G/T and T/G/C) respondem a 91-97% da variabilidade genética nos três grupos populacionais (Tabela 2 do artigo – Apêndice C). A comparação pareada revela diferenças significativas entre os sujeitos pretos e brancos ($P=0.013$), mas não entre os intermediários e os outros dois grupos. T/*nonG*/T foi o haplótipos variante mais comum em todos os grupos, mas sua frequência diminui significativamente ($P=0.001$, χ^2 teste para tendência) de indivíduos brancos para intermediários, para pretos.

A extensiva miscigenação da população brasileira resulta em uma pobre correlação entre a auto-classificação de cor e a ancestralidade genética. Neste trabalho a ancestralidade genética pôde ser uma alternativa, uma vez que, o grupo de indivíduos que participou deste estudo já haviam sido previamente genotipado com uma painel de AIMs, que dá uma estimativa individual das proporções de ancestralidade ameríndia, européia e africana sub-sahariana (para maiores detalhes ver Parra *et al*, 2003). Desses dados, foi derivado um parâmetro que representa o componente de ancestralidade africano, ou ACA. As proporções de ACA individuais em toda a população estudada está na faixa de 0,13-0,94,

com valores médios (DP) de 0,33 (0,12), 0,49 (0,15) e 0,65 (0,17) nos indivíduos que se auto declararam brancos, intermediários e pretos, respectivamente. Apesar da extensiva sobreposição nos valores individuais de ACA entre os três grupos de cor de pele, cada grupo difere significativamente dos outros dois com $P < 0.0001$ (ANOVA). Usando os valores de ACA, a população foi dividida em quatro grupos ($<0,25$; $0,25 - 0,50$; $0,50 - 0,75$; $>0,75$). O teste de χ^2 para tendência revelou uma diminuição significativa na frequência do alelo T e no genótipo TT ou nonGnonG para cada locus, de acordo com o aumento de ACA (Figura 1 do artigo – Apêndice C). A associação entre ACA e o fato de ser um carreador do alelo T para cada locus de *ABCB1* foi altamente significativa ($P = 0,008$ para 1236T, e $P < 0,0001$ para 2677T e 3435T, estatística Wald).

A Tabela 3 do artigo (Apêndice C) mostra o impacto da miscigenação da população brasileira, através da análise da influência da ancestralidade africana na distribuição dos haplótipos de *ABCB1*. Uma associação significativa foi encontrada entre ACA e os haplótipos variantes T/nonG/T e T/G/T de *ABCB1*. Na tabela 4 do artigo (Apêndice B) foi avaliada se a distribuição do haplótipo T/nonG/T estava associada com os valores individuais de ACA, com cada grupo de cor auto declarada. No grupo dos brancos, não existe diferença significativa no ACA estimado entre os indivíduos que tinham zero, uma ou duas cópias do haplótipo T/nonG/T. Em contraste, no grupo intermediário o ACA diminuiu com o aumento do número de cópias do haplótipo T/nonG/T ($P = 0.028$, ANOVA) e no grupo de pretos, carreadores do haplótipo T/nonG/T têm ACA significativamente menor do que os não carreadores ($P < 0.0001$, teste t).

Esse é o primeiro estudo do impacto da estrutura populacional nos polimorfismos de *ABCB1* entre brasileiros. Embora os brasileiros compartilhem

três origens ancestrais, a saber, ameríndios (americanos nativos), europeus e africanos (Salzano *et al*, 2002; Parra *et al*, 2003) a estrutura da amostra populacional estudada é mais bem explicada pela mistura de dois grupos, representando as proporções de ancestralidade européia e africana, respectivamente (Suarez-Kurtz *et al*, 2007). As razões para a perda de significância do grupo ameríndio podem estar relacionadas ao algoritmo usado pelo programa Structure e principalmente pela pequena proporção de ancestralidade ameríndia na população urbana do Rio de Janeiro (Suarez-Kurtz *et al*, 2007). Apesar da sobreposição dos valores de ACA entre os três grupos de auto-classificação, a distribuição dos polimorfismos de ABCB1 diferem significativamente entre eles. A observação de uma tendência de diminuição na frequência do alelo T e do genótipo TT para o loci 2677 e 3435 e no haplótipo T/nonG/T dos brancos para os intermediários e para os pretos auto-classificados, são consistentes com a menor prevalência dessas variantes em Africanos sub-saharianos, comparado aos europeus (Kroetz *et al*, 2003; Ameyaw *et al*, 2001; Allabi *et al*, 2005). Entretanto, é importante destacar que a distribuição alélica e genotípica neste loci no grupo dos pretos Brasileiros é significativamente diferente dos dados disponíveis para populações Beninenses sub-saharianos, de Gana e Quênia. Essas diferenças refletem numa maior frequência do alelo variante T nos três loci de ABCB1 nos Brasileiros pretos em relação à população sub-sahariana, que pode ser atribuída a substancial contribuição Européia no grupo de brasileiros pretos, sobre cinco séculos de miscigenação (Salzano *et al*, 2002; Parra *et al*, 2003).

Por serem os portugueses a fonte mais importante de migração para o Brasil, comparou-se o dado deste trabalho com os dados disponíveis da

população Portuguesa. Não foram encontradas diferenças a respeito da distribuição dos polimorfismos 1236C>T e 2677G>T/A entre portugueses e brancos brasileiros. Entretanto, o alelo 3435T ocorre com maior frequência nos Portugueses (Ameyaw *et al*, 2001) do que nos brancos Brasileiros (0,57 vs. 0,46, $P=0,049$). Uma explicação para esta discrepância seria a evidente contribuição Africana para o “pool” genético dos Brasileiros brancos, confirmado pelo ACA estimado neste estudo.

Este trabalho nos sugere que a cor da pele não é um bom indicador de ancestralidade genética, e por extensão, representa fracamente a diversidade farmacogenética em Brasileiros. Portanto, estimar a ancestralidade genética através do AIMS parece ser uma representação mais realista de tal diversidade.

4.3. Influência dos polimorfismos de *ABCB1* na distribuição de LPV e RTV em indivíduos HIV1⁺

Nesta parte da tese, investigamos dois aspectos: 1) a relação do genótipo de *ABCB1* com a distribuição de LPV e RTV para sêmen e saliva 2) e a relação genótipo de *ABCB1* versus funcionalidade e expressão da Pgp, empregando a técnica de citometria de fluxo. Um total de 113 homens infectados com o vírus HIV1 e utilizando um esquema HAART contendo Kaletra® por mais de quatro semanas foram recrutados para este estudo no período de julho de 2005 a junho de 2006, com idade média de 44 anos (faixa de 28-69 anos). Somente quatro pacientes faziam monoterapia com Kaletra®. Outros IPs e análogos nucleosídicos foram utilizados concomitantemente com LPV/RTV (ANEXO G)

4.3.1 Distribuição alélica e genotípica dos polimorfismos de *ABCB1* em pacientes HIV⁺

As frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos estudados estão na Tabela 9. Os genótipos observados para os polimorfismos nos exons 12, 21 e 26 encontram-se em equilíbrio de Hardy–Weinberg. Não há diferenças significativas na distribuição das frequências alélicas e genotípicas entre o grupo de voluntários sadios e pacientes ($P=0,06-0,78$ e $0,19-0,86$, respectivamente). As frequências haplotípicas também foram calculadas para este grupo (Tabela 10) e não diferem significativamente do grupo de voluntários sadios estudados anteriormente ($P=0,84$). A ocorrência do haplótipo mais freqüente, T/nonG/T, foi de 18,6%. Este haplótipo também foi o mais freqüente para voluntários sadios.

Tabela 9. Distribuição das frequências alélica e genotípica dos polimorfismos de *ABCB1* para pacientes HIV⁺

Polimorfismo	exon 12 (1236C>T)	exon 21 (2677G>T/A)	exon 26 (3435C>T)
Frequência Genotípica (IC 95%)	CC 0,53 (0,43-0,63) CT 0,35 (0,27-0,45) TT 0,12 (0,06-0,19)	GG 0,60 (0,51-0,69) GT 0,34 (0,25-0,43) GA 0,02 (0,002-0,06) TT 0,04 (0,01-0,10) TA 0,00	CC 0,40 (0,31-0,50) CT 0,48 (0,38-0,57) TT 0,12 (0,07-0,20)
Frequência Alélica (IC 95%)	C 0,71 (0,64-0,77) T 0,29 (0,23-0,36)	G 0,78 (0,72-0,83) T 0,21 (0,16-0,27) A 0,09 (0,001-0,30)	C 0,64 (0,57-0,70) T 0,36 (0,30-0,43)

Tabela 10. Frequência haplotípica de *ABCB1* para pacientes HIV⁺

Haplótipo	Pacientes
C/G/C	0,544
C/G/T	0,145
C/nonG/C	0,006
C/nonG/T	0,013
TGC	0,072
TGT	0,018
T/nonG/C	0,016
T/nonG/T	0,186

4.3.2 Níveis de LPV e RTV nos plasmas sangüíneo e seminal, na saliva e na fração livre no sangue

Por não haver grande diferença entre a C_{min} e C_{max} de LPV observadas no estudo prévio (Apêndice B), a C_{min} foi o parâmetro farmacocinético escolhido para esta etapa do trabalho por facilitar o horário de coleta das amostras, além de ser o tempo de coleta utilizado na monitoração de rotina clínica para anti-retrovirais (Back *et al*, 2002). Todos os 113 pacientes recrutados neste estudo tiveram suas amostras de plasma sangüíneas analisadas e LPV e RTV quantificado. A partir desses resultados, excluimos 14 indivíduos por apresentarem concentrações plasmáticas inferiores a 200 ng/mL e estes não tiveram suas amostras de sêmen e saliva analisadas. Este critério de exclusão foi baseado no trabalho de van der Leur e colaboradores (2006), em que os sujeitos com concentração plasmática de LPV menor que 200 ng/mL, foram considerados não-aderentes ao tratamento. Assim, 97 amostras de plasma seminal (dois indivíduos não coletaram esta amostra) e 94 de saliva (cinco indivíduos não coletaram esta amostra) foram analisadas. As concentrações individuais de LPV e RTV no sangue, sêmen, saliva e fração livre estão no Anexo G.

As medianas de concentração e a estatística descritiva (excluindo os pacientes não aderentes) de LPV e RTV em plasma sangüíneo, no sêmen, na saliva e na fração livre estão nas Tabelas 11 (LPV) e 12 (RTV). LPV e RTV foram detectados em todas as amostras de saliva, mas no sêmen RTV não foi detectado em duas amostras e na fração livre do plasma sangüíneo só foi detectado em 51/86 amostras analisadas.

Tabela 11. Estatística das concentrações de LPV no plasma sangüíneo, seminal, saliva e fração livre

	plasma sangüíneo (ng/mL)	fração livre (ng/mL)	saliva (ng/mL)	sêmen (ng/mL)
N	99	86	94	96
Valor mínimo	278,7	2,46	4,67	6,12
25% Percentil	3831	9,23	37,96	128,4
Mediana	6326	18,24	72,67	282,6
75% Percentil	8617	44,84	119,6	475,5
Valor máximo	15688	112,8	294,6	3829
Média	6484	29,75	92,26	453,3
Desvio Padrão	3199	27,33	70	613,5
Erro Padrão	321,5	2,947	7,22	62,62

Tabela 12. Estatística das concentrações de RTV no plasma sangüíneo, seminal, saliva e fração livre

	plasma sangüíneo (ng/mL)	fração livre (ng/mL)	saliva (ng/mL)	sêmen (ng/mL)
N	99	51	94	95
Valor mínimo	39,14	1	1,12	1,78
25% Percentil	152,8	1,26	3,22	9,24
Mediana	261,8	2,01	5,28	17,72
75% Percentil	422	2,96	9,035	27,92
Valor máximo	1201	7,86	28,31	160,8
Média	318,6	2,523	7,338	23,87
Desvio Padrão	220,2	1,723	5,801	23,64
Erro Padrão	22,13	0,2413	0,5983	2,425

A mediana das razões saliva/plasma, saliva/fração livre, plasma seminal/plasma sangüíneo, e fração livre/plasma sangüíneo para LPV estão na Tabela 13 e para RTV na Tabela 14.

Tabela 13. Estatística descritiva para as razões das concentrações (%) de LPV em saliva/plasma, saliva/fração livre, sêmen/plasma, fração livre/plasma e sêmen/fração livre

	saliva/plasma (%)	saliva/fração livre (%)	sêmen/plasma (%)	fração livre/plasma (%)	sêmen/fração livre (%)
N	94	83	97	86	85
Valor mínimo	0,21	56,05	0,07961	0,02878	25,34
25%					
Percentil	0,81	238,7	2,881	0,1748	761,6
Mediana	1,32	420,3	4,615	0,3196	1311
75%					
Percentil	2,085	728,2	6,678	0,5202	3454
Valor máximo	6,72	2903	78,5	1,581	28843
Média	1,55	584,7	7,705	0,3807	3285
Desvio					
Padrão	1,033	514,5	11,66	0,2779	4829
Erro Padrão	0,1066	56,47	1,184	0,02997	523,8

Tabela 14. Estatística descritiva para as razões das concentrações (%) de RTV em saliva/plasma, saliva/fração livre, sêmen/plasma, fração livre/plasma e sêmen/fração livre

	saliva/plasma (%)	saliva/fração livre (%)	sêmen/plasma (%)	fração livre/plasma (%)	sêmen/fração livre (%)
N	94	50	95	52	51
Valor mínimo	0,21	87,41	0,5775	0,1827	52
25%					
Percentil	1,335	252,9	3,911	0,4336	570,9
Mediana	2,165	422,6	6,365	0,5659	997,1
75%					
Percentil	3,715	608,3	9,338	0,7096	1689
Valor máximo	14,63	1378	40,94	2,62	12762
Média	2,821	473,9	8,202	0,6515	1628
Desvio					
Padrão	2,142	307,8	7,157	0,4012	2121
Erro Padrão	0,2209	43,52	0,7343	0,05563	297

Os dados de concentração plasmática sangüínea e seminal estão em concordância com outros autores (Cvetkovic *et al*, 2003; Hurst *et al*, 2000; Solas *et al*, 2003), assim como com os dados previamente descritos neste trabalho (Apêndice B). As porcentagens de fração livre dos fármacos no sangue estão muito próximas dos valores encontrados no trabalho de Ehrhardt e colaboradores (0,52% para RTV e 0,345% para LPV). Entretanto, não existem dados na literatura disponíveis a respeito das concentrações de LPV e RTV presentes na saliva. As tabelas anteriores mostram uma grande variabilidade interindividual nas diferentes matrizes para LPV e RTV. As razões saliva/fração livre e sêmen/fração livre mostram que a passagem de LPV e RTV do sangue para estes compartimentos é independente da concentração de fármaco livre no sangue, uma vez que a quantidade encontrada na saliva e no sêmen é maior do que a fração não ligada à proteína plasmática. Apesar disso, fica clara a existência de saturação na passagem de LPV e RTV para sêmen e saliva quando analisamos os valores das razões sêmen/plasma total e saliva/plasma total diferentemente do que ocorre com indinavir (Hugen *et al*, 2000), outro IP. Os IPs são bases fracas e no sangue estão majoritariamente na forma não ionizada, penetrando nas membranas facilmente. O mecanismo de acumulação intracelular dos IPs continua desconhecido. Algumas propriedades físico-químicas da molécula, tais como constante de dissociação (pKa) e coeficiente de partição vão ser importantes no acúmulo. Além disso, outros fatores como, sequestro devido à ligação intracelular com proteínas ou sequestro iônico podem interferir no acúmulo intracelular (Hoggard *et al*, 2003). Dependendo do pH do compartimento e do pKa do IP (RTV pKa=2,8), o IP pode tornar-se ionizado e permanecer/acumular no compartimento. O acúmulo de LPV e RTV na saliva e no

sêmen, não podem ser explicadas pela ionização das moléculas no compartimento, já que o pH é neutro (7,0-7,8). Na saliva acredita-se que os IPs sofrem adsorção de constituintes da saliva, tais como proteínas e mucopolisacrídeos (HUGEN et al, 2000). O mesmo pode ocorrer com o sêmen, que possui altos níveis de proteína. Para elucidar este questionamento o ideal seria avaliar a fração livre de IPs presente na saliva e no sêmen. Outra possibilidade que não deve ser descartada é o transporte ativo desses fármacos para os compartimentos em questão, existem evidências da expressão de uma ampla variedade de transportadores da família ABCB1 nas glândulas salivares (UEMATSU et al, 2001; UEMATSU et al, 2003), e nos testículos (CASCORBI et al, 2006).

A saliva tem sido a matriz usada como uma alternativa na monitoração terapêutica de vários fármacos, no diagnóstico de HIV e detecção do uso de drogas de abuso, principalmente pelo fato de não ser uma coleta invasiva (APS et al, 2005). Neste trabalho avaliamos a possibilidade de usar a saliva como um indicador das concentrações livre e/ou seminal de LPV e RTV, analisando o perfil de regressão linear entre essas matrizes (programa Origin 7.0 Enterprise Edition). Além disso, verificamos a existência de correlação entre os dados de concentração de LPV e RTV no plasma sangüíneo total com todas as outras matrizes. A Tabela 15 mostra a correlação entre as concentrações de LPV ou RTV nas diferentes matrizes e o nível de significância. Na Figura 13 estão os gráficos de regressão linear para LPV e RTV no plasma sangüíneo versus fração livre e na Figura 14 estão os gráficos de regressão linear para LPV e RTV no plasma sangüíneo versus saliva. A Figura 15 mostra a correlação de LPV e RTV na saliva versus a fração livre.

Tabela 15. Correlação (R) e nível de significância (P valor) dos níveis de Lopinavir ou Ritonavir em diferentes matrizes

matrizes	Lopinavir		Ritonavir	
	R	P	R	P
plasma sangüíneo x fração livre	0,718	<0,0001	0,489	0,0002
plasma sangüíneo x saliva	0,512	<0,0001	0,643	<0,0001
plasma sangüíneo x plasma seminal	0,221	0,0298	0,397	<0,0001
saliva x fração livre	0,482	<0,0001	0,393	0,0048
saliva x plasma seminal	0,09	0,3708	0,023	0,0309
fração livre x plasma seminal	0,07	0,4991	0,08	0,5458

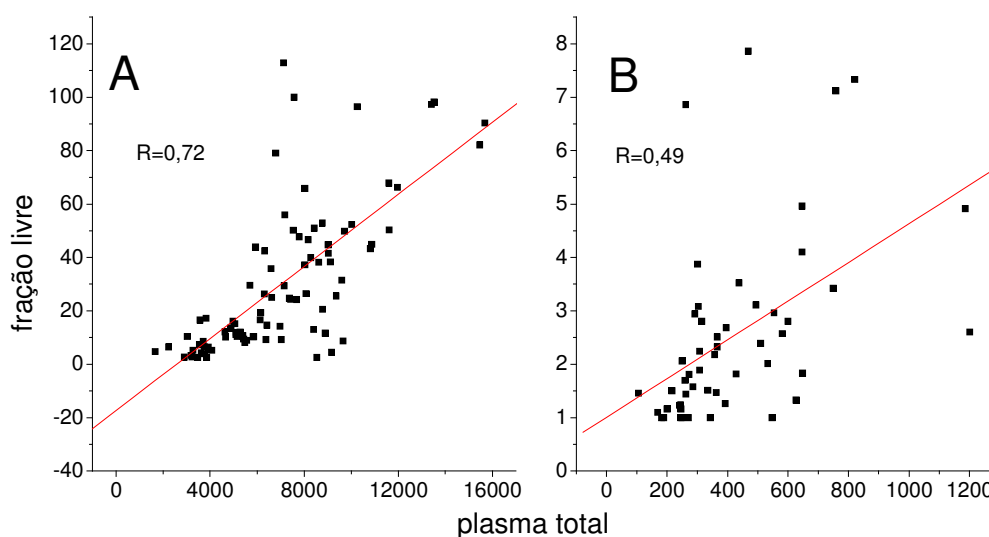


Figura 13. Regressão linear para LPV (A) e RTV (B) no plasma sangüíneo versus fração livre

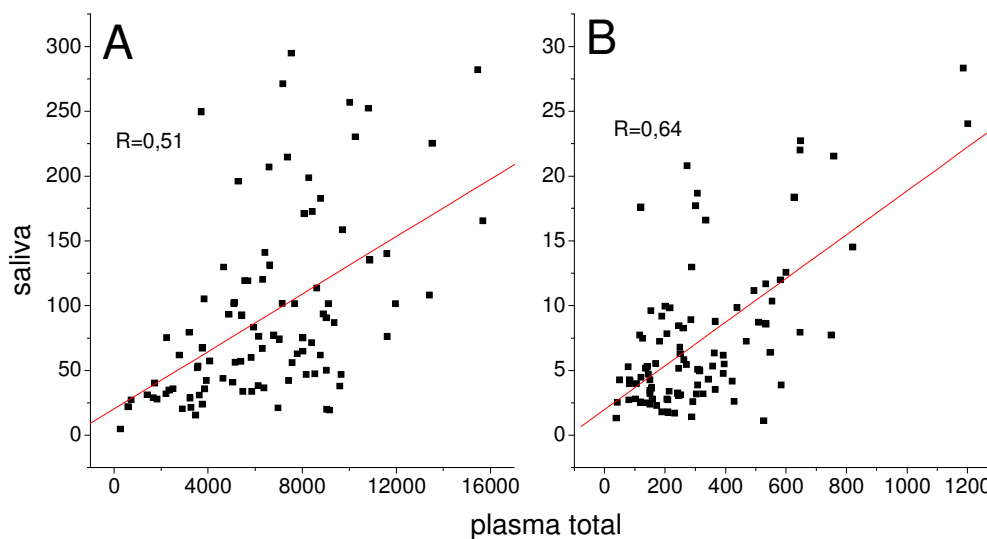


Figura 14. Regressão linear para LPV (A) e RTV (B) no plasma sanguíneo versus saliva

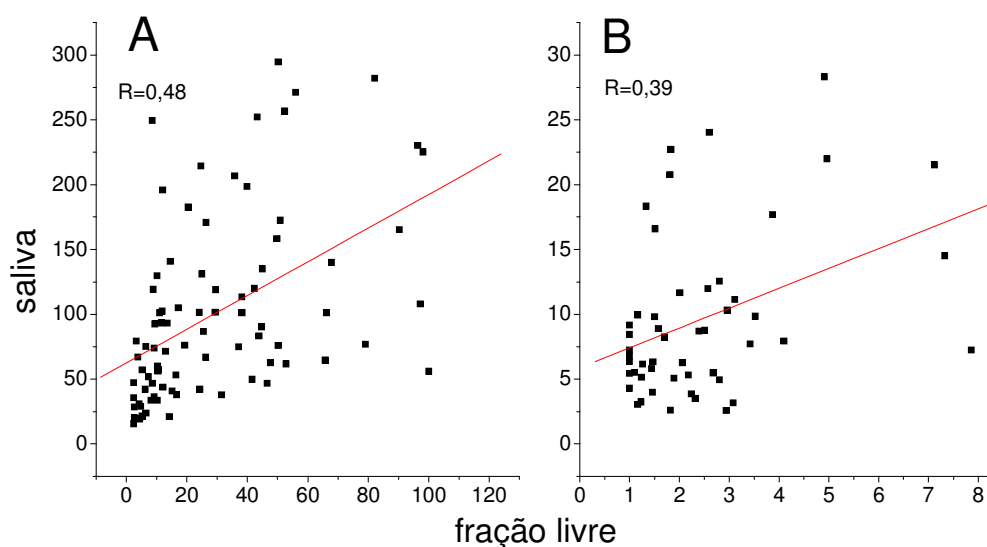


Figura 15. Regressão linear para LPV (A) e RTV (B) na fração livre versus saliva

Uma forte correlação foi encontrada entre o plasma sanguíneo total e a fração livre, para LPV ($R=0,72$ e $P<0,01$). Uma correlação significativa ($P<0,01$) foi encontrada entre o plasma sanguíneo total e a fração livre para RTV, e o mesmo

ocorreu para LPV e RTV no plasma sangüíneo total versus saliva, e saliva versus fração livre.

Este conjunto de dados indica que a saliva não parece ser uma amostra indicativa das concentrações presentes no sêmen ou fração livre de LPV e RTV. Para a adoção da saliva como espécime intercambiável seria necessário o preenchimento de alguns requisitos como: secreção de LPV e RTV na saliva, boa correlação entre a saliva e sêmen ou saliva e fração livre, e ainda, uma menor variação interindividual das concentrações de LPV e RTV na saliva. Surpreendentemente, não parece necessária a determinação dos níveis de LPV livre no plasma, pois a sua dosagem no plasma sangüíneo parece se correlacionar de maneira satisfatória, apesar de sabermos que a α glicoproteína (principal proteína plasmática que se liga aos IPs) é uma proteína reconhecidamente de fase aguda e seus níveis plasmáticos durante a infecção por HIV pode variar de 4 a 5 vezes em comparação com os níveis normalmente encontrados desta proteína, que são em torno de 1mg/mL (Schon *et al*, 2003).

4.3.3 Relação dos polimorfismos de *ABCB1* e os níveis de LPV e RTV em diferentes matrizes

Os IPs são substratos da Pgp, e assim, polimorfismos no gene *ABCB1* poderiam explicar as variações interindividuais nos níveis de IPs no plasma sangüíneo (Rodriguez-Novoa *et al*, 2006). Isto nos levou a investigar a possível associação entre os polimorfismos C1236T, G2677T/A e C3435T em *ABCB1* e os níveis de LPV e RTV ($C_{\min}$) nas diferentes matrizes estudadas (sangue (total e fração livre), sêmen e saliva).

O teste estatístico não-paramétrico de Kruskal Wallis (programa GraphPad PRISMA 4.0) foi usado para determinar as diferenças nos níveis individuais de LPV ou RTV entre os genótipos de *ABCB1*. A Figura 16 mostra que as concentrações de LPV no plasma sangüíneo, plasma seminal, saliva e fração livre não diferem em relação ao locus 1236 (medianas e faixa de concentração para genótipo estão na Tabela 16). Para RTV também não foram encontradas diferenças significativas entre os genótipos (Figura 17) e a medianas nas diferentes matrizes está na Tabela 17.

Tabela 16. Medianas (faixa) das concentrações de Lopinavir (ng/mL) para os genótipos do locus 1236 de *ABCB1*.

genótipo	matriz			
	plasma	sêmen	saliva	fração livre
CC	7144 (595,9-15688)	332,6 (6,12-3829)	75,97(15,44-294,6)	25,08 (2,46-112,8)
CT	5516 (278,7-10877)	252,9 (15,54-2226)	66,9 (4,67-249,4)	12,94 (2,63-96,39)
TT	7579 (2341-13525)	277 (67,38-1808)	61,76 (34,59-225)	31,47 (10,3-100)

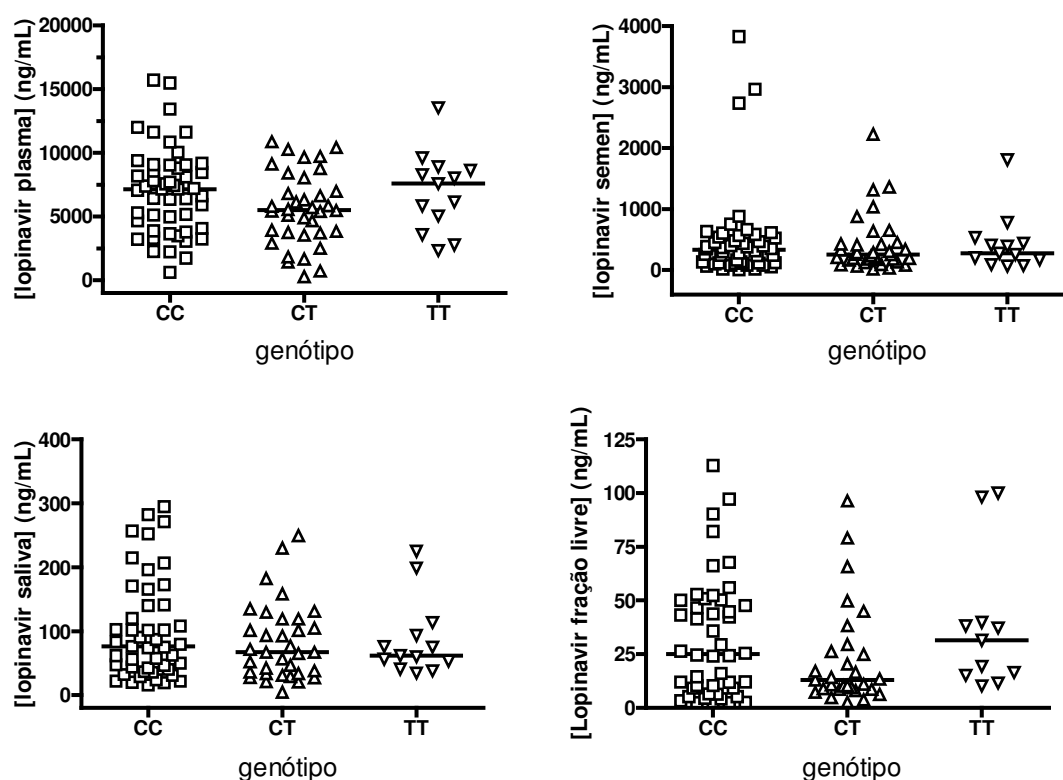


Figura 16. Distribuição das concentrações de Lopinavir em relação ao genótipo do locus 1236 no plasma, sêmen, saliva e fração livre

Tabela 17 Medianas (faixa) das concentrações de Ritonavir (ng/mL) para os genótipos do locus 1236 de *ABCB1*.

genótipo	matriz			
	plasma	sêmen	saliva	fração livre
CC	288,7 (42,44-1201)	18,28 (1,78-91,60)	5,32 (1,12-28,31)	2,10 (1-7,33)
CT	220,7 (39,14-673)	16,67 (4,24-93,96)	5,15 (1,31-18,33)	2,06 (1-7,86)
TT	251 (82,74-757,9)	15,98 (4,1-51,8)	4,26 (2,53-21,51)	1,66 (1-7,12)

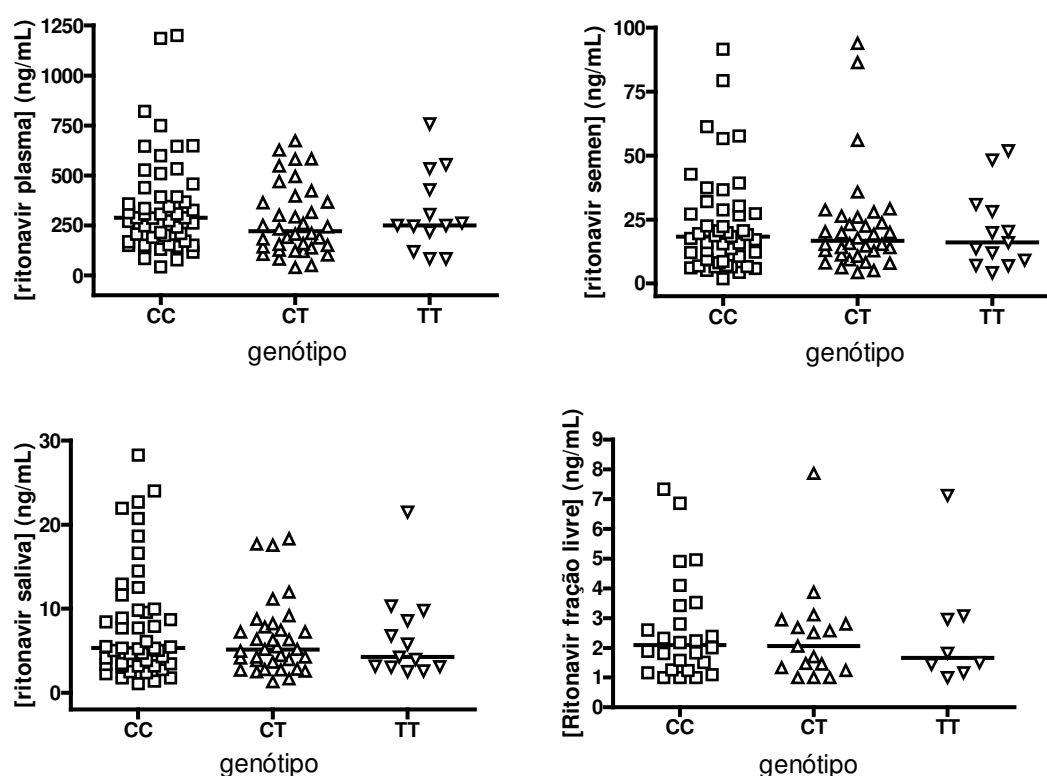


Figura 17. Distribuição das concentrações de Ritonavir em relação ao genótipo do locus 1236 no plasma, sêmen, saliva e fração livre

Assim como na análise genotípica de voluntários sadios, os alelos 2677A e 2677T foram agrupados como *nonG*. Na comparação dos sujeitos 2677GG, 2677GnonG ou 2677nonGnonG, não foram encontradas diferenças significativas na C_{vale} de LPV ou RTV em todas as matrizes estudadas (Figura 18 para LPV e Figura 19 para RTV). As medianas das concentrações de LPV e RTV para cada genótipo possível do polimorfismo G2677T/A estão nas Tabelas 18 e 19, respectivamente.

Tabela 18. Medianas (faixa) das concentrações de Lopinavir (ng/mL) para os genótipos do locus 2677 de *ABCB1*

genótipo	matriz			
	plasma	sêmen	saliva	fração livre
GG	7035 (595,9-15688)	315,1 (6,12-3829)	77,61 (15,44-294,6)	25,49 (2,46-112,8)
GnonG	5694 (278,7-13525)	278,0 (15,54-2226)	59,93 (4,67-249,4)	14,70 (2,63-98,13)
nonGnonG	7579 (3926-8905)	255,9 (88,06-441,6)	76,05 (42,23-198,6)	19,32 (6,29-100)

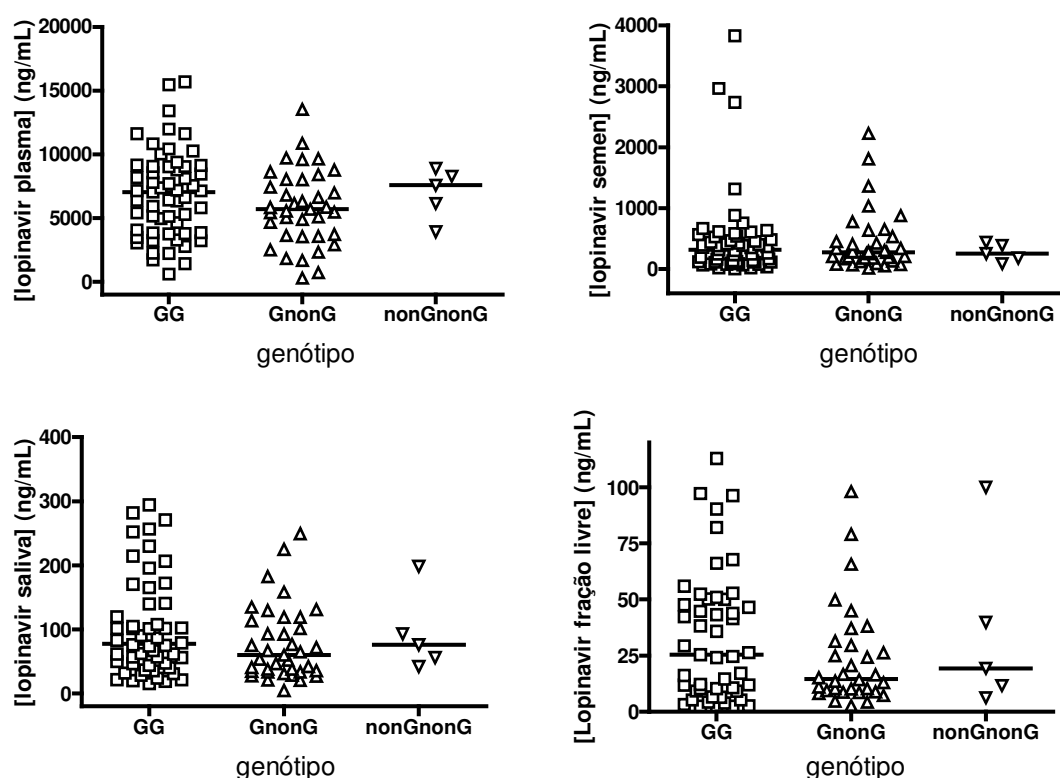


Figura 18. Distribuição das concentrações de Lopinavir em relação ao genótipo do locus 2677 no plasma, sêmen, saliva e fração livre

Tabela 19. Medianas (faixa) das concentrações de Ritonavir (ng/mL) para os genótipos do locus 2677 de ABCB1

genótipo	matriz			
	plasma	sêmen	saliva	fração livre
GG	286,1 (42,44-1201)	18,00 (1,78-93,96)	5,38 (1,12-28,31)	2,10 (1-7,33)
GnonG	250,0 (39,14-757,9)	19,18 (5,04-86,4)	4,46 (1,31-21,51)	1,94 (1-7,86)
nonGnonG	249,0 (142,3-533,8)	11,96 (7,06-30,8)	6,79 (2,5-9,8)	1,50 (1-3,08)

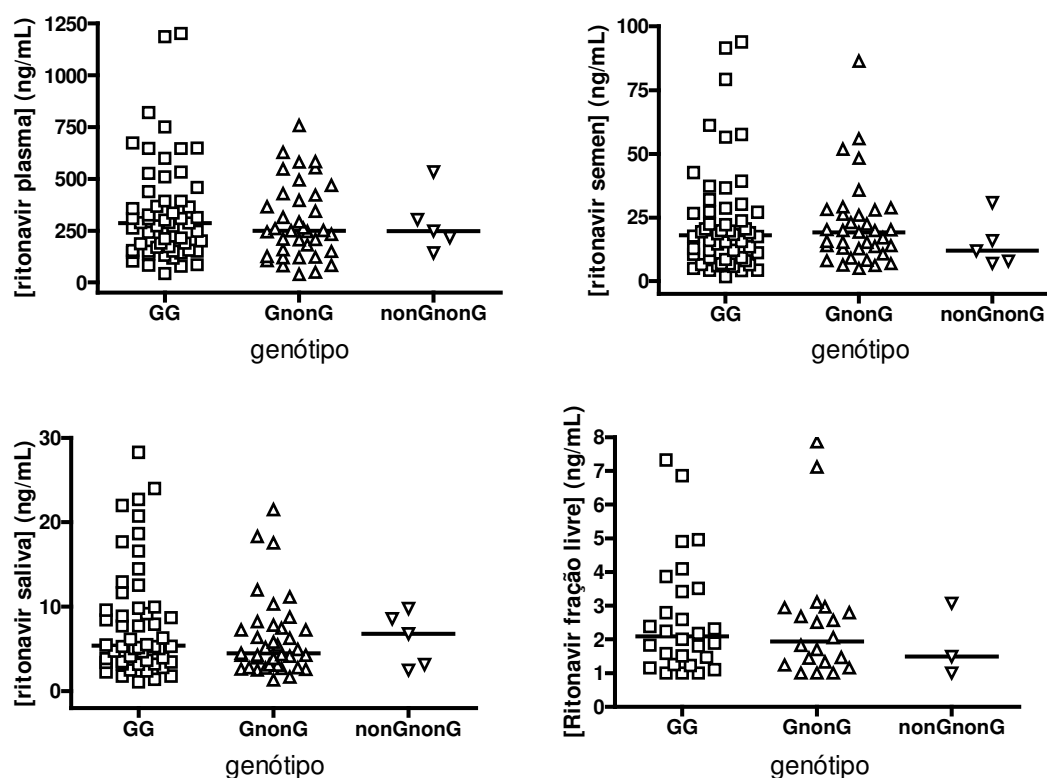


Figura 19. Distribuição das concentrações de Ritonavir em relação ao genótipo do locus 2677 no plasma, sêmen, saliva e fração livre

Assim como nos loci anteriores, a comparação dos sujeitos 3435CC, 3435CT ou 3435TT, não mostrou diferenças significativas na C_{vale} de LPV ou RTV em todas as matrizes estudadas (Figura 20, para LPV e Figura 21, para RTV). As medianas das concentrações de LPV e RTV para cada genótipo possível do polimorfismo C3435T estão nas Tabelas 20 e 21, respectivamente.

Tabela 20. Medianas (faixa) das concentrações de Lopinavir (ng/mL) para os genótipos do locus 3435 de ABCB1

genótipo	matriz			
	plasma	sêmen	saliva	fração livre
CC	5924 (595,9-15464)	301,5 (20,36-2737)	62,60 (19,15-294,6)	21,32 (2,47-112,8)
CT	6134 (278,7-15688)	279,1 (6,12-3829)	75,05 (4,67-252,1)	16,53 (2,46-98,13)
TT	8341 (1830-13411)	308 (75,38-2226)	69,09 (27,82-198,6)	23,39 (2,46-100)

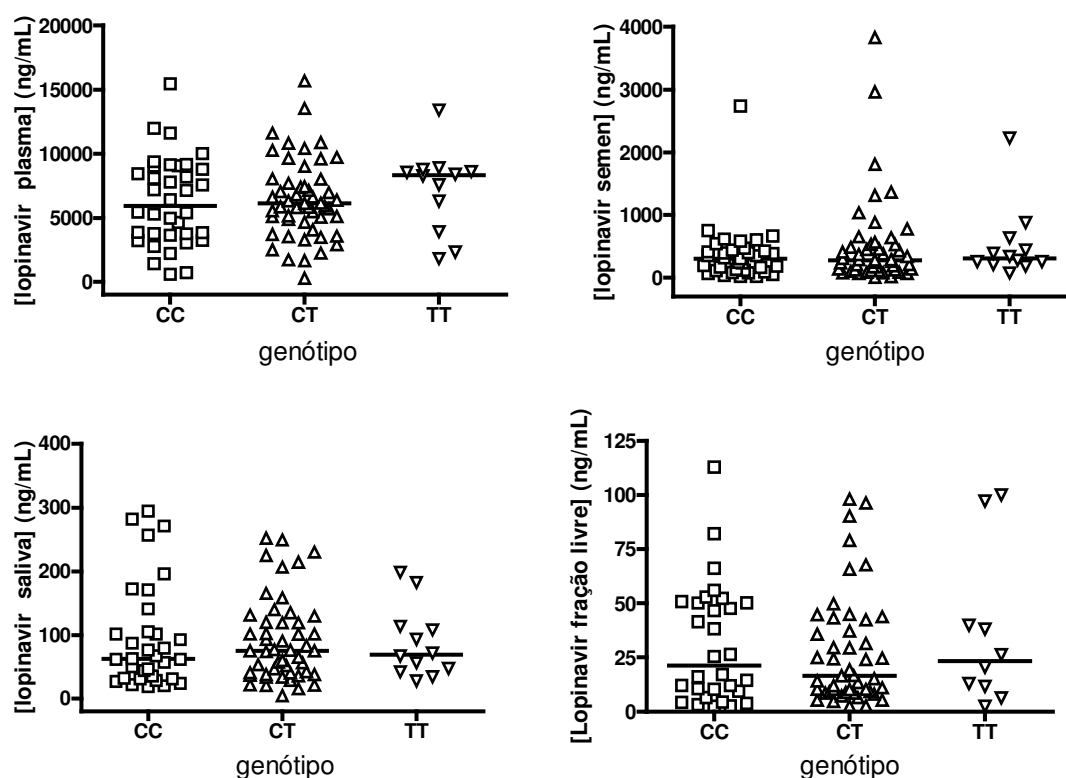


Figura 20. Distribuição das concentrações de Lopinavir em relação ao genótipo do locus 3435 no plasma, sêmen, saliva e fração livre

Tabela 21 Medianas (faixa) das concentrações de Ritonavir (ng/mL) para os genótipos do locus 3435 de ABCB1

genótipo	matriz			
	plasma	sêmen	saliva	fração livre
CC	267,5 (42,44-1201)	15,96 (1,78-21,20)	5,06 (1,12-28,31)	2,21 (1-7,86)
CT	251 (39,14-820,7)	19,18 (5,04-93,96)	5,45 (1,31-22,71)	1,83 (1-7,33)
TT	314,9 (80,14-647)	18,11 (6,82-86,4)	5,76 (2,5-18,33)	1,50 (1-4,1)

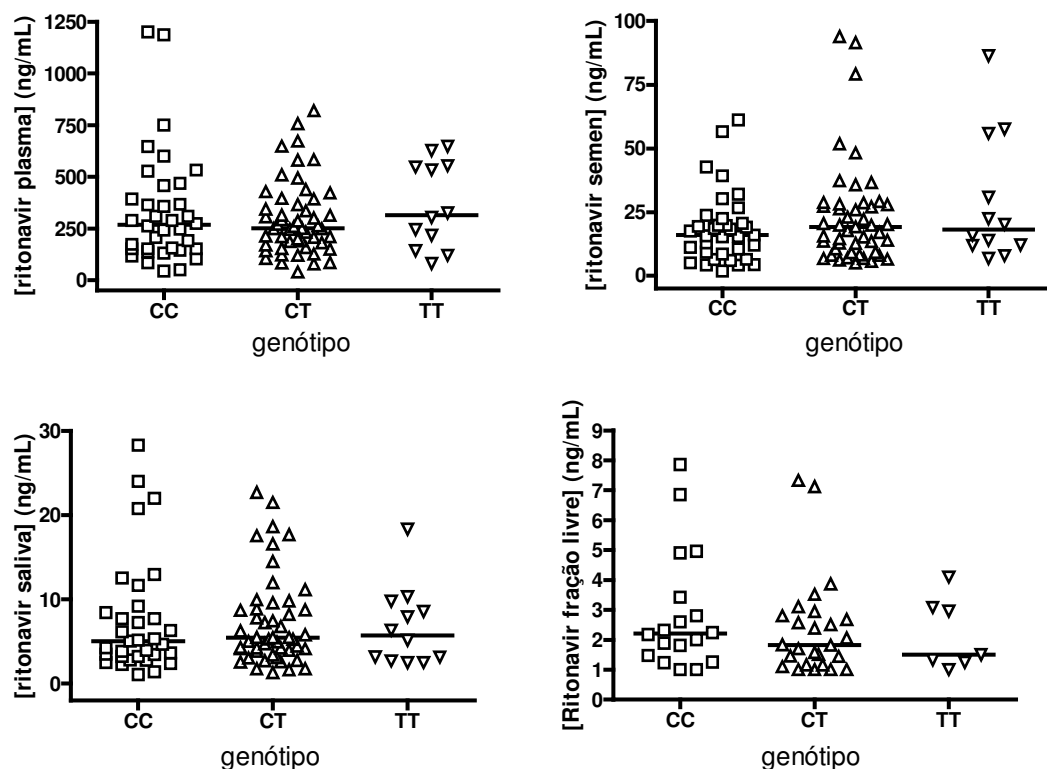


Figura 21. Distribuição das concentrações de Ritonavir em relação ao genótipo do locus 3435 no plasma, sêmen, saliva e fração livre

Em concordância com outros trabalhos publicados (Haas *et al*, 2003; Winzer *et al*, 2003; La Porte *et al*, 2007), não observamos relevância dos polimorfismos genéticos de ABCB1 na exposição aos IPs. Portanto, os polimorfismos deste gene não explicam a grande variabilidade interindividual no tratamento com esses fármacos e não parecem ter relevância clínica.

Apesar de nossa hipótese de que a distribuição e manutenção de LPV/RTV, principalmente no sêmen, estavam relacionadas com os polimorfismos de ABCB1 ter sido negada, é importante destacar que nenhum estudo havia sido realizado avaliando esta possibilidade de associação em pacientes HIV1⁺ usando LPV/RTV.

4.3.4 Correlação entre o genótipo de *ABCB1* e a expressão e funcionalidade da Pgp em linfócitos de indivíduos HIV1 positivos

A expressão e atividade da Pgp têm sido documentadas em vários tipos de linfócitos (Meaden *et al*, 2002; Parasrampur *et al*, 2001). Em pacientes HIV1⁺, há dados de que a superexpressão de Pgp está relacionada à diminuição do acúmulo em linfócitos (Chaillou *et al*, 2002).

Nesta etapa do trabalho nós acessamos o efluxo de Rod123 e a expressão de Pgp em células T CD4⁺ de 48 dos 113 indivíduos HIV-1⁺ recrutados. As amostras de células mononucleares foram analisadas por citometria de fluxo, após marcação de superfície com anticorpos anti-Pgp PE e anti-CD4 PercP, (determinação da quantidade de Pgp neste tipo celular) e ensaio de efluxo de Rod123 (determinação da funcionalidade da Pgp). Foi realizado o teste de Kruskal Wallis (GraphPad Prisma4.0) para avaliar a associação entre os genótipos e a porcentagem de efluxo de Rod123 e a expressão de Pgp. A Figura 22 mostra que não existe relação entre os diferentes genótipos de *ABCB1* e a expressão de Pgp. Nenhuma associação foi encontrada entre o efluxo de Rod123 e os polimorfismos de *ABCB1* (Figura 23).

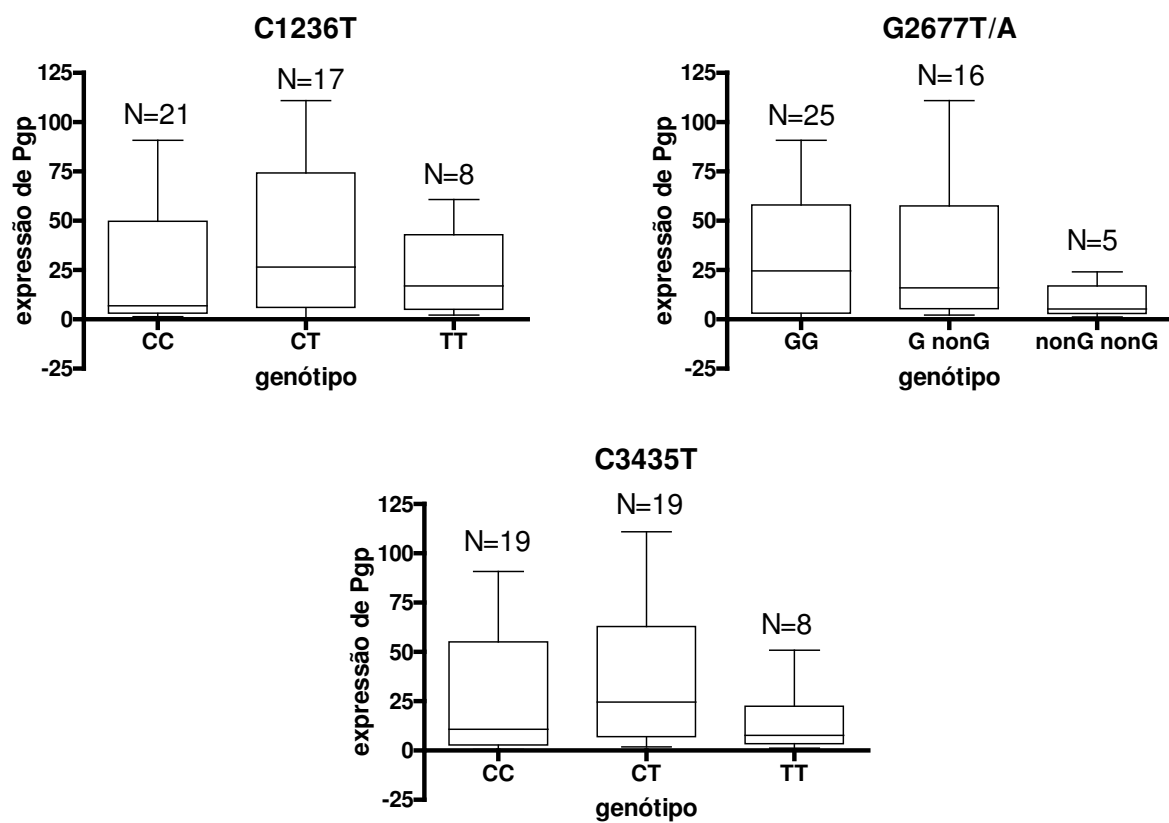


Figura 22. Expressão da Pgp em células CD4⁺ (expressa em média de intensidade de fluorescência) em relação aos polimorfismos do gene *ABCB1*.

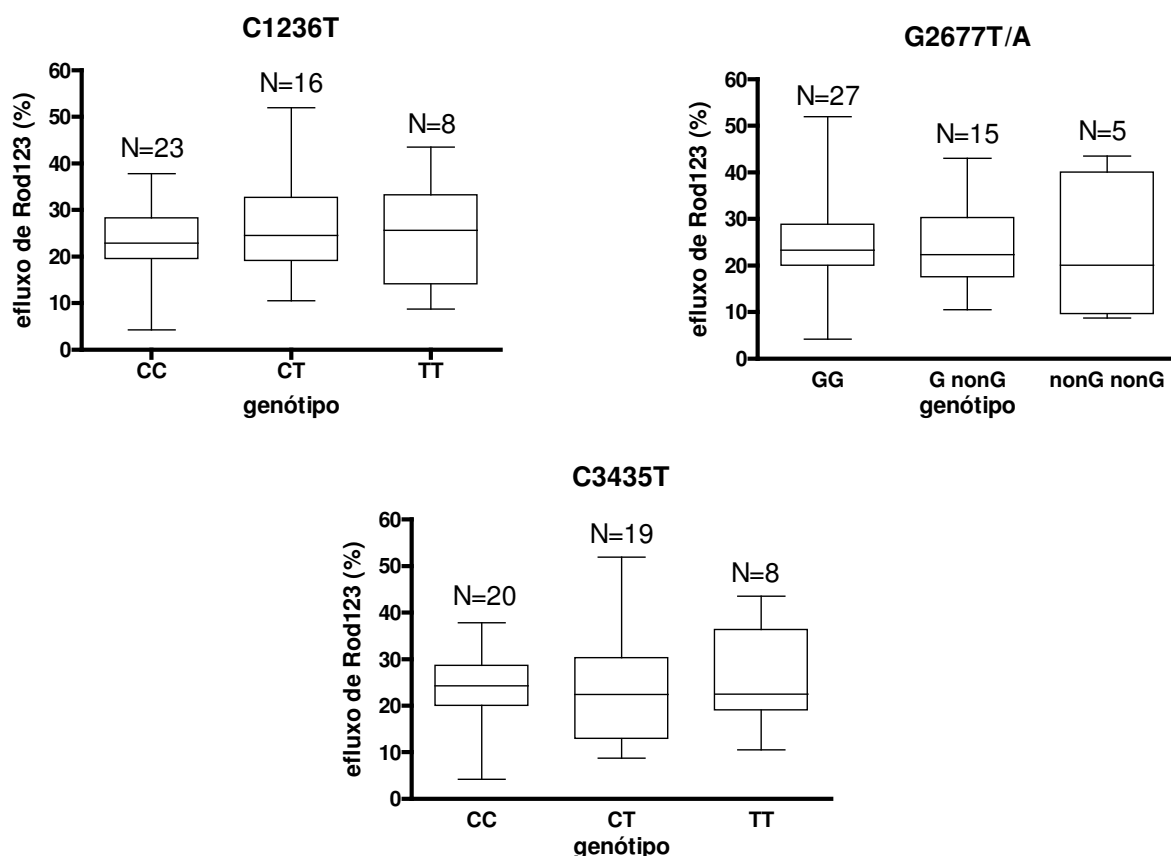


Figura 23. Funcionalidade da Pgp expressa pela porcentagem de efluxo de Rod123, em células T CD4⁺ em relação aos polimorfismos do gene *ABCB1*.

O efluxo de Rod123 não pode ser usado como um marcador de expressão da Pgp em células T CD4⁺, já que não encontramos correlação entre a expressão de Pgp e o efluxo de Rod123 (dados não mostrados), em conflito com os resultados de Robey e colaboradores (1999) para células CD56. Esta discrepância pode ter ocorrido devido a diferenças nos ensaios utilizados para a análise de expressão da Pgp e/ou pelo tipo celular estudado.

Os dados deste estudo indicam variabilidade na atividade e expressão de Pgp em células CD4⁺ das quais os polimorfismos de *ABCB1* não parecem ser responsáveis. Hitzl e colaboradores (2001) demonstraram um menor efluxo de Rod 123 em células NK CD56⁺ em indivíduos com genótipo TT do que aqueles com genótipo CC no locus 3435. Entretanto, Calado e colaboradores (2002) não

encontraram diferenças significativas no efluxo de Rod123 em células CD34⁺ entre diferentes genótipos G2677T e C3435T. A não associação entre os polimorfismos de *ABCB1* e sua atividade pode ser explicado pela existência de uma considerável sobreposição entre os substratos da Pgp e outros membros da família de transportadores ABC, que podem estar contribuindo no transporte desses substratos, como encontrado em outros trabalhos (Oselin *et al*, 2003). O primeiro grande estudo de associação com IPs demonstrou que o genótipo CC3435 estava associado com maiores concentrações plasmáticas de IP, discordante com outros estudos que sugeriam uma associação entre o genótipo TT e menores níveis de expressão e atividade de Pgp (Fellay *et al*, 2002). Haas (2005) avaliou o mesmo IP estudado por Fellay (nelfinavir) e não encontrou associação entre o genótipo e a cinética do fármaco. Resumindo, os estudos realizados não encontram associação de polimorfismos genéticos e a exposição de IPs.

A falta de associação pode estar relacionada a alguns fatores, tais como: presença de citocinas e proteínas inflamatórias devido a diferentes estágios da doença, co-morbidades e co-medicações com inibidores ou indutores da Pgp, fármacos que per se podem inibir o transporte da Pgp e fármacos que podem ser substratos de outros transportadores e a diminuição da atividade da Pgp pode ser compensada por um aumento na atividade de outro transportador (Leschziner *et al*, 2007; La Porte *et al*, 2007). Em nosso estudo provavelmente a não associação está relacionada à inibição da Pgp pelos IPs e a atividade de outros transportadores como MRP1.

4.4. Relevância do genótipo de *CYP3A5* nas concentrações plasmáticas de LPV e RTV em indivíduos HIV1⁺

Apresentação do artigo “*CYP3A5* Genotype has no Impact on Plasma Concentrations of Lopinavir and Ritonavir in HIV-infected Subjects” enviado para publicação na revista *Clinical Pharmacology Therapeutics* em setembro de 2007. Autores: Rita C. E. Estrela, Ana B. Santoro, Paulo F. Barroso, Mary Tuyama, Guilherme Suarez-Kurtz (Apêndice D).

Este foi um trabalho suplementar ao objetivo principal da tese, uma vez que a metabolização de LPV e RTV é catalisada por enzimas da sub-família *CYP3A*. Josephson e colaboradores (2007) mostraram que o genótipo de *CYP3A5* tinha um impacto no metabolismo do IP Saquinavir.

Nesta etapa final do trabalho genotipamos 98 dos 113 pacientes em uso crônico de LPV/RTV (previamente recrutados) e avaliamos a importância deste genótipo na $C_{\min}$ plasmática destes indivíduos. Um adendo foi feito ao Projeto inicial e submetido e aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (Anexo F).

A Figura 1 do artigo (Apêndice D) mostra a distribuição da $C_{\min}$ de LPV e RTV em plasma entre os indivíduos HIV1⁺ com dois, um ou nenhum (zero) alelo funcional de *CYP3A5*. Esses resultados indicam que os polimorfismos *CYP3A5**3 e *CYP3A5**6 não afetam as concentrações plasmáticas de LPV e RTV em pacientes com regime estável de HAART. A aparente discrepância entre esses resultados e os publicados por Josephson (2007) podem estar relacionados com as diferenças de condição experimental. Nosso trabalho foi feito com pacientes ao invés de voluntários saudáveis, RTV é usado como “boosting”, o parâmetro farmacocinético usado por nós foi a $C_{\min}$ e não a área sob a curva e os IPs

estudados foram diferentes (LPV e RTV versus saquinavir). Nós acreditamos que o uso de RTV como “boosting”, foi a principal razão para que os polimorfismos de *CYP3A5* não tivessem impacto em nosso estudo. Na verdade o uso de RTV em baixas doses na clínica é propositadamente, já que inibe *CYP3A* e desta forma eleva os níveis do outro IP, evitando um número grande de administrações do medicamento. RTV também é usado como “boosting” para saquinavir e por esta razão acreditamos que os polimorfismos de *CYP3A5* não têm relevância clínica no tratamento com IPs.

5. CONCLUSÕES

A distribuição alélica, genotípica e haplotípica dos polimorfismos C1236T, G2677T/A e C3435T do gene *ABCB1* não difere significativamente entre voluntários sadios e indivíduos HIV1⁺.

A categorização étnica auto-declarada baseada na cor da pele não representa adequadamente a distribuição dos polimorfismos de *ABCB1* na população brasileira.

Os polimorfismos C1236T, G2677T/A e C3435T do gene *ABCB1* e o número de alelos funcionais de *CYP3A5* não explicam a variabilidade farmacocinética de LPV e RTV, observada entre indivíduos HIV1⁺ tratados cronicamente com estes medicamentos.

A expressão e funcionalidade de Pgp em células T CD4⁺ de pacientes HIV1⁺ tratados cronicamente com HAART não são dependentes dos polimorfismos de *ABCB1* aqui estudados.

REFERÊNCIAS

- Allabi AC, Horsmans Y, Issaoui B, Gala JL. Single nucleotide polymorphisms of ABCB1 (MDR1) gene and distinct haplotype profile in a West Black African population. *Eur J Clin Pharmacol* 2005; 61:97-102.
- Ambudkar S.V., Kimchi-Sarfaty C., Sauna Z.E., Gottesman M.M. P-glycoprotein: from genomics to mechanism. *Oncogene*. 2003; 22:7468-7485.
- Ameyaw MM, Regateiro F, Li T, Liu X, Tariq M, Mobarek A, et al. MDR1 pharmacogenetics: frequency of the C3435T mutation in exon 26 is significantly influenced by ethnicity. *Pharmacogenetics* 2001; 11:217-21.
- Anderson PL, Noormohamed SE, Henry K, et al. Semen and serum pharmacokinetics of zidovudine and zidovudine-glucuronide in men with HIV-1 infection. *Pharmacotherapy*. 2000;8:917-22.
- Aps J.K.M., Martens L.C. Review: The physiology of saliva and transfer of drugs into saliva. *Forensic Science International*. 2005; 150:119-131.
- Back D., Fletcher C., Garrafo R., Haubrich R., Hoetelmans R, et al. Therapeutic drug monitoring in HIV infection: current status and future directions. *AIDS*. 2002; S5-S37.
- Barroso PF, Schechter M, Gupta P, et al. Effect of anti-retroviral therapy on HIV shedding in semen. *Ann Intern Med*. 2000; 133:280-284.
- Boffito M, Hoggard PG, Lindup WE, et al. Lopinavir protein binding in vivo through the 12-hour dosing interval. *Ther Drug Monit*. 2004; 26:35–39.
- Calado R.T., Falcão R.P., Garcia A.B., Gabellini S.M., Zago M.A. Franco R.F. Influence of functional MDR1 gene polymorphisms on P-glycoprotein activity in CD34⁺ hematopoietic stem cells. *Haematologica*. 2002; 87:564-568.

- Cascorbi I. Role of pharmacogenetics of ATP-binding cassette transporters in the pharmacokinetics of drugs. *Pharmacol. Ther.* 2006;
- Chaillou S., Durant J., Garrafo R., Georgenthum E. Roptin C., Dunais B. Et al. Intracellular concentrations of protease inhibitors in HIV-1 infected patients: correlation with MDR-1 gene expression and low dose of ritonavir. *HIV Clin. Trials.* 2002; 3:493-501.
- Chen L.F., Hoy J., Lewin S. R. Ten years of highly active antiretroviral therapy for HIV infection. *Med. J. Australian.* 2007; 186:146-151.
- Choo EF, Leake B, Wandel C, et al. Pharmacological inhibition of P-glycoprotein transport enhances the distribution of HIV-1 protease inhibitors into brain and testes. *Drug Metab Dispos.* 2000;28:655–660.
- Cvetkovic R.S., Goa K.L. Lopinavir/Ritonavir A review of its use in the management of HIV infection. *Drugs.* 2003; 63:769-802.
- Ehrhardt M, Möck M, Haefeli WE, Mikus G, Burhenne J. J. *Chromatogr. B.* 2006; doi: 10.1016/j.jchromb.2006.11.037.
- Fellay J, Marzolini C, Meaden ER, *et al.* Response to antiretroviral treatment in HIV-1-infected individuals with allelic variants of the multidrug resistance transporter 1: a pharmacogenetics study. *Lancet.* 2002; 359:30-6.
- Fiegenbaum M, da Silveira FR, Van der Sand CR, Van der Sand LC, Ferreira ME, Pires RC, Hutz MH. The role of common variants of ABCB1, CYP3A4, and CYP3A5 genes in lipid-lowering efficacy and safety of simvastatin treatment. *Clin Pharmacol Ther* 2005; 78:551-558.

- Freedman ML, Reich D, Penney KL, McDonald GJ, Mignault AA, Patterson N et al. Assessing the impact of population stratification on genetic association studies. *Nat Genet* 2004; 36:388-93.
- Fromm M.F. The influence of MDR1 polymorphisms on P-glycoprotein expression and function in humans. *Advan. Drug Deliv. Rev.* 2002; 54:1295-1310.
- Ghosn J, Chaix ML, Peytavin G, et al. Penetration of enfurvirtide, tenofovir, efavirenz, and protease inhibitors in the genital tract of HIV-1-infected men. *AIDS* 2004; 18:1958-61.
- Gröschel B., Miller H.W., Doerr J., Cinatl J.R. Activity of cellular thymidine kinase 1 in PBMC of HIV1 infected patients: novel therapy marker. *Infection.* 2000; 28:209-213.
- Haas D.W., Wu H., Li H. et al. MDR1 gene polymorphisms and phase 1 viral decay during HIV-1 infection: an adult AIDS clinical trials group study. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 2003; 34:295-298.
- Hayden, F.G. Fármacos antivirais. In GOODMAN & GILMAN. As bases farmacológicas da terapêutica. Rio de Janeiro: Mc Graw-Hill do Brasil, 1996. 876-896p.
- Henry K, Chinnock BJ, Quinn RP, Fletcher CV, de Miranda P, Balfour HH Jr. Concurrent zidovudine levels in semen and serum determined by radioimmunoassay in patients with AIDS or AIDS-related complex. *JAMA.* 1988; 259:3023-6.
- Hitzl M., Drescher S., der Kuip H. et al. The C3435T mutation in the human MDR1 gene is associated with altered efflux of the P-glycoprotein substrate rhodamine 123 from CD56⁺ natural killer cells. *Pharmacogenetics.* 2001; 11:293-298.

- Hoffmeyer S., Burk O., von Richter O., Arnold H.P., Brockmöller J., Johné A. et al. Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlations of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2000; 97:3473-3478.
- Hoggard PG, Owen A. The mechanisms that control intracellular penetration of the HIV protease inhibitors. *J Antimicrob Chemother*. 2003; 51:493-6.
- Hsu A, Granneman GR, Bertz RJ. Ritonavir: clinical pharmacokinetics and interaction with other anti-HIV agents. *Clin Pharmacokinet*. 1998; 35:275–291.
- Huisman MT, Smit JW, Schinkel AH. Significance of P-glycoprotein for the pharmacology and clinical use of HIV protease inhibitors. *AIDS*. 2000; 14:237–242.
- Hugen P.W.H., Burger D.M., de Graaff M., ter Hofstede H.J.M., et al. Saliva as a specimen for monitoring compliance but not for predicting plasma concentration in patients with HIV treated with indinavir. *Ther. Drug Monit*. 2000; 22:437-445.
- Hurst M., Faulds D. Lopinavir: new drug profile. *Drugs*. 2000; 60:1371-1381.
- Ileiri I., Takane H., Otsubo K. The MDR1 (ABCB1) gene polymorphism and its clinical implicatios. *Clin. Pharmacokinet*. 2004; 43:553-576.
- Josephson, F. et al. *CYP3A5* genotype has an impact on the metabolism of the HIV protease inhibitor saquinavir. *Clin. Pharmacol. Ther*. 2007; 81:708-712.
- Kim RB, Leake BF, Choo EF, et al. Identification of functionally variant MDR1 alleles among European Americans and African Americans. *Clin. Pharmacol. Ther*. 2001; 70:189-199.
- Kroetz DL, Pauli-Magnus C, Hodges LM, Huang CC, Kawamoto M, Johns SJ et al. Pharmacogenetics of Membrane Transporters Investigators. Sequence diversity

and haplotype structure in the human ABCB1 (MDR1, multidrug resistance transporter) gene. *Pharmacogenetics* 2003; 13:481-94.

Leschziner GD, Andrew T, Pirmohamed M, Johnson MR. ABCB1 genotype and PGP expression, function and therapeutic drug response: a critical review and recommendations for future research. *Pharmacogenomics J.* 2007; 36:154-79.

van der Leur M.R., Burger D.M., la Porte C.J.L., Koopmans P.P. A retrospective TDM database analysis of interpatient variability in the pharmacokinetics of lopinavir in HIV-infected adults. *Ther. Drug Monit.* 2006; 28:650-653.

Liu, T.C., Lin, S.F., Chen T.P., Chang, J.G. Polymorphism analysis of *CYP3A5* in myeloid leukemia. *Oncol. Rep.* 2002; 9:327-329.

Lowe S.H., Sanjay U.C. Sankatsing S.U.C., Repping S., van der Veen F., et al. Is the male genital tract really a sanctuary site for HIV? Arguments that it is not. *AIDS* 2004; 18:1353–1362.

Marzolini C, Tirona RG, Kim RB. Pharmacogenomics of the OATP and OAT families. *Pharmacogenomics.* 2004; 5:273-82.

Mc Dermott J.L. et al. Level of human immunodeficiency virus DNA in peripheral blood mononuclear cells correlates with efficacy of antiretroviral therapy. *Journal of Clinical Microbiology* 1999; 37:2361-2365.

Meaden E.R., Hoggard P.G., Khoo S. H., Back D.J. Determination of P-glycoprotein and MRP1 expression and function in peripheral blood mononuclear cells in vivo. *J. Immunol. Methods.* 2002; 262:159-165.

Meng Q., et al. Zidovudine-didanosine coexposure potentiates DNA incorporation of zidovudine and mutagenesis in human cells. *Genetics.* 2000; 97:12667-12671.

Moore K.H.P., et al. Population pharmacokinetics of lamivudine in adults human immunodeficiency virus-infected patients enrolled in two phase III clinical trials. *Antimicrobial. Agents Chemoter.* 1999; 43:3025-3029.

Neuzil K.M., Pharmacologic therapy for human immunodeficiency virus infection: a review. *The American of the Medical Sciences* 1994; 307:368-373.

Oliveira E, Marsh S, van Booven DJ, Amorim A, MJ Prata & HL McLeod. Pharmacogenetically relevant polymorphisms in Portugal. *Pharmacogenomics* 2007, no prelo.

Oselin K., Gerloff T., Mrozikiewicz P.M., Pähkla R., Roots I. MDR1 polymorphisms G2677T in exon 21 and C3435T in exon 26 fail to affect rhodamine 123 efflux in peripheral blood lymphocytes. *Fund. Clin. Pharmacol.* 2003; 17:463-469.

Owen A., Pirmohamed M., Khoo S.H., Back D.J. Pharmacogenetics of HIV therapy. *Pharmacogenetics and Genomics* 2006, 16:693–703.

Parasrampur D.A., Lantz M.V., Benet L.Z. A human lymphocyte based ex vivo assay to study the effect of drugs on P-glycoprotein (Pgp) function. *Pharm. Res.* 2001; 18:39-44.

Parra FC, Amado RC, Lambertucci JR, Rocha J, Antunes CM & Pena SDJ. Color and genomic ancestry in Brazilians. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100:177-182.

Pereira AS, Kashuba AD, Fiscus SA, et al. Nucleoside analogues achieve high concentrations in seminal plasma: relationship between drug concentration and virus burden. *J. Infect. Dis.* 1999; 180:2039-43.

Perrini L. & Telenti A. HIV treatment failure: testing for HIV resistance in clinical practice, *Science* 1998; 280:1871-1872.

la Porte G.J.L., Li Y. Béïque L., Foster B.C., Chauban B., Cameron D.W. van Heeswijk R.P.G. The effect of ABCB1 polymorphism on the pharmacokinetics of saquinavir alone and in combination with ritonavir. *The Clin. Pharmacol. Ther.* 2007; 82:389-395.

Reijers M, Van Heeswijk R, Jurriaans S, et al. The concentrations of D4T, 3TC, nelfinavir, and saquinavir in plasma cerebrospinal fluid, and semen. In: Program and Abstracts of 7th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, 2000; abstract 316.

RobeyR., Bakke S., Stein W. et al. Efflux of rhodamine from CD56 cells as a surrogate marker for reversal of P-glycoprotein-mediated drug efflux by PSC833. *Blood.* 1999; 93:306-314.

Rodrigues AC, Rebecchi IM, Bertolami MC, Faludi AA, Hirata MH, Hirata RD. High baseline serum total and LDL cholesterol levels are associated with MDR1 haplotypes in Brazilian hypercholesterolemic individuals of European descent. *Braz J Med Biol Res* 2005; 38:1389-1397.

Rodríguez-Nóvoa S., Barreiro P. Jiménez-Nácher I., Soriano V. Overview of the pharmacogenetics of HIV therapy. *The Pharmacogenetics Journal.* 2006; 6:234-245.

Salzano FM & Bortolini MC. The evolution and genetics of Latin American populations. Cambridge University Press, Cambridge, UK 2002.

Sankatsing S.U., Burger D, Droste J, Jurrians S, Lange J, Prins J. Penetration of lopinavir into the genital tract of HIV-1 men. In: Program and Abstracts of 10th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, 2002;abstract 439-W.

_____, Beijnen JH, Schinkel AH, et al. P-glycoprotein in human immunodeficiency virus type 1 infection and therapy. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; 48:1073–1081

Schon A, del Mar Ingaramo M, Freire E. The binding of HIV-1 protease inhibitors to human serum proteins. *Biophys. Chem.* 2003; 105:221-230.

Solas C, Lafeuillade A, Halfon P, et al. Discrepancies between protease inhibitor concentrations and viral load in reservoirs and sanctuary sites in human immunodeficiency. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003; 47:238–243.

Soldin J.S., Rackhmanina N.Y., Spiegel H.M.L., Sever J.L. Therapeutic drug monitoring for patients with HIV infection. *Ther. Drug Monit.* 2004; 26:107-109.

Suarez-Kurtz G, Vargens DD, Struchiner CJ, Bastos-Rodrigues L & Pena SDJ. Self-reported skin color, genomic ancestry and the distribution of GST polymorphisms. *Pharmacogenetics/genomics* 2007, no prelo.

Taylor S, van Heeswijk RP, Hoetelmans RM, Workman J, Drake SM, White DJ, Pillay D. Concentrations of nevirapine, lamivudine and stavudine in semen of HIV-1-infected men. *AIDS* 2000; 14:1979-84.

_____, Pereira AS. Anti-retroviral drug concentrations in semen of HIV-1 infected men. *Sex Transm Infect.* 2001; 77:4–11.

Uematsu T., Yamaoka M., Matsuura T., Doto R., Hotomi H., Yamada A.S., Hasumi-Nakayama Y., Kayamoto D. P-glycoprotein expression in human major and minor salivary glands. *Arch. Oral Biol.* 2001; 46:521-527.

_____, Yamaoka M., Doto R., Tanaka H., Matsuura T., Furusawa K. Expression of ATP-binding cassette transporter in human salivary ducts. *Arch. Oral Biol.* 2003; 48:87-90.

van Praag RM, Weverling GJ, Portegies P, et al. Enhanced penetration of indinavir in cerebrospinal fluid and semen after the addition of low-dose ritonavir. *AIDS.* 2000; 14:1187-94.

Voet D., Voet J.G. Biochemistry. New York: John Wiley & Sons, 1990; 948-986p.

Wadelius M, Sörlin K, Wallerman O, Karlsson J, et al. Warfarin sensitivity related to CYP2C9, CYP3A5, ABCB1 (MDR1) and other factors. Pharmacogenomics J. 2004; 4:40-8.

Winzer R., Langman P., Zilly M., et al. No influence of the P-glycoprotein genotype (MDR1 C3435T) on plasma levels of lopinavir and efavirenz during anti-retroviral treatment. Eur. J. Med. Res. 2003; 8:531-534.

WYNN G.H., ZAPOR M.J., SMITH, B.H., WORTMANN G., et al. Antiretrovirals, Part 1: Overview, History, and Focus on Protease Inhibitors. Psychosomatics. 2004; 45:262-270.

ANEXO A – Projeto submetido ao Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF) - UFRJ e Instituto Nacional do Câncer (INCA)

Universidade Federal do Rio de Janeiro
Hospital Universitário Clementino Fraga Filho

Projeto de Ensaio Clínico

Influência do polimorfismo genético de MDR1 na resposta a terapia lopinavir/ritonavir (Kaletra®) e implicações na transmissão sexual do vírus HIV no Brasil.

Investigador principal: Rita de Cássia Elias Estrela

I. INTRODUÇÃO e OBJETIVO ESPECÍFICO

A transmissão do vírus de imunodeficiência humana (HIV) ocorre principalmente através da via sexual. Foi demonstrado que a terapia antiretroviral reduz a excreção do vírus HIV no sêmen, o que pode representar redução na probabilidade de transmissão sexual do HIV (Barroso e cols. 2000). Entretanto, uma grande parte dos indivíduos continua a eliminar o HIV pelo compartimento genital apesar do tratamento com terapia antiretroviral combinada (HAART). Essa é uma questão de grande importância para saúde pública, porque além desses pacientes permanecerem infectantes o vírus por eles transmitido tem grande possibilidade de ser resistente às drogas. A concentração das drogas antirretrovirais no trato genital é um dos fatores que pode estar relacionado à capacidade do HAART suprimir o HIV no sêmen, um dos potenciais marcadores da transmissibilidade sexual do vírus. Em um estudo piloto realizado pelo nosso grupo, 18 indivíduos HIV soro positivo que usavam lopinavir/ritonavir por mais de quatro semanas tiveram os níveis dessas drogas determinados em plasma sangüíneo e seminal. A razão da concentração das drogas nos compartimentos seminal/sangüíneo revelou uma grande variabilidade interindividual (entre 0,01 e 0,21) (Estrela e cols. 2004a). Um dos fatores moleculares mais citados na literatura para explicar a baixa concentração de algumas drogas no trato genital e no sistema nervoso central, e a grande variabilidade interindividual na resposta terapêutica antiretroviral é a glicoproteína P (Pgp). A Pgp é uma proteína transportadora localizada na membrana celular, codificada pelo gene MDR1 e que está distribuída em diversos tecidos como no sistema nervoso central e testículos. A Pgp age como uma bomba de efluxo de drogas que penetram na célula e os inibidores de protease (IPs) são substrato para esta proteína. Assim, a Pgp pode

reduzir a concentração intracelular de IP favorecendo a seleção de vírus mutantes. Alguns autores (Fellay e cols. 2002 e Kim e cols. 2003) mostraram que alguns polimorfismos no gene MDR1 estão correlacionados com a funcionalidade da proteína e que, portanto, podem influenciar a resposta terapêutica.

O presente estudo, nos propomos a genotipar o MDR1 em indivíduos que usam os IPs ritonavir e lopinavir a fim de identificar polimorfismos descritos previamente como determinantes na funcionalidade e expressão da Pgp e determinar a relação, dos genótipos encontrados com as concentrações de lopinavir e ritonavir na fração livre do plasma sanguíneo, do sêmen e da saliva. Além disso, iremos determinar a funcionalidade da Pgp em células de sangue periférico (CD4+), como modelo de fenotipagem para o fenômeno estudado.

II. HISTÓRICO

Terapia Antiretroviral e Transmissão Sexual do HIV

Existe plausibilidade biológica na hipótese de que a redução da carga viral genital de HIV está associada à redução do risco de transmissão sexual do HIV. Assim, em casais HIV-discordantes, a carga viral do parceiro infectado está relacionada à probabilidade de transmissão sexual do vírus (Quinn e cols. 2000). Como a carga viral seminal do HIV-1 está relacionada à carga viral plasmática, é razoável assumir que reduções na carga viral seminal pela terapia antiretroviral vão reduzir a chance de transmissão sexual do HIV-1. A terapia antiretroviral reduz a carga viral de HIV-1 no sêmen (Barroso e cols. 2000). Como consequência, a terapia antiretroviral para redução da excreção genital do vírus HIV-1 pode ser uma estratégia para diminuir a disseminação sexual do HIV.

Como postulado por Quinn e cols. 2000, uma redução da carga viral no sêmen para menos de 3500 cópias/mL pode estar associada a uma redução de 81,4% na transmissão do HIV.

Níveis de Antiretroviral no Sêmen

As concentrações de antiretroviral no compartimento genital podem estar envolvidas na capacidade de o HAART suprimir o HIV e no desenvolvimento de resistência local às drogas. A penetração sub-ótima das drogas neste compartimento pode permitir replicação continuada do vírus apesar da supressão eficaz do HIV no plasma. Existem poucos estudos sobre a concentração de antirretrovirais no sêmen. A zidovudina foi a primeira droga a ser avaliada (Henry e cols. 1988), e as publicações sugerem que seus níveis eram maiores no sêmen do que no sangue (Henry e cols. 1988, Pereira e cols. 1999, Anderson e cols. 2000). Dados sobre a lamivudina sugerem que esta também alcança altas concentrações no plasma seminal (Pereira 1999, Reijers 2000). Dentre os IPs, o indinavir demonstrou alcançar concentrações terapêuticas no sêmen, e a adição de ritonavir a um esquema que contenha indinavir aumentou concentrações deste IP no compartimento seminal (Taylor e cols. 2000, Van Praag e cols. 2000). Os poucos dados disponíveis sobre ritonavir, saquinavir e nelfinavir sugerem que estes atingem menores concentrações no sêmen do que no sangue (Taylor e cols. 1999, Reijers e cols. 2000). Poucos estudos têm sido publicados a respeito da penetração de lopinavir/ritonavir no trato genital masculino e os resultados obtidos indicam baixas concentrações no compartimento genital, além de grande variabilidade entre os indivíduos (Sankatsing 2002, Solas 2003 e Ghosn 2004). Os argumentos utilizados para explicar estes resultados são de que a ligação a proteínas plasmáticas pode estar dificultando a distribuição desses medicamentos

para o sêmen e que os IPs são substrato da Pgp que está presente na barreira sangue-testículo e, assim, bombeia ativamente os IPs para fora desse compartimento. Um estudo piloto realizado por nosso grupo, também mostrou que lopinavir/ritonavir têm baixa penetração no trato genital, e mais do que isso, uma grande variabilidade interindividual (Estrela e cols. 2004a).

Níveis de Antiretroviral na Saliva

A análise dos IPs na saliva têm sido uma alternativa ao plasma ou soro sangüíneo para o monitoramento terapêutico desses fármacos. A saliva oferece diversas vantagens, desde a facilidade e não invasividade da coleta até a diminuição do risco de transmissão do vírus HIV (Aarnoutse e cols. 2001 e Hugen e cols. 2000). Alguns autores (Hoetelmans e cols. 1998 e Wintergerst e cols. 2000) já demonstraram que é possível utilizar os níveis de PI encontrados na saliva como fonte de predição para outros compartimentos como o fluido cérebro-espinhal (FCE). Isto pode ser explicado pelo fato que somente a fração livre do fármaco presente no sangue, poderá alcançar outros compartimentos como FCE, saliva e sêmen.

É interesse do nosso grupo, desenvolver uma metodologia para determinação de lopinavir/ritonavir na saliva, pois se houver correlação entre os níveis das drogas na saliva e no sêmen, será perfeitamente aceitável nestes estudos a substituição da coleta de sêmen por saliva. Desta forma, evitando maiores constrangimentos aos voluntários envolvidos no estudo e até mesmo ampliando o espectro de adesão do voluntariado (Wintergerst e cols. 2000).

Experiência em Bioanálise e Farmacocinética

As etapas de bioanálise (determinação dos níveis de lopinavir/ritonavir nas diferentes matrizes biológicas) e farmacocinética serão realizadas no laboratório do Prof. Suarez-Kurtz, no Instituto Nacional do Câncer (INCA). Este grupo realizou mais de 25 estudos de farmacocinética clínica envolvendo vários grupos de drogas, como antibióticos (amoxicilina, cefadroxil, ciprofloxacina, amicacina), antifúngicos (itraconazol), anti-inflamatórios não-esteroidais (diclofenaco, meloxicam, piroxicam, tenoxicam), bloqueadores de canal de cálcio (nifedipina, amlodipina), anticonvulsivantes (carbamazepina, fenitoína), neurolépticos (risperidona, haloperidol), prednisona, e finasteride, entre outros. No ano 2000, o laboratório do Prof. Suarez-Kurtz foi selecionado pelo Ministério da Saúde para conduzir estudos de bioequivalência de quatorze drogas antirretrovirais genéricas, incluindo lamivudina, zidovudina, didanosina e estavudina, fabricadas por diferentes laboratórios públicos (Estrela e cols. 2003, Raices e cols. 2003, Estrela e cols. 2004b). Além disso, o mesmo grupo já realizou um estudo avaliando as concentrações de lopinavir e ritonavir no plasma sangüíneo e seminal (Estrela e cols. 2004a). O grupo do Prof. Suarez-Kurtz tem expertise em modelagem farmacocinética e farmacocinética - farmacodinâmica, em estratégias de amostragem limitada, e em abordagens farmacocinéticas populacionais (Suarez-Kurtz e cols. 1999a, b; Suarez-Kurtz e cols. 2001; Suarez-Kurtz e cols. 2001).

Genotipagem de MDR1

O gene humano de resistência a múltiplas drogas (MDR1 ou ABCB1) codifica uma proteína de membrana integral, Pgp, que depende de energia para seu funcionamento, exportando substâncias do interior das células ou das

membranas para o meio extracelular. Este gene foi identificado primeiramente por sua superexpressão em células tumorais humanas, onde foi encontrado associado com a resistência a agentes quimioterápicos. Entretanto, esse transportador de membrana também é encontrado em tecidos normais, e sua função está relacionada à proteção celular contra substâncias tóxicas ou metabólitos. Várias drogas são substrato da Pgp, inclusive os IPs utilizados no HAART. Por essa razão, o grau de expressão e a funcionalidade do produto do gene MDR1 podem afetar diretamente a atividade terapêutica de alguns agentes (Hoffmeyer 2000). Um grande número de estudos tem mostrado que mutações nos domínios transmembrana ou de ligação de nucleotídeos da Pgp, podem influenciar a capacidade de ligação e transporte dessa proteína (Fellay 2002 e Hitzl 2001). Fellay (2002), mostrou associação entre a resposta ao tratamento antiretroviral e variantes alélicas de MDR1 em 123 pacientes infectados com HIV que foram tratados com efavirenz ou nelfinavir. Recentemente, vários polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs) de MDR1 foram identificados, alguns resultando em troca de aminoácidos na sequência da proteína (Hoffmeyer e cols. 2000 e Kim e cols. 2001). Surpreendentemente, um SNP silencioso na posição 3435 (exon 26) tem sido correlacionado em vários estudos com expressão e função alteradas da Pgp (Hoffmeyer 2000 e Hitzl 2001). Como descrito anteriormente, o SNP C3435T (presente no exon 26) está ligado em alguns indivíduos ao SNP C1236T (presente no exon 12), uma variante sinônima, e ao SNP G2677T (presente no exon 21), que causa troca de aminoácido na posição 893 de Ala para Ser (Kim 2001). Outros grupos têm demonstrado um forte desequilíbrio de ligação entre polimorfismos de MDR1 (Furuno 2002, Horinouchi 2002, John 2002 e Kroetz 2003). Como estes três SNPs foram

diversas vezes encontrados de maneira ligada, alguns autores sugerem a formação de haplótipos e a nomenclatura para cada haplótipo (tabela abaixo).

Exon	12	21	26	Nomenclatura baseada na referência		
SNP	1236	2677	3435	Kim 2001	Kroetz 2003	Johne 2002
	C	G	C	*1	*1	11
	T	T	T	*2	*13	22
	C	T	T	*3	*17A	22
	T	G	T	*4	*12	12
	C	G	T	*6	*2	12
	C	T	C	*7	*26/*21D	21
	T	G	C	*8	*11	11

Em nosso trabalho, após genotipar os exons 12, 21 e 26 de MDR1, será determinado o haplótipo de cada indivíduo utilizando a nomenclatura sugerida por Kim (2001). Estas etapas também serão realizadas no laboratório de Farmacologia no INCa. Este grupo desenvolve alguns estudos na área de farmacogenética (Reis, 2003 e Vianna-Jorge 2004) e o próprio Prof. Suarez-Kurtz liderou a criação da Rede Nacional de Farmacogenética (REFARGEN) em 2003. O presente estudo está integrado nesta rede.

Avaliação da Funcionalidade e Expressão da Pgp

Estudos in vitro têm mostrado que os IPs são substratos para Pgp. O transporte desses compostos por essa proteína de efluxo na parede intestinal tem implicação na baixa biodisponibilidade oral. Entretanto, quando consideramos o sucesso da terapia antiretroviral deve-se levar em conta não somente a expressão da Pgp na barreira intestinal, mas também nos linfócitos, um dos maiores sítios de replicação do HIV (Fauci 1998). A redução intracelular dos níveis das drogas vai depender de um número de fatores e a expressão da Pgp

pode potencialmente ter um impacto na replicação viral, levando ao desenvolvimento de santuários e acelerando a resistência viral (Jones 2001).

É possível avaliar os níveis de expressão da Pgp, e sua funcionalidade em células mononucleares obtidas a partir de sangue periférico (Chandler 2003). Neste estudo células CD4+ serão avaliadas utilizando a técnica de citometria de fluxo. Serão avaliados a funcionalidade da Pgp (utilizando o método de efluxo de rodamina) e também os níveis de expressão desta proteína na célula (utilizando anticorpo anti Pgp, específico para a técnica de citometria de fluxo).

III. OBJETIVOS

Objetivo Principal

Investigar a participação da Pgp na manutenção dos níveis de IPs, lopinavir e ritonavir, em sêmen e saliva.

Objetivos Secundários

1. Genotipar o MDR1 em indivíduos que usam os IPs ritonavir e lopinavir, a fim de identificar polimorfismos descritos previamente como determinantes na funcionalidade e expressão da Pgp;
2. Determinar as concentrações de lopinavir e ritonavir na fração livre de plasma sangüíneo, no plasma seminal e saliva;
3. Determinar a funcionalidade e expressão da Pgp em células T CD4+;
4. Definir os haplótipos individuais seguindo a nomenclatura sugerida por Kim 2001;

5. Distribuir os indivíduos em três grupos principais por haplótipos: MDR1*1 (selvagens), MDR1*2 (mutantes), todos os outros haplótipos (intermediários);
6. Avaliar a existência de correlação entre os haplótipos de MDR1 e as concentrações de lopinavir e ritonavir no sêmen e também com a funcionalidade e expressão da Pgp em células CD4+;
7. Avaliar a existência de correlação entre os níveis de lopinavir e ritonavir no sêmen e os níveis desses fármacos encontrados na fração livre do plasma sangüíneo e na saliva no mesmo momento;

IV. DESENHO DO ESTUDO

Desenho

Este será um estudo transversal entre pacientes HIV positivo que estejam utilizando um esquema HAART contendo Kaletra® por mais de quatro semanas no Rio de Janeiro. Os participantes serão recrutados de uma coorte de indivíduos soropositivos do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho-UFRJ. Os indivíduos serão convidados a participar no momento em que comparecerem ao ambulatório deste hospital para suas consultas de rotina. Em seguida ao consentimento informado, indivíduos incluídos terão uma entrevista inicial e um exame físico será realizado. Amostras de sangue, sêmen e saliva serão coletadas de 5 a 6 horas após horário regular de tomada do Kaletra® pelo paciente após quatro ou mais semanas de tratamento. A adesão ao tratamento será estimada pela informação prestada pelos pacientes a um questionário pré-testado. Nenhuma mudança nas doses padrão do Kaletra®, que seguem as recomendações para uso de antirretrovirais do Ministério da Saúde do Brasil, será

feita durante este estudo. Pacientes em uso de efavirenz ou nevirapina serão excluídos desta pesquisa.

População do Estudo

Critério de Inclusão:

1. Infecção pelo HIV
2. Sexo masculino
3. Uso de esquema anti-retroviral contendo Kaletra® por mais de 4 semanas
4. Idade entre 18 e 60 anos

Critério de Exclusão:

1. Incapacidade ou recusa em fornecer o consentimento informado.
2. Não estar disposto a cumprir os procedimentos do estudo.
3. Evidência clínica ou laboratorial de Doença Sexualmente Transmissível.
4. Uso concomitante de efavirenz ou nevirapina.

Recrutamento dos Participantes

Pacientes HIV soropositivos em uso de esquemas antiretrovirais que contenham Kaletra® por mais de quatro semanas serão informados do estudo pelos seus respectivos médicos assistentes durante a consulta ambulatorial de rotina, e encaminhados ao pessoal do estudo para uma avaliação preliminar. Indivíduos elegíveis receberão da equipe do estudo detalhada explicação sobre todos os procedimentos envolvidos e sobre os objetivos do estudo. Aos que

desejarem participar do estudo será solicitado que assinem um termo de consentimento livre e esclarecido e será agendada a visita do estudo.

Tamanho da Amostra

O tamanho da amostra foi baseado em dados de um estudo prévio realizado por este grupo, em que foi avaliada a relação entre as concentrações de lopinavir presentes no sêmen e no plasma. O tamanho da amostra deve ser capaz de detectar uma diferença de 0,02 na razão das concentrações de lopinavir no sêmen/plasma (média=0,04 e desvio padrão=0,05). O tamanho estimado da amostra para a detecção desta diferença foi baseado na seguinte fórmula:

$$N = \frac{(Z_{\alpha/2} + Z_{\beta})^2 \cdot 2 \cdot \delta^2}{D^2}$$

Onde:

- N é o número de pacientes a ser recrutado
- $Z_{\alpha/2}$ é o valor de Z na distribuição normal correspondente ao nível até que a hipótese nula possa ser rejeitada (erro tipo I). $Z_{\alpha/2} = 1,96$
- Z_{β} é o valor de Z na distribuição normal correspondente ao poder de 1-b. $Z_{\beta} = 0,84$
- D é a diferença entre as razões encontradas na razão das concentrações de sêmen/plasma, no caso, 0,02.
- δ é o desvio padrão estimado da razão das concentrações de sêmen/plasma.

Utilizando o erro tipo I de 5% e o poder de 80%, o número necessário de pacientes para este estudo é de 98. Entretanto, um número maior de pacientes deverá ser recrutado com objetivo de superar desistências. Portanto,

considerando uma margem de 10% de desistência serão recrutados 108 pacientes.

V. METODOLOGIA

Cada participante virá ao local do estudo duas vezes durante o protocolo. Na primeira visita será feita uma explicação do estudo e solicitado assinatura do TCLE. Na segunda visita serão feitas as coletas de amostras biológicas. Nós estimamos que esta visita irá levar cerca de 90 minutos. Os procedimentos do estudo estão detalhados na tabela abaixo.

Procedimentos do estudo

Procedimento	Screening	Visita
Consentimento Informado / Entrevista inicial	x	
Entrevista (outros medicamentos / dados demográficos / adesão ao tratamento)		x
Hemograma completo		x
Contagem de linfócitos CD4		x
Dosagem dos níveis de lopinavir e de ritonavir em sêmen, plasma e saliva		x
Genotipagem das amostras para MDR1		x
Avaliação da funcionalidade e expressão da Pgp		x

Entrevista

Durante a visita será realizada entrevista com o voluntário. Os dados a serem obtidos na visita incluem adesão à terapia antiretroviral atual, mudanças no esquema inicial, toxicidade das drogas, uso de outros medicamentos que possam

interferir na farmacocinética do lopinavir/ritonavir. Além disso, serão feitas perguntas a respeito de dados demográficos e étnicos.

Visita para coleta de Amostras

a. Sangue: 30mL de sangue será coletado na visita. A coleta de sangue será feita dentro de trinta minutos após a coleta de sêmen.

COLETA DE SANGUE		
Volume de Coleta	Tipo de anticoagulante	Análise
10mL	Liquemine	fenotipagem
4mL	EDTA	hemograma
3mL	EDTA	contagem de linfócitos
10mL	EDTA	dosagem dos níveis de lopinavir e ritonavir
3mL	EDTA	extração de DNA - genotipagem

b. Sêmen: Como em nossos estudos prévios (Barroso 2000, Barroso 2000), o sêmen será coletado em uma sala especial de nossa unidade. Para a coleta seguiremos as orientações abaixo, do AVEG Mucosal Immunology Laboratory da Universidade do Alabama em Birmingham, já utilizada com sucesso em nossos estudos anteriores:

1. Será pedido aos pacientes que não tenham relações sexuais nas 48 horas anteriores a coleta.
2. Os pacientes serão orientados a lavar as mãos e a genitália com sabão e água morna antes da masturbação e não misturar sêmen com saliva. Nenhum preservativo ou lubrificante será utilizado.

3. O ejaculado será coletado por masturbação em um frasco com tampa de rosca identificado com uma etiqueta com código de barra.
 4. A amostra será levada ao laboratório imediatamente após a coleta.
 5. O espécime será refrigerado a 4°C por uma hora até se liquefazer.
 6. Para obtenção do plasma seminal, o espécime será diluído em um volume igual de salina com tampão fosfato (PBS) e centrifugado a 1200 g por 12 minutos. O sobrenadante será decantado do pellet usando uma seringa estéril, em cinco criotubos de 0,4mL, que serão congelados a -70°C.
- c. Saliva:** a amostra de saliva deverá ser coletada simultaneamente a amostra de sangue. Aproximadamente 1,5mL de saliva será coletada em um tubo com tampa de rosca e os paciente serão orientados a cuspirem dentro deste tubo. A primeira cuspidada deverá ser feita fora do tubo de coleta, ou seja, descartada. Não será utilizado nenhum método para estimular salivação. As amostras serão imediatamente centrifugadas a 1000 g por 20 minutos a 4°C e o sobrenadante estocado a -70°C.

Métodos Laboratoriais

Hemograma e contagem de linfócitos CD4+ serão realizados no laboratório local com kits comerciais e de acordo com as instruções dos fabricantes.

Determinação dos Níveis de Lopinavir e Ritonavir em Matrizes Biológicas

As concentrações de agentes antiretrovirais no sêmen, na saliva e no sangue (plasma) serão medidas por cromatografia líquida de alta performance acoplada a espectrometria de massa, usando métodos validados segundo normas da ANVISA. Os métodos para determinação de lopinavir e ritonavir no sêmen e no

plasma sangüíneo já estão prontos e foram utilizados com sucesso em estudo prévio realizado por este grupo (Estrela e cols. 2004a). Possuímos as condições técnicas necessárias para realizar estes procedimentos analíticos e temos ampla experiência com diferentes drogas antiretrovirais.

Amostras concomitantes de sangue, sêmen e saliva serão coletadas para cada paciente durante a visita, para quantificação das concentrações de lopinavir no plasma sangüíneo e no fluido seminal e no fluido salivar. Estes dados serão usados para estabelecer a correlação entre as concentrações das drogas nas três matrizes biológicas. Os dados de concentração no sêmen também serão usados na correlação com os dados de genotipagem MDR1.

Genotipagem de MDR1

O DNA genômico será extraído de 3,0mL de sangue periférico, contendo anticoagulante, usando o método de extração DNAsol® (Kit de purificação, Invitrogen Carlsbad, CA). A primeira etapa do método de genotipagem é a amplificação dos fragmentos de DNA que contém os SNPs que serão analisados através da técnica de PCR Multiplex SnapShot (miniseqüenciamento). A técnica de PCR Multiplex SnapShot (Makridakis e cols. 2001) será usada para amplificar os fragmentos dos seguintes SNPs exônicos: exon 12 (1236C>T), exon 21 (2677G>T/A) e exon 26 (3435C>T). Estes SNPs foram selecionados por se tratarem dos polimorfismos mais freqüentes e por formarem haplótipos descritos em trabalhos prévios.

Avaliação da Funcionalidade e Expressão da Pgp

Para análise da funcionalidade da Pgp, amostras de sangue periférico serão centrifugadas em gradiente de densidade (Ficoll) e as células mononucleares serão separadas. A atividade da Pgp será determinada através do efluxo de rodamina, um corante fluorescente que é substrato para Pgp (Chaudhary 1992). As células mononucleares do sangue periférico serão incubadas em meio contendo rodamina 123 e imunofenotipadas para o fenótipo T helper (CD4⁺). Os anticorpos Anti-Pgp PE e Anti-CD4 PercP serão utilizados na determinação da expressão da Pgp. A quantidade de rodamina intracelular nesta subpopulação linfocitária será analisada por citometria de fluxo e expressa em intensidade média de fluorescência, após um período de efluxo e comparadas com células do mesmo indivíduo tratadas com um inibidor para Pgp, Verapamil.

VI. ASPECTOS HUMANOS

O estudo será iniciado apenas após ser obtida aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina/HUCFF da Universidade Federal do Rio de Janeiro. Serão respeitados todos os requisitos apontados pela lei 196/96 da CNS para a realização de pesquisas com seres humanos.

Consentimento Livre e Escalarecido

Os participantes do estudo serão recrutados na coorte de indivíduos com infecção pelo HIV em acompanhamento na UFRJ. Os médicos assistentes irão informar aos participantes da coorte sobre o estudo. Indivíduos elegíveis serão encaminhados à equipe do estudo e receberão explicações sobre os objetivos do

estudo e os procedimentos envolvidos. Em nossos estudos anteriores com HIV no sêmen, mais de 90 pacientes foram acompanhados por mais de um ano com excelente adesão ao protocolo do estudo.

Todos os participantes receberão um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, esclarecendo todos os procedimentos que serão realizados durante este estudo.

Riscos

Os participantes poderão sentir desconforto quando o sangue for coletado. Os voluntários poderão ficar constrangidos pela coleta de sêmen e saliva. Nós faremos tudo para manter a privacidade nestes procedimentos.

Benefícios

Não há benefícios esperados para os sujeitos da pesquisa. Espera-se que os resultados da pesquisa contribuam para o aperfeiçoamento das práticas de tratamento aos sujeitos infectados pelo HIV.

Confidencialidade

Todos os dados e informações coletadas serão guardados de forma segura nos locais do estudo (laboratório de pesquisa do Serviço de DIP, HUCFF e divisão de farmacologia, INCA). Todas as informações sobre os participantes serão armazenadas em arquivos trancados e em áreas de circulação restrita. Todas as amostras laboratoriais, relatórios, dados coletados e formulários administrativos serão identificados por um número codificado para manter a privacidade dos participantes. Todos os formulários que contenham nomes ou

identificação pessoal, como questionários para localização e termos de consentimento, serão guardados em locais diferentes dos formulários do estudo identificados por códigos. Formulários, listas, livros de registro, agendas de marcação de visitas ou qualquer outro registro que vincule os códigos dos participantes com outras formas de identificação dos mesmos serão armazenados em arquivos distintos, trancados e em áreas de circulação restrita.

Compromisso com a divulgação dos resultados

Os resultados deste estudo serão divulgados em congressos nacionais e/ou internacionais e serão submetidos para publicação em periódicos indexados. De nenhuma forma será permitida a divulgação de informações pessoais que identifiquem os participantes desta pesquisa nestas publicações.

Os dados obtidos somente serão utilizados nesta pesquisa.

VII. AVALIAÇÃO CRÍTICA E RISCOS EM RELAÇÃO AOS OBJETIVOS DO PROJETO

Este estudo poderá ter importantes conseqüências para a compreensão do efeito dos medicamentos do tipo IPs sobre a glicoproteína P e desta forma, explicar as diferenças dos níveis desses fármacos no compartimento genital entre os indivíduos. O Brasil está em posição privilegiada para desenvolvimento deste projeto, visto a disponibilidade de terapia anti-retroviral. Nós teremos acesso ao número proposto de homens infectados pelo HIV.

Não esperamos ter nenhum tipo de limitação, já que anteriormente foi realizado um estudo com grande sucesso, coletando amostras do mesmo tipo.

VIII. EQUIPE DA PESQUISA

RITA DE CÁSSIA ELIAS ESTRELA	DOUTORANDA DO INSTITUTO DE BIOQUÍMICA MÉDICA – ICB – UFRJ E ASSISTENTE DE PESQUISA DA DIVISÃO DE FARMACOLOGIA-CPQ-INCA
GUILHERME SUAREZ KURTZ	CHEFE DA DIVISÃO DE FARMACOLOGIA-CPQ-INCA. PROFESSOR TITULAR DO DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA – ICB -UFRJ
PAULO FEIJÓ BARROSO	PROFESSOR ADJUNTO DE DOENÇAS INFECCIOSAS E PARASITÁRIAS, FACULDADE DE MEDICINA, DEPARTAMENTO DE MEDICINA PREVENTIVA – UFRJ

IX. CRONOGRAMA DA PESQUISA

Procedimento	03/05	04/05	05/05	06/05	07/05	08/05	09/05	10/05
Encaminhamento ao CEP	x							
AVALIAÇÃO FINAL do CEP	x							
Recrutamento		x	x	x	x			
Coleta de amostras					x	x		
Procedimentos laboratoriais					x	x	x	
Análise estatística								x
Preparação do manuscrito								x

X. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aarnoutse RE, Verweij-van wissen, Underberg WJM, et al. HPLC of HIV protease inhibitor in human biological matrices. *Journal of Chromatography B* 2001 764:363-84.
2. Anderson PL, Noormohamed SE, Henry K, et al. Semen and serum pharmacokinetics of zidovudine and zidovudine-glucuronide in men with HIV-1 infection. *Pharmacotherapy*. 2000;8:917-22.
3. Barroso PF, Gupta P, Schechter M, Melo MF, Souza Y, FC Murta, Vieira M, Harrison LH. "Adherence to antiretroviral therapy (ART) is associated with seminal viral load (SVL) suppression." Abstracts of the 39th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, San Francisco, California, September 26-29, 1999, Abstract 597.
4. Barroso PF, Schechter M, Gupta P, et al. Effect of antiretroviral therapy on HIV shedding in semen. *Ann Intern Med*. 2000;133:280-284.
5. Chandler B, Almond L, Ford J, et al. The effects of protease inhibitors and NRTIs on Pgp expression in peripheral blood mononuclear cells in vitro. *JAIDS*. 2003;33:551-56.
6. Chaudhary PM, Roninson IB. Expression and activity of the multidrug resistance P-glycoprotein in human peripheral blood lymphocytes. *Blood* 1992; 80:2735-2739.
7. Estrela RCE, Costa TV, Barroso PF, Suarez-Kurtz G. Determination of lopinavir and ritonavir in blood plasma and seminal plasma of men infected with HIV-1 by LC/MS/MS: implications for sexual transmission of HIV-1. Abstracts of the XXXVI Congresso Brasileiro de Farmacologia e

Terapêutica Experimental, Águas de Lindóia, São Paulo, Outubro 17-20, 2004, Abstract 09.002. (A)

8. Estrela RCE, Salvadori MC, Raices RS, Suarez-Kurtz G. Determination of didanosine in human serum by on-line solid-phase extraction coupled to high-performance liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometric detection: application to a bioequivalence study. *J Mass Spectrom.* 2003; 38(4):378-85.

9. Estrela RCE, Salvadori MC, Suarez-Kurtz G. A rapid and sensitive method for simultaneous determination of lamivudine and zidovudine in human serum by on-line solid-phase extraction coupled to liquid chromatography/tandem mass spectrometry detection. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2004;18(10):1147-55. (B)

10. Fauci A, Bartlett JG, Goosby E. Early treatment of HIV-1 infection. *The Lancet*, 1998; 352:1935-36

11. Fellay J, Marzolini C, Meaden ER, et al. Response to antiretroviral treatment in HIV-1-infected individuals with allelic variants of the multidrug resistance transporter 1: a pharmacogenetics study. *The Lancet.* 2002; 359:30-36.

12. Furuno T, Landi MT, Ceroni M, et al. Pharmacogenetics. 2002; 12:529-34.

13. Ghosn J, Chaix ML, Peytavin G, et al. Penetration of enfurvirtide, tenofovir, efavirenz, and protease inhibitors in the genital tract of HIV-1-infected men. *AIDS* 2004 18:1958-61.

14. Hitzl M, Schaeffeler E, Hoher B, et al. Variable expression of P-glycoprotein in the human placenta and its association with mutations of the

multidrug resistance 1 gene (MDR1, ABCB1). *Pharmacogenetics*. 2004; 14:309-318.

15. Hoetelmans RMW, van Essenberg M, Profijt M, et al. *Journal Chromatography B*. 1998 705:119-26.

16. Hoffmeyer S, Burk O, Richter OV, et al. Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *PNAS*, 2000; 97:3473-3478.

17. Horinouchi M, Sakaeda T, Nakamura T, et al. *Pharm. Res.* 2002; 19:1581-585.

18. Huguen PWH, Burger DM, de Graaff M, et al. Saliva as a specimen for monitoring compliance but not for predicting plasma concentrations in patients with HIV treated with indinavir. *Ther. Drug Monit.* 2000 22:437-45.

19. John A, Kopke K, Gerloff T, et al. *Clin. Pharmacol. Ther.* 2002; 72:584-94.

20. Jones K, Bray PG, Khoo SH, et al. Pgp and transporter MRP1 reduce HIV protease inhibitor uptake in CD4 cells: potential for accelerated viral drug resistance? *AIDS*. 2001; 15:1353-358.

21. Kim J, Gotzkowsky K, Eron J, et al. Penetration of efavirenz into the male genital tract as measured by seminal plasma to blood plasma concentration and AUC_{24h} ratios. In: Program and abstracts of 40th International Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2000;abstract 1171.

22. Kim RB. Drug transporters in HIV therapy. *International AIDS Society-USA*, 2003; 11:136-139.

23. Kim RB, Leake BF, Choo EF, et al. Identification of functionally variant MDR1 alleles among European Americans and African Americans. *Clin. Pharmacol. Ther.* 2001; 70:189-199.
24. Kroetz DL, Pauli-Magnus C, Hodges LM, et al. *Pharmacogenetics.* 2003; 13:481-94.
25. Makridakis NM, Reichardt JK. Multiplex automated primer extension analysis: simultaneous genotyping of several polymorphisms. *Biotechniques* 2001; 31:1374-1380.
26. Ministério da Saúde-Brasil. AIDS-Boletim Epidemiológico. *Boletim Epidemiológico.*1998;11:5-9.
27. Pereira A, Eron J, Dunn J, et al. Analysis of amprenavir, 3TC/AZT in blood and seminal plasma: penetration of amprenavir into the male genital tract. In: Program and Abstracts of 7th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, 2000;abstract 317.
28. Pereira A, Tidwell R, Eron JJ, Troiani L, Kashuba A, Dunn J, Fiscus SA, Schock J, Sheppard R, Hall J, Cohen MS, 1999. AZT & 3tc affect excretion of HIV in semen: measurement of antiviral drug concentration in blood and seminal plasma. 6th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, abstract 221.
29. Pereira AS, Kashuba AD, Fiscus SA, et al. Nucleoside analogues achieve high concentrations in seminal plasma: relationship between drug concentration and virus burden. *J. Infect. Dis.* 1999; 180:2039-43.
30. Pereira AS, Kenney KB, Cohen MS, Hall JE, Eron JJ, Tidwell RR, Dunn JA. Simultaneous determination of lamivudine and zidovudine concentrations in human seminal plasma using high-performance liquid

chromatography and tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 2000; 742:173-83.

31. Quinn TC, Wawer MJ, Sewankambo N, et al. Viral load and heterosexual transmission of human immunodeficiency virus type 1. Rakai Project Study Study Group. *N Engl J Med*. 2000;342:921-9.

32. Raices RS, Salvadori MC, Estrela RCE, de Aquino Neto FR, Suarez-Kurtz G. Determination of stavudine in human serum by on-line solid-phase extraction coupled to high-performance liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry: application to a bioequivalence study. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2003;17(14):1611-8.

33. Reijers M, Van Heeswijk R, Jurriaans S, et al. The concentrations of D4T, 3TC, nelfinavir, and saquinavir in plasma cerebrospinal fluid, and semen. In: Program and Abstracts of 7th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, 2000;abstract 316.

34. Reis M, Santoro A, Suarez-Kurtz G. Thiopurine methyltransferase phenotypes and genotypes in Brazilians. *Pharmacogenetics*. 2003;13(6):371-3.

35. Sankatsing S, Burger D, Droste J, Jurrians S, Lange J, Prins J. Penetration of lopinavir into the genital tract of HIV-1 men. In: Program and Abstracts of 10th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, 2002;abstract 439-W.

36. Solas C, Lafeuillade A, Halfon P, et al. Discrepancies between protease inhibitor concentrations and viral load in reservoirs and sanctuary

sites in human immunodeficiency virus-infected patients. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2003 47:238-43.

37. Sperling RS, Shapiro DE, Coombs RW, Todd JA, Herman SA, McSherry GD, O'Sullivan MJ, Van Dyke RB, Jimenez E, Rouzioux C, Flynn PM, Sullivan JL, Spector SA, Diaz C, Rooney J, Balsley J, Gelber RD, Connor EM. Maternal viral load, zidovudine treatment, and the risk of transmission of human immunodeficiency virus type 1 from mother to infant. *N Engl J Med* 1996; 335:1621-1629.

38. Suarez-Kurtz G, C. G. Ponte, F. L. Vicente, F. A. Bozza C. J. Struchiner Limited sampling strategies for studying the pharmacokinetics of amlodipine. *European J. Clin. Pharmacol.* 1999 55:651-657.

39. Suarez-Kurtz G, F. M. Ribeiro, F. L. Vicente, C. J. Struchiner. Development and validation of limited-sampling strategies for predicting amoxicillin pharmacokinetic and pharmacodynamic parameters. *Antimicrob Agents Chemother* 2001, in press.

40. Suarez-Kurtz G, F.A. Bozza, F. L. Vicente, C. G. Ponte & C. J. Struchiner. Limited sampling strategies for itraconazole and hydroxy-itraconazole based on data from a bioequivalence study. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1999 43:134-140.

41. Suarez-Kurtz G. Limited-sampling approach (to indinavir pharmacokinetics). *Clin Pharmacol Ther*, 2001 69: 463.

42. Taylor S, Back D, Drake S, et al. Antiretroviral drug concentrations in semen of HIV-1 infected men: differential penetration of indinavir, ritonavir and saquinavir. In: Program and Abstracts of 7th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, 2000;abstract 318.

43. Taylor S, Back DJ, Workman J, et al. Poor penetration of the male genital tract by HIV-1 protease inhibitors. *AIDS* 1999;13:859-60.
44. Taylor S, van Heeswijk RP, Hoetelmans RM, Workman J, Drake SM, White DJ, Pillay D, 2000. Concentrations of nevirapine, lamivudine and stavudine in semen of HIV-1-infected men. *AIDS* 14:1979-84.
45. Taylor S, Pereira AS. Antiretroviral drug concentrations in semen of HIV-1 infected men. 2001. *Sex. Transmitted Infections*, 77(1) 4:11.
46. Van Praag R, Wavering G, Portegies P, et al. Enhanced penetration of indinavir in cerebrospinal fluid after addition of low dose ritonavir. *AIDS* 2000;14:1187-94.
47. Vianna-Jorge R, Perini JA, Rondinelli E, Suarez-Kurtz G. CYP2C9 genotypes and the pharmacokinetics of tenoxicam in Brazilians. *Clin Pharmacol Ther.* 2004 Jul;76(1):18-26.
48. Wintergerst U, Kurowski M, Rolinski B, et al. Use saliva specimens for monitoring indinavir therapy in human immunodeficiency virus-infected patients. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2000 44:2572-74.
49. World Health Organization, 1987. Laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. New York: Cambridge University Press.

ANEXO B – Aprovação do projeto pelo HUCFF



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
Hospital Universitário Clementino Fraga Filho
Faculdade de Medicina
Comitê de Ética em Pesquisa - CEP

Coordenador:

☒ Luiz Carlos Duarte
de Miranda

Médico - Prof. Adjunto

Secretário:

☒ Márcio Teixeira Antonio

Farmacêutico - Especialista

Membros Titulares:

☒ Alice Helena Dutra Viçente

Médico - Prof. Adjunto

☐ Antonio de Magalhães

Marinho

Enfermeiro - Mestre

☒ Beatriz Moritz Trope

Médico - Doutoranda

☐ Beatriz Rocha Miranda

Venturi

Odontólogo - Prof. Substituto

☐ Eduardo Jorge Bezio

Córtis

Médico - Prof. Assistente

☐ Eliza Regina Ambrosio

Assistente Social - Mestre

☐ Luiz Bonfim Pereira da

Cunha

Médico - Especialista

☐ Maria de Fátima Gustavo

Lopes

Representante dos Usuários

☐ Paulo Feijó Barroso

Médico - Prof. Adjunto

☐ Rodrigo Teixeira Santos

Aluno de Graduação - FM

☐ Zimara Rodrigues da Silva

Professora

Membros Suplentes

☒ Alberto Krayyem Arberç

Médico - Doutorando

☐ Daniel Savignon Macinho

Farmacêutico - Especialista

☒ Helena Warzynsky

Representante dos Usuários

☒ Luzia da Conceição de

Araújo Marques

Enfermeiro - Mestre

☒ Maria Adelaide Moreira

dos Santos

Nutricionista - Mestre

☐ Roberto Coury Pedrosa

Médico - Doutor

☒ Vania Dias de Oliveira

Assistente Social

☐ Wagner Sales Alviano

Odontólogo - Mestre

CEP - MEMO - nº 301/05

Rio de Janeiro, 06 maio de 2005.

Do: Coordenador do CEP

A (o): Sr. (a) Pesquisador (a): Dra. Rita de Cássia Elias Estrela

Assunto: Parecer sobre projeto de pesquisa

Sr. (a) Pesquisador (a),

Informo a V. Sa que o CEP constituído nos Termos da Resolução n.º 196/96 do Conselho Nacional de Saúde e, devidamente registrado na Comissão Nacional de Ética em Pesquisa, recebeu, analisou e emitiu parecer sobre a documentação referente ao Protocolo de Pesquisa e seu respectivo Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, conforme abaixo discriminado:

Protocolo de Pesquisa 033/05- CEP

Título: "Influência do polimorfismo genético de MDR1 na resposta a terapia lopinavir/ritonavir (Kaletra®) e implicações na transmissão sexual do vírus HIV no Brasil"

Pesquisador (a) responsável: Dra. Rita de Cássia Elias Estrela

Data de apreciação do parecer: 31/03/05

Parecer: "APROVADO"

Informo ainda, que V. Sa. deverá apresentar relatório semestral (previsto para 31/09/05), anual e/ou relatório final para este Comitê acompanhar o desenvolvimento do projeto. (item VII. 13.d., da Resolução n.º 196/96 - CNS/MS).

Atenciosamente,

Prof. Luiz Carlos Duarte de Miranda
Coordenador do CEP

ANEXO C – Aprovação do projeto pelo INCA



MINISTÉRIO DA SAÚDE
Instituto Nacional de Câncer
Comitê de Ética em Pesquisa-INCA

Memo. 060/05-CEP-INCA

Rio de Janeiro, 27 de julho de 2005

Dra. Rita de Cássia Elias Estrela
Pesquisadora Principal

Ref.: **Prot. 119/04** – Farmacogenômica do transportador MDR1

Prezada Doutora,

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Nacional de Câncer decidiu **aprovar** o Protocolo intitulado: Farmacogenômica do transportador MDR1, em 25 de julho de 2005.

2. Estamos encaminhando a documentação pertinente para o CONEP, com vistas a registro e arquivamento.

Atenciosamente,

Dra. Adriana Scheliga
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
CEP-INCA

**ANEXO D – Termo de consentimento livre e esclarecido no recrutamento de
indivíduos HIV1⁺**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA SER VOLUNTÁRIO DE UM PROJETO DE PESQUISA

TÍTULO: “Influência do polimorfismo genético de MDR1 na resposta a terapia lopinavir/ritonavir (Kaletra®) e implicações na transmissão sexual do vírus HIV no Brasil.”

INVESTIGADOR PRINCIPAL:

Rita de Cássia Elias Estrela,
Doutoranda do Instituto de Bioquímica Médica-ICB-UFRJ
Assistente de Pesquisa-Divisão de Farmacologia-CPQ-INCA
Rua André Cavalcante, 37/ 3º andar, Rio de Janeiro
Telefone: (021) 3233-1454

OUTROS INVESTIGADORES:

Guilherme Suarez Kurtz
Chefe da Divisão de Farmacologia-CPQ-INCA
Rua André Cavalcante, 37/ 3º andar, Rio de Janeiro
Telefone: (021) 3233-1454

Paulo Feijó Barroso,
Professor Adjunto de Doenças Infeciosas e Parasitárias
Faculdade de Medicina/Hospital Universitário Clementino Fraga Filho
Universidade Federal do Rio de Janeiro
Ilha do Fundão, Rio de Janeiro
Telefone: (021) 2270-3114

Descrição do Projeto

Você está sendo convidado a participar, como voluntário, de um estudo com o *kaletra*, medicamento antiviral que você já usa. O projeto de pesquisa se chama “*Influência do polimorfismo genético de MDR1 na resposta a terapia lopinavir/ritonavir (kaletra®) e implicações na transmissão sexual do vírus HIV no Brasil*” com a participação prevista de 108 voluntários.

Existe uma proteína chamada glicoproteína P, que está presente em diversos órgãos e que impede a permanência de alguns medicamentos, como o *kaletra* nestes órgãos. A glicoproteína P está situada no aparelho genital masculino e pode ser responsável por uma menor quantidade de medicamento presente no sêmen.

O objetivo do presente estudo é avaliar como os tipos genéticos da glicoproteína P influem na quantidade de *kaletra* que chega até o sêmen.

Para realizar este estudo, serão necessários a coleta de sangue, saliva e sêmen. Para você participar deste estudo, você deverá ler cuidadosamente e assinar o TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.

Você está sendo convidado para fazer parte deste estudo porque você usa *kaletra*. Aceitar este convite significa que você e todos os participantes da pesquisa terão que vir ao hospital uma vez para coleta de material. Na visita todos os participantes irão colher uma amostra de sangue para a realização de exames laboratoriais e responderão a um questionário sobre dados pessoais e étnicos. Além disso, nesta mesma visita que você fará ao hospital, nós pediremos que você colete sêmen (esperma) e saliva em momentos separados, também para exames. Para a coleta de sêmen você será conduzido para uma sala especial no hospital onde você ficará sozinho e terá tempo para masturbar-se e colher o sêmen (esperma) num pequeno frasco. Depois disso, você receberá um outro frasco para coletar saliva. A coleta de saliva será feita por você, ou seja, você deverá cuspir dentro deste frasco. Coletar sêmen por masturbação é um procedimento seguro, assim como a coleta de saliva. Faremos tudo o que for possível para manter a sua privacidade durante a sua visita ao hospital.

Nas amostras de sangue coletadas será realizado hemograma, contagem de linfócitos CD4 e CD8, dosagem de concentrações de Kaletra e avaliação da proteína que é responsável por transportar o kaletra que chega ao sêmen de volta para o sangue. Nas amostras de sêmen e saliva serão dosados os níveis de Kaletra. As amostras de seu sangue, sêmen e saliva serão estocadas para possibilitar que exames de confirmação sejam realizados, em caso de necessidade. Nenhum exame laboratorial não descrito será realizado nas amostras estocadas. Os resultados dos exames que podem ajudar o seu médico (hemograma e CD4) serão fornecidos a você.

Caso você decida participar, você deverá fornecer seu nome e seu endereço de contato para que possamos contatá-lo para comunicação de resultados ou se necessário. Estes dados serão mantidos em segredo.

RISCOS E BENEFÍCIOS

Você não obterá nenhum benefício direto por participar do estudo, porém os resultados obtidos poderão ajudar os esforços para diminuir a transmissão do HIV e da AIDS.

Tirar uma pequena quantidade de sangue ou colher outros materiais para exame pode ser desconfortável (causar inchaço e vermelhidão), mas é seguro.

REEMBOLSO

Ao participar deste estudo você receberá vale-transporte no dia da visita e, se você quiser, uma declaração de comparecimento para justificar as horas de trabalho gastas nas visitas.

CONFIDENCIALIDADE

Não é obrigatório responder a qualquer pergunta. Todas as informações do estudo vão ser mantidas em segredo sob a responsabilidade dos pesquisadores e somente eles vão ter acesso a essas informações. Qualquer informação que diga respeito a você será mantida o mais confidencial possível. Você não será identificado pelo nome em nenhuma publicação dos resultados da pesquisa.

ALTERNATIVAS A PARTICIPAÇÃO E DIREITO DE SAIR DO ESTUDO

Sua participação nessa pesquisa é completamente voluntária. Você não tem que participar dessa pesquisa. Caso decida participar e depois mude de idéia, você pode deixar o estudo a qualquer momento.

CONSENTIMENTO INFORMADO

Este documento me foi explicado e todas as minhas dúvidas foram esclarecidas. Eu sei que posso fazer qualquer pergunta sobre qualquer aspecto da pesquisa durante o curso do estudo e que estas perguntas serão respondidas pelos pesquisadores listados na primeira página deste formulário.

Qualquer pergunta que eu tenha a respeito dos meus direitos como participante da pesquisa será respondida pelo pesquisador principal, Rita de Cássia Estrela, telefone (21) 3233 1454 ou por um membro do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, telefone (021) 2562 2480, no Rio de Janeiro.

Assinando este documento eu concordo em participar deste estudo. Uma cópia deste termo de consentimento será entregue a mim.

Nome legível do participante: _____

Endereço residencial:* _____ Telefone:* _____

Endereço trabalho:* _____ Telefone:* _____ do

Nome, endereço e telefone de contato (parente ou amigo):* _____

_____ de _____ de 200____.

Assinatura do participante

Nome do entrevistador: _____

Assinatura do entrevistador

_____ de _____ de 200____.

Nome do investigador: _____
(ou designado)

Assinatura do investigador (ou designado)

* O participante poderá fornecer apenas um dos endereços acima se o quiser. O fornecimento de pelo menos um endereço é essencial para a inclusão na pesquisa.

ANEXO E – Questionários aplicados no estudo

Questionário 1.a- Coleta de Materiais:

1. Data : __/__/__
2. Nome: _____
3. Dia e hora da última dose de Lopinavir / Rito: __/__/__ ____:____h
4. Horário da coleta do sangue: ____:____h
5. Horário da coleta de semen: ____:____h
- Horário da última refeição: ____:____h

Projeto Lopinavir / R em sêmen

Questionário I- Identificação no projeto

1. Data da entrevista: ____/____/____
2. Identificação: _____
3. Médico/local que fez encaminhamento: _____
4. Nome _____
5. Endereço residencial: _____
Bairro: _____
Município: _____
Ponto de referência: _____
6. Telefone residencial : _____
7. Telefone(s) comercial(ais): _____
(O participante precisa fornecer dados referentes a pelo menos um dos dois endereços).

Questionário A - Dados pessoais e demográficos

A1. Idade: _____ A2. Data de nascimento: ____/____/____

A3. Natural: _____

A3.. Qual o seu estado civil?

Solteiro ☐ Casado ☐ Desquitado ☐ Divorciado ☐ Viúvo ☐

Amigado ☐ Outro ☐ Se outro, especifique: _____

A4. Você sabe ler?

Não ☐ Sim ☐

A5. Você frequenta ou frequentou a escola?

Não ☐ Sim ☐

Não sabe ☐ Não quis informar ☐

A6. Você frequentou escola até que série?

Primeiro grau incompleto ☐ Primeiro grau completo ☐

Segundo grau incompleto ☐ Segundo grau completo ☐

Universidade incompleta ☐ Universidade completa ☐

Não sabe ☐ Não quis informar ☐

A7. Atualmente você está empregado?

Não ☐ Sim ☐ Não sabe ☐ Não quis informar ☐

A8. Você é estudante ?

Não ☐ Sim ☐ Não sabe ☐ Não quis informar ☐

A9. Você trabalha por conta própria?

Não ☐ Sim ☐ Não sabe ☐ Não quis informar ☐

A10. Você está em licença-saúde ou aposentado por motivo de saúde?

Não ☐ Sim ☐ Não sabe ☐ Não quis informar ☐

A11. Em média, quanto você ganha por mês? _____

A12. Em média, qual é a renda total de sua família? _____

Questionário B: Risco para adquirir infecção por HIV

Identificação: _____

A seguir farei uma série de perguntas sobre atividades que poderiam estar associadas a transmissão do HIV. Entre estas perguntas estarão algumas sobre comportamento sexual e uso de drogas. Lembramos novamente que você não é obrigado a responder nenhuma das perguntas que faremos:

- B1. Alguma vez na sua vida você recebeu transfusão de sangue ou hemoderivados (plasma, plaquetas, concentrados de fator etc?)
Não ☐ Sim ☐ Não sabe ☐ Não quis informar ☐
- B2. Você já fez uso de drogas injetáveis?
Não ☐ Sim ☐ Não sabe ☐ Não quis informar ☐
- B3. Você já teve alguma relação sexual com outro homem?
Não ☐ Sim ☐ Não sabe ☐ Não quis informar ☐
- B4. Você já teve relação sexual com alguma mulher?
Não ☐ Sim ☐
Não sabe ☐ Não quis informar ☐
- B5. Quando foi a última vez que você se masturbou?
Nunca se masturbou ☐ Há menos de 2 dias ☐
Entre 2 e 3 dias ☐ Entre 3 e 7 dias ☐
Há mais de 7 dias ☐
Não sabe ☐ Não quis informar ☐

Questionário C: Dados clínicos

Identificação: _____

- C1. Quando você teve conhecimento de ser infectado pelo HIV?
____/____ (mês/ano) Não sabe ☐ Não quis informar ☐
- C2. Desde que você soube estar infectado pelo HIV, você já esteve com alguma doença? (apenas doenças relacionadas ao HIV)
Não ☐ Sim ☐ Não sabe ☐ Não quis informar ☐

C3. Liste as doenças que você já teve:

1.		
2.		
3.		
4.		
5.		
6.		
7.		

C4. Quando iniciou o tratamento anti-retroviral?

__/__/__

Não sabe ☐

Não quis informar ☐

Quando interrompeu o primeiro esquema?

__/__/__

Não sabe ☐

Não quis informar ☐

Qual foi o primeiro esquema?

C5. Quando iniciou o segundo esquema anti-retroviral?

__/__/__

Não sabe ☐

Não quis informar ☐

Quando interrompeu o segundo esquema?

__/__/__

Não sabe ☐

Não quis informar ☐

Qual foi o segundo esquema?

C6. Quando iniciou o terceiro esquema anti-retroviral?

__/__/__

Não sabe ☐

Não quis informar ☐

Quando interrompeu o terceiro esquema?

__/__/__

Não sabe ☐

Não quis informar ☐

Qual foi o terceiro esquema?

C7. Quando iniciou o quarto esquema anti-retroviral?

__/__/__

Não sabe ☐

Não quis informar ☐

Quando interrompeu o quarto esquema?

__/__/__

Não sabe ☐

Não quis informar ☐

Qual foi o quarto esquema?

C8 Quando iniciou o último (atual) esquema anti-retroviral?

____/____/____

Não sabe ☐

Não quis informar ☐

Quando interrompeu o último esquema?

____/____/____

Não sabe ☐

Não quis informar

Qual é o último esquema?

C9. Quantas dias por semana você se engana nos horários e não toma os medicamentos específicos para o tratamento da AIDS?

C10. Quantas dias por semana você não toma os medicamentos específicos para o tratamento da AIDS

C11. Agora vamos ver como tomou seu remédios nos últimos 7 dias, começando ela data de hoje:* Me diga o(s) horário (s) e o número de comprimidos ou injeções / vez.

Data	Número prescrito	Número tomado
Ontem		
Antes de ontem		
3		
4		
5		
6		
7		

Estagiamento OMS

Data da visita: ___/___/___

Identificação: _____

Estágio 1:

- | | | | |
|-----|--|----------------------------|----------------------------|
| 1.1 | Assintomático | N ☐ | S ☐ |
| 1.2 | Linfoadenomegalia persistente generalizada | N ☐ | S ☐ |
| 1.3 | Quadro agudo | N ☐ | S ☐ |

Estágio 2:

- | | | | |
|-----|--|----------------------------|----------------------------|
| 2.1 | Perda ponderal <10% (não intencional) | N ☐ | S ☐ |
| 2.2 | Manifestações cutâneas menores
(dermatite seborreica, prurigo, onicomicose, quelite angular, úlcera oral) | N ☐ | S ☐ |
| 2.3 | Herpes zoster | N ☐ | S ☐ |
| 2.4 | Infecção recorrente trato respiratório superior | N ☐ | S ☐ |

Estágio 3:

- | | | | |
|-----|---|----------------------------|----------------------------|
| 3.1 | Perda ponderal >10% (não intencional) | N ☐ | S ☐ |
| 3.2 | Diarréia inexplicável | N ☐ | S ☐ |
| 3.3 | Febre > 1 mês sem causa evidente | N ☐ | S ☐ |
| 3.4 | Candidíase oral | N ☐ | S ☐ |
| 3.5 | Leucoplasia pilosa | N ☐ | S ☐ |
| 3.6 | BK pulmonar típico | N ☐ | S ☐ |
| 3.7 | BK pulmonar atípico | N ☐ | S ☐ |
| 3.8 | Doença bacteriana grave(pneumonia, piomiosite, sepsis) | N ☐ | S ☐ |

Estágio 4:

- | | | | |
|------|--|----------------------------|----------------------------|
| 4.1 | Síndrome consumptiva (perda de peso > 10%, diarréia crônica ou febre prolongada) | N ☐ | S ☐ |
| 4.2 | PCP | N ☐ | S ☐ |
| 4.3 | Toxoplasmose SNC | N ☐ | S ☐ |
| 4.4 | Diarréia por Cryptosporidium > 1 mês | N ☐ | S ☐ |
| 4.5 | Diarréia por Isospora > 1 mês | N ☐ | S ☐ |
| 4.6 | Criptococose extra-pulmonar | N ☐ | S ☐ |
| 4.7 | Citomegalovirose (exceto fígado, baço e gânglio) | N ☐ | S ☐ |
| 4.8 | HSV mucocutâneo > 1 mês ou visceral | N ☐ | S ☐ |
| 4.9 | PML (Leucoencefalopatia M. Progressiva) | N ☐ | S ☐ |
| 4.10 | Qualquer micose disseminada. | N ☐ | S ☐ |

- | | | | |
|------|--|----------------------------|----------------------------|
| 4.11 | Candidíase (esôfago, traquéia, brônquio ou pulmão) | N ☐ | S ☐ |
| 4.12 | Micobacteriose atípica disseminada | N ☐ | S ☐ |
| 4.13 | Sepsis recorrente por Salmonella | N ☐ | S ☐ |
| 4.14 | BK extra-pulmonar, não ganglionar. | N ☐ | S ☐ |
| 4.15 | BK ganglionar | N ☐ | S ☐ |
| 4.16 | Linfoma | N ☐ | S ☐ |
| 4.17 | Sarcoma de Kaposi localizado(<10 lesões e s/ lesão mucosa) | N ☐ | S ☐ |
| 4.18 | Sarcoma de Kaposi disseminado | N ☐ | S ☐ |
| 4.19 | Encefalopatia p/HIV | N ☐ | S ☐ |

Outras condições:

- | | | | |
|-----|------------------------------|----------------------------|----------------------------|
| 5.1 | Manifestações neurológicas | N ☐ | S ☐ |
| 5.2 | Manifestações articulares | N ☐ | S ☐ |
| 5.3 | Manifestações respiratórias | N ☐ | S ☐ |
| 5.4 | Manifestações cardíacas | N ☐ | S ☐ |
| 5.5 | Manifestações renais | N ☐ | S ☐ |
| 5.6 | Manifestações digestivas | N ☐ | S ☐ |
| 5.7 | Manifestações dermatológicas | N ☐ | S ☐ |
| 5.8 | | | |
| 5.9 | | | |

FARMACOGENÉTICA - INCA/MS
FORMULÁRIO DE CADASTRO

1	IDENTIFICAÇÃO	Nº de controle:
1.01 Data da Entrevista: dd/mm/aaaa		1.02 Origem:
1.03 Nº da matrícula:		
1.04 Nome:		1.05 Tipo: ☐ 1. paciente ☐ 2. voluntário sadio/controle
1.06 Nome do entrevistador:		

2	DADOS PESSOAIS
2.01 Endereço:	
2.02 Bairro:	
2.03 Cidade: 2.04 Estado: (sigla)	
2.05 Cep: - 2.06 Telefone: - (DDD) - 0000-0000	
2.07 Celular:	
2.08 E-mail:	
2.09 Data de nascimento Dia Mês Ano 2.08 Idade: anos	
2.10 Local do nascimento (estado):	
2.11 Sexo: ☐ 1. Masculino ☐ 2. Feminino	
2.12 Peso: Altura:	
2.13 Grau de instrução? ☐ 1. Ensino Fundamental/1º grau/ ☐ 2. Ensino Médio/2º grau/Normal ☐ 3. Superior	

3.01 Na sua opinião, qual é a sua cor ou raça?

- | | |
|------------------------------------|---|
| ☐ 1. Branca | ☐ 4. Amarela |
| ☐ 2. Parda | ☐ 5. Indígena |
| ☐ 3. Preta | ☐ 6. Outros – especificar: _____ |

3.02 Classificação de cor ou raça feita pelo entrevistador:

- | | |
|------------------------------------|--|
| ☐ 1. Branca | ☐ 4. Amarela |
| ☐ 2. Parda | ☐ 5. Indígena |
| ☐ 3. Preta | ☐ 6. Outros _____ |

3.03 Na sua opinião, qual é a sua cor ou raça dos seus pais?

1. Mãe

2. Pai

- | | | | |
|------------------------------------|--|------------------------------------|--|
| ☐ 1. Branca | ☐ 4. Amarela | ☐ 1. Branca | ☐ 4. Amarela |
| ☐ 2. Parda | ☐ 5. Indígena | ☐ 2. Parda | ☐ 5. Indígena |
| ☐ 3. Preta | ☐ 6. Outros _____ | ☐ 3. Preta | ☐ 6. Outros _____ |

3.04 Na sua opinião, qual é a sua cor ou raça dos seus avós maternos?

1. Avó

2. Avô

- | | | | |
|------------------------------------|--|------------------------------------|--|
| ☐ 1. Branca | ☐ 4. Amarela | ☐ 1. Branca | ☐ 4. Amarela |
| ☐ 2. Parda | ☐ 5. Indígena | ☐ 2. Parda | ☐ 5. Indígena |
| ☐ 3. Preta | ☐ 6. Outros _____ | ☐ 3. Preta | ☐ 6. Outros _____ |

3.05 Na sua opinião, qual é a sua cor ou raça dos seus avós paternos?

1. Avó

2. Avô

- | | | | |
|------------------------------------|--|------------------------------------|--|
| ☐ 1. Branca | ☐ 4. Amarela | ☐ 1. Branca | ☐ 4. Amarela |
| ☐ 2. Parda | ☐ 5. Indígena | ☐ 2. Parda | ☐ 5. Indígena |
| ☐ 3. Preta | ☐ 6. Outros _____ | ☐ 3. Preta | ☐ 6. Outros _____ |

As próximas perguntas são sobre uso de produtos derivados de tabaco.

4.01 Alguma vez na vida, fumou cigarros, mesmo uma ou duas tragadas?

- ☐ 1. Sim
☐ 2. Não }

Passe pergunta 4.08

4.02 Somando todos os cigarros que o fumou na vida inteira, o total chega a 5 maços ou 100 cigarros?

- ☐ 1. Sim
☐ 2. Não }
☐ 9. Ignorado

Passe pergunta 4.08

4.03 Atualmente fuma cigarros diariamente?

- ☐ 1. Sim
☐ 2. Não }

Passe pergunta 4.05

4.04 Quantos cigarros fuma por dia? _____

4.05 Com que idade começou a fumar? _____

4.06 A quanto tempo parou de fumar? _____

4.07 Quantos cigarros fumava por dia? _____

4.08 Alguma vez na vida, o(a) Sr.(a) fumou outro produto derivado do tabaco como charutos, cigarrilhas ou cachimbo?

- ☐ 1. Sim
☐ 2. Não }

Passe próximo bloco

4.09 Atualmente o(a) Sr.(a) fuma charutos, cigarrilhas ou cachimbos diariamente?

- ☐ 1. Sim
☐ 2. Não }

Passe para pergunta
4.11

4.10 Quantos charutos, cigarrilhas ou cachimbos fuma por dia? _____

4.11 A quanto tempo parou de fumar? _____

5

CONSUMO DE BEBIDAS ALCOÓLICAS

As próximas perguntas são sobre o consumo de bebidas alcoólicas.

5.01 Faz uso de bebidas alcoólicas?

☐ 1. Sim

☐ 2. Não

Passe próximo bloco

5.02 Com que frequência o(a) sr.(a) bebe?

a) Todos os dias

b) 3 a 4 vezes por semana

c) Nos finais de semana

d) Raramente

5.03 Qual a quantidade?

1 copo de vinho ou 1 cerveja ou 1 dose de whisky ou cachaça

2-3 copos de vinho ou 2-3 cervejas ou 2-3 doses de whisky ou cachaça

mais de 3 copos de vinho ou 3 cervejas ou 3 dose de whisky ou cachaça

6

USO DE MEDICAMENTOS

As próximas perguntas são sobre o uso de medicamentos.

6.01 Faz uso de algum medicamento atualmente:

Medicamento	Dose	Frequência	Tempo de uso
1) _____	_____	_____	_____
2) _____	_____	_____	_____
3) _____	_____	_____	_____
4) _____	_____	_____	_____

6.02 Fez uso crônico de algum medicamento:

Medicamento	Dose	Frequência	Tempo de uso	Quando parou
1) _____	_____	_____	_____	_____
2) _____	_____	_____	_____	_____
3) _____	_____	_____	_____	_____
4) _____	_____	_____	_____	_____

6.01 Faz uso de algum fitoterápico, homeopatia, chá ou outro produto natural atualmente:

Medicamento	Dose	Frequência	Tempo de uso
1) _____	_____	_____	_____
2) _____	_____	_____	_____
3) _____	_____	_____	_____
4) _____	_____	_____	_____

7 DOENÇAS CRÔNICAS

7.01 Possui alguma doença crônica?

- ☐ 1. Diabetes
- ☐ 2. Pressão Alta
- ☐ 3. Insuficiência Cardíaca
- ☐ 1. Gastrite/úlcera
- ☐ 2. Tireóide
- ☐ 3. Asma/Bronquite
- ☐ 3. Outras – especifique _____

8 DADOS SOBRE A AMOSTRA

8.01 Coleta de Sangue

- 1. Data ____/____/____
- 2. Coletor: _____

**ANEXO F – Parecer sobre a emenda no protocolo clínico submetido ao
HUCFF**

Projeto nº 033/05

INSTITUTO NACIONAL DE CâNCER



anos de luta pela vida
1937-2007



De: Rita de Cássia Elias Estrela.

Para: Profa. Alice Violante
Coordenadora do CEP HUCFF/FM-UFRJ:

Re: Emenda ao protocolo, Projeto CEP N 033/05
Influência do polimorfismo genético de MDR1 na resposta a terapia lopinavir/ritonavir (Kaletra®) e implicações na transmissão sexual do vírus HIV no Brasil

Senhora Coordenadora,

Venho pelo presente, solicitar emenda ao protocolo acima referido. A emenda inclui, além das genotipagens já previstas no protocolo e TCLE aprovados, a genotipagem da variante *3 (6986A>G) do gene CYP3A5.

Esta solicitação se justifica pela demonstração recente (Josephson e cols., Clin Pharmacol Ther 2007; 81:708-712) de que este polimorfismo em CYP3A5 interage com os polimorfismos no gene *MDR1* - cuja genotipagem está prevista no protocolo aprovado por este CEP- modulando a concentração plasmática de outro antiretroviral inibidor de protease, saquinavir.

Assim, a análise do polimorfismo em CYP3A5 irá contribuir para que o objetivo principal do projeto - Investigar a participação da Pgp na manutenção dos níveis de IPs, lopinavir e ritonavir, em sêmen e saliva - seja alcançado, contemplando todas as informações farmacogenéticas agora disponíveis. A não inclusão da genotipagem desta variante poderá levar a resultados incompletos, e conclusões incorretas, em nosso estudo. O procedimento solicitado será realizado com as amostras já coletadas e não trará necessidade de novas visitas dos sujeitos da pesquisa.

Informo que a metodologia de genotipagem do polimorfismo em genes da família CYP3A é de uso corrente em nosso laboratório na Divisão de Farmacologia do INCA, e que mais de 400 indivíduos sadios já foram aí genotipados, no âmbito de outro projeto de pesquisa, aprovado pelo CEP-INCA.

Desta forma, aguardo resposta deste CEP para que possa dar início as genotipagens e dar prosseguimento ao projeto de pesquisa acima citado.

Rita de Cássia Elias Estrela
Pesquisadora Principal

UFRJ/HUCFF/FM/CEP



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
Hospital Universitário Clementino Fraga Filho
Faculdade de Medicina
Comitê de Ética em Pesquisa - CEP

CEP - MEMO - n.º 663/07

Rio de Janeiro, 21 de agosto de 2007.

Da: Coordenadora do CEP

A (o): Sr. (a) Pesquisador (a): Dra. Rita de Cássia Elias Estrela

Assunto: Parecer sobre Emenda ao Protocolo.

Referência: Projeto nº 033/05- CEP

Título: "Influência do polimorfismo genético de MDR1 na resposta a terapia lopinavir/ritonavir (Kaletra®) e implicações na transmissão sexual do vírus HIV no Brasil".

Sr. (a) Pesquisador (a),

Informo a V.Sa., que em reunião deste CEP realizada em 09/08/2007, foi apreciado e considerado "APROVADO" o parecer sobre Emenda ao Protocolo, referente ao Projeto de Pesquisa acima referenciado.

Atenciosamente,

Profª. Alice Helena Dutra Violante
Coordenadora do CEP

ANEXO G – Tabela com os dados individuais dos pacientes HIV1⁺

número	cor	Medicamentos	genótipo <i>ABCB1</i>				plasma total		fração livre plasma		saliva		sêmen	
			exon12	exon21	exon26	<i>CYP3A5</i>	LPV	RTV	LPV	RTV	LPV	RTV	LPV	RTV
227	Parda	Kaletra / AZT+3TC	TT	GT	CT	*3/*3	3569,36	82,74	16,46		53,23	4,26	204,80	9,02
228	Preta	Kaletra / TDF / 3TC / DDI	CC	GG	CC	*1/*1								
229	Branca	Kaletra / AZT+3TC / TDF	CC	GG	CT	*3/*3	9019,50	509,64	44,74	2,39	90,29	8,70	77,62	5,74
230	Parda	Kaletra / AZT+3TC	CC	GG	CC	*1/*1	7793,98	308,20	47,65	1,89	62,60	5,06	20,36	1,78
231	branca	Kaletra / TDF / 3TC	CC	GG	CT	*1/*3	5111,22	152,76	11,88		102,45	9,61	121,64	6,80
250	Branca	Kaletra / AZT+3TC	CC	GG	CC	*1/*1	7134,02	261,84	112,82	6,86			468,96	20,48
251	Preta	Kaletra / D4T / 3TC	CC	GG	CC	*1/*1	7184,68	273,10	55,98	1,81	271,13	20,76	387,96	18,28
317	Preta	Kaletra / D4T / 3TC	CC	GG	CC	*1/*3	595,90	42,44			21,89	2,52	21,60	4,34
320	Branca	Kaletra / AZT+3TC	CC	GG	CT	*1/*3	6326,32	200,14	42,37	1,16	119,98	9,95	378,96	20,54
321	Branca	Kaletra / TDF / 3TC	CT	GG	CT	*1/*3	10263,60	300,98	96,39	3,87	230,12	17,68	234,32	17,72
325	Branca	Kaletra / AZT+3TC	TT	TT	TT	*3/*3	8280,46	216,84	39,88	1,5	198,64	9,80	255,94	11,96
326	Preta	Kaletra / AZT+3TC / TDF	CC	GG	CC	*1/*3		1,17						
327	parda	Kaletra / AZT+3TC / SQV / TDF	CC	GG	CT	*3/*3	4069,92	141,32	5,22		57,21	5,30	110,32	9,24
329	Branca	Kaletra / AZT+3TC / SQV / TDF	CC	GG	CT	*3/*3	2238,72	78,76	6,41		75,05	5,26		
330	Branca	Kaletra / AZT+3TC / ABC	CT	GT	CT	*3/*3	8404,63	240,06	7,26		51,76	4,46	252,88	25,86
331	Branca	Kaletra / AZT+3TC	CT	GT	TT	*3/*3	6298,34	244,14	26,26	1,24	66,81	5,15	2226,40	86,40
332	Preta	Kaletra / D4T	CT	GG	CT	*3/*6	10412,40	673,00					1314,88	93,96
335	Branca	Kaletra / D4T / 3TC	TT	TT	CT	*3/*3	6154,20	248,96	19,32	1,00	76,05	6,79	88,06	7,06
336	Parda	Kaletra / TDF / 3TC / TMC 114 / T-20	CT	GG	CT	*1/*3	5798,90	187,00					86,74	14,54
337	Preta	Kaletra / AZT+3TC	CT	GT	CT	*1/*3	187,28	26,38						
338	Branca	Kaletra / AZT+3TC / TDF	CT	GT	CT	*3/*3	5176,48	286,31			4,67	1,31	452,16	28,72
339	parda	Kaletra / D4T / 3TC	CT	GG	CC	*1/*3	3830,90	189,72	17,15	1,00	104,88	9,18	164,32	11,14
340	Parda	Kaletra / AZT+3TC	CT	GT	CT	*3/*3	6519,90	398,64	10,26		33,70	4,15	1363,30	35,70
341	Branca	Kaletra / AZT+3TC	CT	GT	TT	*1/*3	4563,71	186,70			27,82	2,71	206,82	13,94
343	Parda	Kaletra / ABC / DDI	CC	GG	TT	*1/*1	43,04	31,50						
344	Preta	Kaletra / AZT+3TC / TDF	CT	GT	CT	*3/*3	4653,84	126,34	10,18		129,56	7,46	1033,80	29,20
345	Preta	Kaletra / AZT+3TC	TT	GG	CC	*1/*1	2770,86	83,02			61,76	3,96	67,38	4,10
370	Parda	Kaletra / AZT+3TC	CC	GG	CC	*3/*3	9048,02	288,46			19,93	1,41	439,20	19,36
371	Branca	Kaletra / D4T / 3TC	CC	GG	CC	*3/*3	4636,10	150,62	12,12		43,83	3,45	2737,00	56,60

número	cor	Medicamentos	genótipo <i>ABCB1</i>				plasma total		fração livre plasma		saliva		sêmen	
			exon12	exon21	exon26	<i>CYP3A5</i>	LPV	RTV	LPV	RTV	LPV	RTV	LPV	RTV
397	Parda	Kaletra / AZT+3TC / TDF / SAQ / RTV	CT	GG	CC	*1/*3	1,04	1,00						
416	Branca	Kaletra / AZT+3TC	CC	GG	CT	*1/*3	7150,06	216,44	43,83	1,10	83,20	5,51	2963,64	37,34
417	Branca	Kaletra / 3TC / TDF	CT	GG	CC	*3/*3	9123,00	363,14	38,26	1,47	101,19	6,32	424,96	23,68
476	Branca	Kaletra / AZT+3TC	CT	GT	CT	*1/*3	1670,20	105,78	4,73	1,46	28,97	3,97	79,28	8,00
477	Branca	Kaletra / AZT+3TC / TDF	TT	GT	CT	*3/*3	5048,54	246,44	15,18	1,16	40,76	3,06	1808,20	51,80
478	Parda	Kaletra / AZT+3TC	CC	GG	CC	*3/*3	6414,08	246,52	14,56	1,00	140,74	8,45	353,14	19,84
480	Branca	Kaletra / AZT+3TC / TDF	CC	GG	CT	*3/*3	15687,54	820,68	90,31	7,33	165,19	14,50	880,80	91,60
481	Parda	Kaletra / AZT+3TC	CC	GT	CT	*3/*3	146,82	24,84						
482	Preta	Kaletra / AZT+3TC	CC	GG	CC	*1/*3	8772,54	307,90	52,88	2,24	61,72	3,86	540,56	26,64
483	Branca	Kaletra / D4T / 3TC	CT	GT	CT	*1/*3	5090,88	250,04	11,01	2,06	101,16	6,26	189,52	12,74
484	Branca	Kaletra / D4T / 3TC	CC	GG	CT	*3/*3	1727,80	84,56			40,00	4,15	62,52	6,50
485	Branca	Kaletra / 3TC	CC	GG	CC	*1/*3	3203,14	116,54	3,3		79,25	7,72	113,00	8,52
486	Parda	Kaletra / ABC	CT	GT	TT	*1/*3	0,00	0,00						
487	Parda	Kaletra / 3TC / TDF	CC	GG	CT	*1/*3	7153,60	286,08	29,39	1,58	101,62	8,89	367,10	22,14
518	Branca	Kaletra / DDI / D4T	CT	GT	CT	*1/*3	6791,16	396,22	79,09	2,68	76,85	5,48	259,42	15,30
519	Preta	Kaletra / DDI / D4T	CC	GG	CT	*3/*6	5148,84	213,98	10,37		56,12	3,39	135,98	6,82
520	Parda	Kaletra / AZT+3TC / TDF	CC	GG	CC	*1/*3	2214,48	144,92			31,95	4,69	118,94	15,96
521	Parda	Kaletra / 3TC / TDF	CC	GG	CC	*1/*3	11968,68	357,12	66,2	2,18	101,16	5,32	751,44	30,24
522	Parda	Kaletra / AZT+3TC / TDF	CT	GT	TT	*3/*3	8780,92	627,26	20,51	1,33	182,55	18,33	339,10	22,46
535	Branca	Kaletra / AZT+3TC	CC	GG	CC	*3/*3	15464,00	1186,26	82,12	4,91	282,02	28,31	350,02	22,46
536	Branca	Kaletra / 3TC / TDF	CC	GG	CT	*1/*3	7035,16	313,90	9,26		73,97	5,02	525,84	27,28
537	Parda	Kaletra / AZT+3TC	CT	GT	CT	*1/*3	3711,08	120,00	8,59		249,39	17,56	15,54	0,00
538	Parda	Kaletra (monoterapia)	CT	GT	CT	*1/*3	2907,14	157,76	2,63		20,33	2,77	286,00	20,12
539	Branca	Kaletra / AZT+3TC / TDF	CC	GG	CC	*3/*3	2,11	1,71						
540	Parda	Kaletra / AZT+3TC	CT	GG	CC	*1/*3	1418,84	102,14			31,10	2,80	33,72	4,24
541	Parda	Kaletra / AZT+3TC	TT	GT	TT	*1/*3	8616,68	553,80	38,18	2,96	113,46	10,32	276,98	20,24
542	Branca	Kaletra / AZT+3TC	CT	GT	CC	*3/*3	732,18	49,58			27,05	4,26	92,78	12,86

número	cor	Medicamentos	genótipo <i>ABCB1</i>				plasma total		fração livre plasma		saliva		sêmen	
			exon12	exon21	exon26	<i>CYP3A5</i>	LPV	RTV	LPV	RTV	LPV	RTV	LPV	RTV
560	Ameríndia	Kaletra / AZT+3TC	CT	GT	CT	*3/*3	10876,58	581,54	44,94	2,57	134,96	11,98	427,68	22,96
595	Preta	Kaletra / AZT+3TC	CC	GG	CC	*1/*6	5,40	6,95						
596	Parda	Kaletra / AZT+3TC / TDF	CC	GG	CT	*6/*6	10820,40	335,06	43,26	1,51	252,14	16,59	3828,80	79,20
597	Branca	Kaletra / ABC / 3TC	CC	GG	TT	*3/*3	13411,36	646,96	97,26	4,10	107,97	7,92	633,60	57,60
598	Parda	Kaletra / 3TC / TDF	CC	GG	CC	*3/*3	9365,04	392,80	25,49	1,26	86,75	6,15		
599	Branca	Kaletra / AZT / DDI	CC	GG	CT	*3/*3	6374,72	392,64	9,2		36,40	4,74	114,68	12,82
600	Parda	Kaletra / AZT+3TC / ABC	CT	GT	CT	*3/*3	6618,16	365,92	24,94	2,51	130,96	8,75	305,40	19,88
601	Preta	Kaletra / AZT	CC	GG	CC	*1/*1	0,00	0,00						
602	Branca	Kaletra / SQV / TDF / 3TC	CT	GT	TT	*1/*1	8401,60	547,36	12,94	1,00	71,37	6,36	878,48	55,92
603	Branca	Kaletra / AZT+3TC	CC	GG	CC	*1/*1	6078,88	268,00			67,93	5,92	72,06	5,16
604	Branca	Kaletra / AZT+3TC / ABC	TT	GT	CT	*3/*3	5830,16	262,16	10,3	1,44	59,93	5,81	171,76	13,58
605	Parda	Kaletra / D4T / 3TC	CC	GG	CC	*1/*3	4,67	3,03						
606	Preta	Kaletra / AZT+3TC	CT	GG	CT	*1/*3	16,95	6,45						
608	Branca	Kaletra / AZT+3TC	CT	GT	CT	*3/*3	9720,64	494,24	49,82	3,11	158,30	11,15	208,02	13,96
609	Parda	Kaletra / AZT+3TC / TDF	CT	GG	CC	*3/*3	3755,60	136,80	3,81		66,99	5,15	412,40	19,76
610	Parda	Kaletra / AZT+3TC / TDF	CT	GT	CT	*3/*6	5557,84	206,80	8,88		119,12	7,84	66,00	5,04
611	Parda	Kaletra / ABC / 3TC	TT	GT	CT	*1/*3	13525,12	757,92	98,13	7,12	224,97	21,51	777,28	48,24
612	Parda	Kaletra / D4T / DDI	CC	GG	CT	*1/*3	11604,40	438,32	67,8	3,52	139,91	9,84	453,62	27,04
617	Preta	Kaletra / TDF / 3TC	CC	GG	CC	*1/*1	8434,16	599,68	50,91	2,80	172,46	12,56	235,32	15,62
622	Branca	Kaletra / AZT+3TC / TDF	CC	GG	CC	*3/*3	3760,96	150,80	6,55		23,78	2,38	613,80	18,60
625	Branca	Kaletra / AZT+3TC	CT	GT	CT	*1/*3	6133,52	292,16	16,6	2,94	38,08	2,57	176,16	10,62
626	Parda	Kaletra / D4T / 3TC	CC	GG	CC	*3/*3	3848,80	150,72	2,47		35,54	3,22	315,14	17,52
628	Branca	Kaletra / D4T / DDI	CT	GT	CT	*3/*3	2517,28	150,32			35,77	4,25		
629	Branca	Kaletra / AZT+3TC	CC	GG	CC	*1/*1	4963,44	457,76	16,13				80,44	5,98
634	Branca	Kaletra - D4T - 3TC	CC	GG	CT	*3/*3	3474,80	210,00	2,46		15,44	1,77	100,40	8,00
635	Parda	Kaletra / AZT+3TC / ABC	TT	GT	TT	*3/*3	2341,36	119,36			34,59	2,53	75,38	6,82
636	Branca	Kaletra / AZT+3TC	CC	GA	CC	*1/*3	3630,32	206,32	4,25		30,95	2,77	52,20	6,30
647	parda	Kaletra / AZT+3TC / TDF	CC	GG	CC	*1/*1	3231,04	172,16	2,65		28,45	2,28	166,26	12,02
648	Parda	Kaletra / AZT+3TC / TDF	CC	GG	CC	*1/*1	3035,52	130,88	10,32				79,38	5,06

número	cor	Medicamentos	genótipo <i>ABCB1</i>				plasma total		fração livre plasma		saliva		sêmen	
			exon12	exon21	exon26	<i>CYP3A5</i>	LPV	RTV	LPV	RTV	LPV	RTV	LPV	RTV
654	Branca	Kaletra / AZT+3TC / TDF	CC	GG	CC	*3/*3	9029,44	366,80	41,54	2,32	49,95	3,50	604,88	42,64
655	parda	Kaletra / AZT+3TC	CT	GA	CC	*1/*1	5433,04	468,64	9,41	7,86	92,44	7,24	180,78	15,28
668	Parda	Kaletra / TDF / FTC	CC	GG	CC	*1/*3	10024,32	646,56	52,33	4,96	256,60	22,00	394,60	31,98
669	Branca	Kaletra / AZT+3TC	CT	GT	CT	*1/*3	5693,84	259,36	29,51	1,70	118,98	8,24	652,16	26,32
670	Parda	Kaletra / AZT+3TC	CC	GG	CC	*3/*3	8171,28	241,84	46,59	1,23	46,71	3,22	241,78	10,50
682	Preta	Kaletra / SQV / 3TC / TDF	CC	GG	CC	*1/*3	0,00	0,00						
683	Parda	Kaletra / DDI / D4T	CC	GG	CT	*3/*3	7376,96	306,72	24,66		214,36	18,65	564,72	28,64
684	Parda	Kaletra / AZT+3TC	TT	GT	CT	*1/*3	9599,28	427,92	31,47	1,82	37,83	2,60	409,10	28,10
685	Parda	Kaletra / AZT+3TC	CC	GG	CC	*3/*3	11612,72	749,92	50,25	3,42	75,97	7,71	666,00	39,20
688	parda	Kaletra / DDI / TDF / 3TC	CT	GT	CT	*3/*6	5474,56	209,68	8,11		33,59	2,72	135,08	8,20
689	Parda	Kaletra / AZT	CT	GT	CT	*1/*6	6978,56	231,68	14,21		21,00	1,68	123,16	6,14
694	Branca	Kaletra / 3TC / TDF	CT	GT	CT	*1/*3	9653,60	583,68	8,62		46,75	3,86	336,56	19,18
700	Parda	Kaletra / AZT+3TC / TDF	CC	GG	CC	*1/*3	5275,44	288,88	11,99		195,85	12,96	301,50	15,40
701	Branca	Kaletra / SQV / 3TC / DDI	CC	GG	CT	*3/*3	3272,64	189,60	5,23		21,39	1,78	242,24	13,54
702	Parda	Kaletra / TDF / 3TC	TT	TT	TT	*3/*6	7578,64	303,92	100	3,08	56,05	3,17	389,88	15,98
703	Parda	Kaletra / TDF / 3TC / DDI	CC	GT	CT	*3/*3	7424,80	343,76	24,29	1,00	42,17	4,30	279,10	16,98
710	Parda	Kaletra / AZT+3TC	CT	GT	CT	*3/*6	8031,12	314,56	65,79	2,80	64,77	4,94	638,64	27,92
711	Preta	Kaletra / AZT+3TC / TDF	CC	GG	CC	*3/*3	7540,14	1201,38	50,18	2,60	294,61	24,02	583,40	61,20
712	Parda	Kaletra / AZT+3TC	CC	GG	CC	*3/*3	8088,24	532,64	26,37	2,01	170,66	11,67	399,52	19,04
719	Parda	Kaletra / SQV / DDI / 3TC / TDF	CC	GG	CC	*1/*3	9164,48	526,64	4,38		19,15	1,12	133,58	6,46
720	Branca	Kaletra / AZT+3TC / ABC	CC	GG	CT	*3/*3	7687,76	270,96	24,15	1,00	101,50	5,45	6,12	0,52
722	Branca	Kaletra / AZT+3TC / TDF	CT	TT	TT	*3/*3	3925,68	142,32	6,29		42,23	2,50	182,44	7,92
723	Branca	Kaletra / DDI / 3TC	CC	GG	CT	*3/*3	6600,08	648,40	35,82	1,83	206,75	22,71	482,00	36,64
724	Branca	Kaletra / D4T / ABC	TT	TT	TT	*3/*3	8904,80	533,76	11,64		93,32	8,57	441,60	30,80
726	Branca	Kaletra / AZT+3TC / TDF	TT	GT	CT	*1/*3	8028,08	250,96	37,19		74,92	3,11	534,40	19,84
727	Parda	Kaletra / ABC / 3TC / TDF	CT	GT	CT	*3/*3	4889,92	181,44	13,54	1,00	93,14	7,23	286,80	15,62
728	Preta	Kaletra / ABC / 3TC	CT	GG	CC	*1/*1	5389,04	155,28	10,63		56,91	3,63	193,94	9,20
732	Branca	Kaletra / AZT+3TC / SQV	CC	GG	TT	*3/*3	8547,76	325,84	2,46		47,26	3,19	258,08	12,08

APÊNDICE A – “Determination of lopinavir and ritonavir in blood plasma, seminal plasma, saliva and plasma ultra-filtrate by Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry Detection.” enviando para publicação em novembro de 2007 na revista Rapid Communications in Mass Spectrometry. Autores: **Rita C. E. Estrela**, Fabio S. Ribeiro, Brayan S Viegas, Guilherme Suarez-Kurtz.

Determination of Lopinavir and Ritonavir in Blood Plasma, Seminal Plasma, Saliva and Plasma Ultra-Filtrate by Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry Detection.

Rita C. E. Estrela, Fabio S. Ribeiro, Brayan V. Seixas and Guilherme Suarez-Kurtz *

Coordenação de Pesquisa, Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro, Brazil

*Corresponding author

Coordenação de Pesquisa, Instituto Nacional de Câncer, Rua André Cavalcanti, 37, Rio de Janeiro, RJ, 20231-050, Brazil

tel +5521 3233-1310

fax +5521 3233-1340

email kurtz@inca.gov.br

Short title: LC-MS/MS determination of lopinavir and ritonavir

Number of pages: text 14; figures 3; tables 9

Abstract

A method based on liquid-liquid extraction followed by high-performance liquid chromatography (HPLC) with positive ion electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS) detection was developed for the simultaneous determination of lopinavir (LPV) and ritonavir (RTV) in human blood, semen and saliva samples. The acquisition was performed in MRM mode, monitoring the transitions: m/z 629 > 447.1 for LPV, 721.18 > 268.02 for RTV and m/z 747.22 > 322.03 for IS. The limit of quantification was 1 ng/mL for both analytes in all matrices. The method was linear in the studied range (1 – 2000 ng/mL for LPV and 1 – 200 ng/mL for RTV), with $r^2 > 0.99$ for each drug, and the run time was 4.5 minutes. The intra-assay precisions (%) were in the ranges of 0.1 – 14.2 (LPV) and 0.4 – 12.7 (RTV), the inter-assay precisions were in the ranges of 2.8 – 15.3 (LPV) and 1.1 – 12.8 (RTV) and the intra- and inter-assay recoveries were >85% for both drugs. The extraction efficiencies were 73.5-118.4% for LPV and 74.4-126.2% for RTV. The analytical method was applied to measure LPV and RTV concentrations in blood plasma (total and unbound fraction), saliva and semen of 6 HIV⁺ individuals under stable treatment with Kaletra® soft gel capsules. The results were consistent with previously published data.

Key words: lopinavir, ritonavir, protease inhibitor, semen, saliva, unbound plasma, LC-MS/MS.

Introduction

The therapeutic class of HIV protease inhibitors (PI) represents an important component of current highly active antiretroviral therapy (HAART) regimens.¹ Lopinavir (LPV) is a PI developed from, and structurally related to ritonavir (RTV)² and the two drugs are always used in a fixed-dose combination (33 mg RTV + 133 mg LPV, Kaletra®). The antiretroviral effect of this product is due to LPV, whereas RTV acts as a “booster” by virtue of its inhibitory effect on the cytochrome P450 CYP3A isoenzymes that inactivate LPV.³ The distribution of LPV and RTV in the body is limited by their extensive binding to plasma protein, predominantly α 1-acid glycoprotein (~99%) and their affinity for drug-transporting proteins, especially P-glycoprotein (ABCB1 or MDR1).⁴ As a consequence, the concentration of LPV and RTV in brain, semen and saliva is several-fold lower than their total (unbound plus protein-bound) concentrations in blood,⁵ and may not be sufficient for antiretroviral activity at these “sanctuary sites”.⁶ Viral rebound from such reservoirs can occur if the antiretroviral therapy is discontinued and therefore, sanctuary sites remain major obstacles for the eradication of HIV from the body.⁷ Investigation of the mechanisms that control the penetration and retention of LPV and RTV in drug sanctuaries require sensitive and specific analytical procedures. Here we report the development and validation of LC-MS/MS method, which fulfills these requirements for LPV and RTV in different biological matrices, including semen and saliva.

Experimental

Chemicals

LPV, RTV and A886093.0 (used as internal standard- IS) were kindly supplied by Abbott Laboratories (Chicago, IL). Methanol (HPLC-grade), acetonitrile and formic acid were purchased from Tedia Brasil (Rio de Janeiro, RJ, Brazil), ammonium acetate (analytical-grade) from Merck do Brasil (Rio de Janeiro, RJ, Brazil). Ultra-pure water was obtained from a Millipore Direct-Q5 system (Bedford, MA, USA).

Biological samples

Drug-free biological matrices for the development, validation and control of the method were obtained from healthy volunteers from the blood bank (blood plasma) and from members of our laboratory (semen and saliva) at Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro, Brazil. After validation, the method was applied to measure the total LPV and RTV concentrations in blood plasma, seminal plasma and saliva, and the unbound LPV and RTV concentrations in blood plasma from six HIV⁺ individuals under stable treatment with Kaletra[®] soft gel capsules for at least 4 weeks. The study protocol was approved by the Ethics Committee of the Hospital Universitário Clementino Fraga Filho/School of Medicine from the Universidade Federal do Rio de Janeiro, and the enrolled individuals signed an informed consent form. LPV and RTV were administered at doses of 400 mg and 100 mg, respectively, twice daily. Semen, saliva and blood samples were collected 30 to 5 minutes before the scheduled morning dose. Semen was collected by masturbation and after liquefaction, seminal plasma was obtained by centrifugation at 1400 g for 15 minutes. Saliva was collected by spitting into a polypropylene tube after cleaning the mouth with water. Blood was drawn from a peripheral vein and plasma was obtained by centrifugation at 900 g for 10 minutes. Seminal plasma, saliva, and blood plasma were stored frozen at -20°C until use.

Instrumentation

An LC-MS/MS system consisting of a liquid chromatograph (10AVP, Shimadzu, Kyoto, Japan) coupled to an electrospray tandem mass spectrometer (Quattro LC, Micromass, Altringham, Cheshire, UK) was used.

Calibration standards and quality control samples

LPV and RTV were weighed in duplicate and dissolved in 100% acetonitrile to give four 1 mg/mL stock solutions (two solutions for LPV and two for RTV) designated I and II for each compound. Dilutions of the stock solutions were made with ultrapure water:methanol (1:1), as appropriate, to obtain final solutions of LPV and RTV (100, 10 and 1 µg/mL). The 1 µg/mL dilutions of stocks I and II for each compound were analyzed by LC-MS/MS to ensure that the drug concentrations of the original solutions were within the maximum established error ($\leq 3\%$). Calibration curves of LPV and RTV were prepared by spiking each of pooled blank matrix (blood plasma, seminal plasma, saliva, and ultra-filtrate plasma) with solutions derived from the stock solutions I (shown in Table1). Quality controls (QC) were prepared by spiking blank matrix with solutions derived from stock solutions II to provide four different concentrations (Table 1). As the internal standard, a stock solution of A886093.0 (1 mg/mL) was prepared in acetonitrile and was subsequently diluted with distilled water to a final concentration of 20 µg/mL.

Ultra-filtration of blood plasma

Ultra-filtration was used to separate unbound from bound LPV and RTV in blood plasma using a Centricon Filter Devices YM-30 (Millipore Corporation, Bedford, MA, USA). After 30-minute equilibration at 37°C, plasma samples (600 µL) was placed into the device and centrifuged (3000g, 60 minutes, 37°C). Each sample provided

approximately 400 μL of ultra-filtrate containing the unbound drug. For calibration and QC samples, ultra-filtration was performed before spiking with stock solutions.

Liquid-liquid extraction

All matrices received the same treatment for LC-MS/MS analysis. The frozen calibration QC and patient samples were thawed at ambient temperature and aliquots of 200 μL were added to 15 mL polypropylene tubes containing 50 μL of internal standard solution. Subsequently, the samples were alkalized with 200 μL of NaOH 0.01 mM and vortexed. Then, all tubes received 2 mL of tertbutylmethylether (MTBE) and the samples were shaken for 15 minutes. After centrifugation (10 minutes, 2000g, 25°C) the organic layers were separated with a Pasteur pipette and evaporated in a centrifugal evaporator (Jouan, Saint-Herbalin, France). Extracts were reconstituted in 200 μL of mobile phase and 50 μL was injected into the LC-MS/MS.

Chromatographic conditions

Separation of analytes and IS was accomplished using a LiChrocart®125 x 4 mm i.d. LiChrospher® 100 RP-18 end-capped, 5 μm analytical column, coupled to a LiChrospher® 100 RP-18, 4 x 4 mm i.d., 5 μm guard-column, both from Merck KGaA (Darmstadt, Germany), operated at 40°C. The isocratic mobile phase of 5 mM ammonium acetate-methanol (20:80 v/v) pH=3.2, containing formic acid was pumped at 1 mL/min. A split at the end of the column directed 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ to the mass spectrometer and discarded 900 $\mu\text{L}/\text{min}$. The total run time was 4.5 minutes.

Mass spectrometer conditions and method development

The mass spectrometer equipped with an electrospray ionization (ESI) source was run in the positive ion mode (ES+) and set up in multiple reaction monitoring (MRM) mode.

In order to tune the mass spectrometer parameters, standard solutions of LPV, RTV and IS (1 ng/ μ L) were infused separately into the 75 μ m i.d. fused silica tube capillary of the electrospray source at a constant flow-rate of 0.8 mL/h, using a KD Scientific syringe pump, model 100. The electrospray capillary potential was set to 3.0 kV. Nitrogen (550 L/h) was used as a drying gas for solvent evaporation. The source and desolvation temperatures were kept at 80°C and 250°C, respectively. The dwell time was 0.33 seconds for each analyte. The cone voltage was 35 V for LPV and RTV, and 25 V for IS. Argon was used as the collision gas, and the collision cell pressure was 3.5 mbar. The collision energy was 16 eV for LPV, 30 eV for RTV and 20 eV for IS. Resolutions for the first and second quadrupoles were 13.0 and 12.0, respectively, with peak widths of 1.0 Da at 50% peak height, for both. Based on the full scan MS/MS spectrum of each drug, the most abundant ions were selected and the mass spectrometer was set to monitor the transitions of the precursors to the product ions, as follows: m/z 629 $\rightarrow$ 447.1 for LPV, m/z 721.18 $\rightarrow$ 268.02 for RTV and m/z 747.22 $\rightarrow$ 322.03 for IS. Data acquisition and analysis were performed using the MassLynx v.3.2 (Micromass, Manchester, UK).

Ion Suppression

Investigation of ion suppression effects was performed by post column infusion experiment, injecting and analyzing the blank matrices (blood plasma, saliva and seminal plasma) while infusing the analytes in mobile phase into the tandem mass spectrometer.⁸

Method validation

For method validation, the tests were performed on replicates of QC samples in three different assays. The analytical runs included a blank, a blank spiked with IS, blank

samples for the specificity test, six or eight concentration levels of calibration samples (n=2) for the calibration curve, QC samples (QC-LQ, QCL, QCM and QCH) in replicates (n=5) for the determination of precision, recovery and extraction efficiency, QCL and QCH (n=3) for testing the stability of both LPV and RTV. For the specificity test, six different blank samples (for all matrices) were obtained as described above (Biological Samples).

The limit of quantification (LOQ) was the lowest concentration of the analyte measured with acceptable recovery and precision (% bias and $RSD \leq 20\%$). The linearity of the calibration curves was determined by the least-squares 1/x weighted linear regression approach. To determine the extraction efficiency of LPV + RTV, extraction efficiency control solutions were prepared at different concentrations corresponding to QC concentrations with IS. Blank of all matrix without IS was extracted and reconstituted with 200 μ L of extraction efficiency control solutions (corresponded non-extracted). The extraction efficiency from each matrix after the liquid-liquid procedure was determined by comparing the responses obtained from non-extracted, with extracted QCs (n=5). The results were expressed as extraction efficiency (%) = (extracted / non-extracted) x 100.

The intra- and inter-assay precisions were determined as the RSD (%), and the intra- and inter-assay recoveries were expressed as percentages of the nominal concentration, *i.e.*, as recovery (%) = (found concentration / nominal concentration) x 100. Intra-assay precision and recovery were calculated using the average of the five measured concentrations in each validation group obtained in the same assay; inter-assay precision and recovery were calculated using the first replicate obtained in three different assays for each validation group.

The following criteria were used to assess the suitability of precision and recovery: the RSD determined at each concentration level should not exceed 15%, except at the limit of quantitation where it should not exceed 20%; the recovery should be within 85-115%, except at the limit of quantitation, where deviations should not exceed 20%.

The freeze-thaw stability of LPV and RTV in plasma, semen and saliva was assessed by analyzing replicates (n=3) of QCL and QCH was determined after each of 2-3 freeze-thaw cycles (-26°C to ~23°C) on consecutive days.

Whenever the analyte concentrations in the biological samples exceeded the range of the corresponding calibration curves, the samples were diluted (4-20 fold) with the respective blank. To assess whether dilution affected the precision and recovery of the analysis, dilution tests were performed with the QC samples.

Statistical analysis

The equations derived for the calibration curves in each matrix were compared by ANCOVA, using Prism 4.0 software. The level of significance was set at $p < 0.05$.

Results and Discussion

In this article we describe a procedure, which allows measurements of LPV and RTV concentrations in three different biological matrices as well as quantification of the unbound fraction of these protease inhibitors in blood plasma. Through rigorous validation tests, this method was shown to have acceptable specificity, precision and recovery for use with each matrix.

Chromatographic conditions were optimized to provide short retention times and adequate peak shape. The mobile phase selected for this assay provided the required

sensitivity with both short retention times and nearly symmetrical peaks. Liquid-liquid extraction with MTBE provided a simple sample preparation. This method proved to be very efficient and selective for the determination of LPV and RTV in all matrices. Figure 1 shows typical MRM chromatograms of the analytes LPV, RTV and the IS with retention times of 3.17, 2.44 and 2.8 min, respectively in ultra-filtrate-plasma. Figure 2 illustrates the MRM chromatograms of blank matrices samples used for the specificity test in blood plasma (a), seminal plasma (b), saliva (c) and ultra-filtrate-plasma (d). No interfering peaks at the retention times of LPV, RTV and IS were observed in the chromatograms, and there was no measurable carryover after injection of even the highest concentration standards used in the assay.

The MRM chromatograms of mobile phase, blood plasma, seminal plasma, and saliva, during the ion suppression test (Figure 3) revealed no ion suppression effects at the analyte retention times or 10 minutes afterwards.

The LOQs were established as 1 ng/mL, with RSDs <15.3% and recoveries better than 85% for both analytes in all matrices. The calibration curves showed linear responses over the studied range for both analytes in all matrices (Table 1). The linear equations for the calibration curves of LPV and RTV in total plasma differed significantly from the corresponding equations for the unbound plasma fraction and for semen or saliva, with the only exception of LPV unbound fraction in plasma (Table 2). These data indicate that equations derived for total plasma cannot be used for quantifying LPV and RTV in semen or saliva, or for quantifying the unbound fraction of RTV in plasma. This conclusion supports the notion⁹ that preferably an assay for the quantification of protease inhibitors in a special matrix should be developed and validated for its intended

use in the matrix of interest. Accordingly, all validation steps and quantification of patient samples were carried out using the respective matrices.

The mean extraction efficiencies were 96.1% (range 83.4-118.4% for all matrices) for LPV and 89.8% (range 73.24-126.2% for all matrices) for RTV. The RSD values for intra-assay and inter-assay precision and recovery for LPV and RTV in blood plasma, seminal plasma, saliva, and ultra-filtrate plasma are shown, respectively, in Tables 3, 4, 5 and 6. The freeze-thaw cycles had no effect on the stability of the analytes in blood plasma and seminal plasma, an RSD%<14 being observed after 3 cycles. By contrast, a significant difference in loss/degradation of analytes in saliva occurred after the second freeze-thaw cycle leading to RSD% values >20 for both LPV and RTV.

Dilution performed with the QCM and QCH samples shows that it is possible to dilute samples without loss in precision (LPV 0.2-7.7% and RTV 0.3-4.3%) or recovery (LPV 95.8-107.5% and RTV 87.2-113.2%).

Several analytical methods for the simultaneous determination of LPV and RTV in biological matrices using LC-MS/MS have been reported (10-21), some of which are applicable to other PIs, in addition to lopinavir and ritonavir. Our method has the comparative advantage of being applicable to various biological matrices (plasma, plasma ultrafiltrate, semen and saliva), with LOQ comparable to the lowest reported values in the literature and a run time of 4.5 min, not requiring gradient elution. Compared to the procedure described by Ehrhardt *et al.*¹⁶ with which our method shares several features, we report higher sensitivity and faster run time. These differences might be explained by our use of 8 times as much sample and 3 times higher flow rate. The two methods differ also in the columns used.

To test the applicability of the novel method for clinical studies, we quantified LPV and RTV concentrations in blood plasma, saliva and semen of 6 HIV⁺ individuals under stable treatment with Kaletra® soft gel capsules. The data, shown in Table 7 are consistent with results reported for the different matrices, by ourselves²² and others.^{10, 23}

Conclusion

The described LC-MS/MS method for simultaneous monitoring of the concentration profiles of LPV and RTV in blood plasma, seminal plasma, saliva, and ultra-filtrate plasma is rapid, specific, robust, and permits TDM applications. The use of saliva for monitoring LPV and RTV concentrations is convenient, by virtue of being non-invasive, must be weighed against the risk of loss/degradation of the analytes following freeze-thaw cycles.

Acknowledgement

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, grant # 302.508/2005-8), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ, grant #152.004/04) and the Swiss Bridge Foundation.

References

1. Flexner C. *New England Journal of Medicine* 1998; **338**: 1281.
2. Cvetkovic RS, Goa KL *Drugs*. 2003; **63**: 769.
3. Ernst CS 2nd, Hall SD, Jones DR. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 2005; **312**: 583.
4. Ford J, Khoo SH, Back DJ. *Journal of Antimicrobials and Chemotherapy* 2004; **54**: 982.
5. Solas C, Lafeuillade A, Halfon P, Chadapaud S, Hittinger G, Lacarelle B. *Antimicrobials Agents and Chemotherapy* 2003; **47**: 238.

6. Kepler TB, Perelson AS. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 1998; **95**: 11514.
7. Lowe SH, Sankatsing SUC, Repping S, Veen FV, Reiss P, Lange JM, Prins JM. *AIDS* 2004; **18**: 1353.
8. Annesley TM. *Clinical Chemistry* 2003; **49**: 1041.
9. Crommentuyn KML, Huitema ADR, Beijnen JH. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2005; **38**: 139.
10. Lafeuillade A, Solas C, Halfon P, Chadapaud S, Hittinger G, Lacarelle B. *HIV Clin Trials*. 2002; **3**:27.
11. Volosov A, Alexander C, Ting L, Soldin S. *Clinical Biochemistry* 2002; **35**: 99.
12. Frerichs VA, DiFrancesco R, Morse GD. *Journal of Chromatography B. Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 2003; **787**: 393.
13. Koal T, Burhene H, Römmling R, Svoboda M, Resch K, Kaever V. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2005; **19**: 2995.
14. Dickinson L, Robinson L, Tjia J, Khoo S, Back D. *Journal of Chromatography B* 2005; **829**: 82.
15. Colombo S, Beguin A, Telenti A, Biollaz J, Buclin T, Rochat B, Decosterd LA. *Journal of Chromatography B* 2005; **819**: 259.
16. Ehrhardt M, Möck M, Haefeli WE, Mikus G, Burhenne J. *Journal of Chromatography B. Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 2007; **850**: 249.

17. Wang PG, Wei JS, Kim G, Chang M, El-Shourbagy T. *The Journal of Chromatography A* 2006; **1130**: 302.
18. Koal T, Sibum M, Koster E, Resch K, Kaefer V. *Clinical Chemistry Laboratory Medicine* 2006; **44**: 299.
19. DiFrancesco R, DiCenzo R, Vicente G, Donnelly J, Martin TM, Colon LA, Schifito G, Morse GD. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2007; **44**: 1139.
20. Gehrig AK, Mikus G, Haefeli WE, Burhenne J. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2007; **21**: 2704.
21. ter Heine R, Alderden-Los CG, Rosing H, Hillebrand MJX, van Gorp ECM, Huitema ADR, Beijnen JH. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2007; **21**: 2505.
22. Vergara TRC, Estrela RCE, Suarez-Kurtz G, Schechter M, Cerbino-Neto J, Barroso PF. *Therapeutic Drug Monitoring* 2006; **28**: 175.
23. Isaac A, Taylor S, Cane P, Smit E, Gibbons SE, White DJ, Drake SM, Khoo S, Back DJ. *Journal of Antimicrobials and Chemotherapy* 2004; **54**: 498.

Table 1. Range of the calibration curves of LPV and RTV in different matrices

Matrix	Calibration Curve Samples		Quality Control Samples	
	LPV	RTV	LPV	RTV
plasma	1, 5, 50, 200, 600, 1200, 1500, and 2000	1, 2, 15, 30, 50, 80, 100, and 200	1, 15, 500, and 1300	1, 3, 40, and 90
semen	1, 3, 20, 40, 100, and 200	1, 2, 10, 18, 30, and 50	1, 10, 70, and 160	1, 3, 20, and 40
saliva	1, 5, 20, 40, 60, and 100	1, 2, 10, 18, 30, and 50	1, 1.8, 40, and 80	1, 1.8, 20, and 40
ultra-filtrate				
plasma	1, 3, 20, 40, 100, and 200	1, 2, 10, 18, 30, and 50	1, 10, 70, and 160	1, 3, 20, and 40

Table 2. Linear regression parameters (mean±SD) of LPV and RTV in different biological matrices

Lopinavir				
matrix	plasma	saliva	seminal plasma	plasma ultra-filtrate
slope	3.3E-3±3.2E-4	2.0E-3±1.0E-3**	2.0E-3±1.3E-4**	3.2E-3±1.3E-5
intercept	-1.2E-3±1.6E-4	-4.5E-4±5.1E-4	-7.4E-4±2.9E-5	-8.6E-4±2.2E-4
correlation coefficient	0.99±0.004	0.99±0.008	0.99±0.004	0.99±0.003
Ritonavir				
matrix	plasma	saliva	seminal plasma	plasma ultra-filtrate
slope	2.8E-3±2.5E-4	1.8E-3±7.1E-5**	2.3E-3±2.0E-4	3.2E-3±1.6E-3
intercept	-7.9E-4±1.1E-4	-8.7E-5±2.8E-5	-1.6E-4±1.1E-4**	9.6E-4±5.2E-5*
correlation coefficient	0.99±0.004	0.99±0.0025	0.99±0.005	0.99±0.005

* p<0.01 vs total plasma, ** p<0.0001 vs total plasma

Table 3. Results of intra-assay and inter-assay precision and recovery of LPV and RTV in blood plasma

Nominal concentration (ng/ml)		Lopinavir				Ritonavir			
		1	15	500	1300	1	3	40	90
intra-assay									
1	mean (ng/mL)	1.2	15.1	537.9	1364.2	1.1	2.7	37.2	98.0
	recovery (%)	116.2	100.4	107.6	104.9	114.6	90.3	92.9	108.9
	precision (%CV)	1.8	5.0	1.9	2.1	4.0	2.1	6.6	3.4
2	mean (ng/mL)	0.9	14.5	507.6	1312.2	1.1	2.6	34.8	93.2
	recovery (%)	89.6	96.9	101.5	100.9	106.6	87.1	87.1	103.6
	precision (%CV)	5.6	5.7	2.3	2.6	3.4	1.3	1.1	2.3
3	mean (ng/mL)	1.1	16.2	509.4	1223.4	1.1	3.1	38.6	90.5
	recovery (%)	113.0	108.1	101.9	94.1	114.5	103.7	96.5	100.5
	precision (%CV)	4.3	5.7	7.5	8.6	1.9	4.0	8.3	8.5
inter-assay									
	mean (ng/mL)	1.1	15.9	545.4	1297.2	1.1	2.9	37.2	91.3
	recovery (%)	109.3	106.1	109.1	99.8	110.3	95.0	93.1	101.5
	precision (%CV)	15.3	6.4	4.7	6.0	4.5	12.8	10.4	9.1

Table 4. Results of intra-assay and inter-assay precision and recovery of LPV and RTV in seminal plasma

Nominal concentration (ng/ml)		Lopinavir				Ritonavir			
		1	10	70	160	1	3	20	40
intra- assay									
1	mean (ng/mL)	0.9	10.9	66.3	168.7	0.9	2.6	21.4	37.2
	recovery (%)	86.2	109.3	94.7	105.4	91.6	87.3	107.1	93.1
	precision (%CV)	1.0	0.8	4.9	2.5	3.5	0.9	2.6	2.9
2	mean (ng/mL)	0.9	11.1	67.9	181.6	1.0	2.6	21.0	37.1
	recovery (%)	92.4	110.6	97.1	113.5	103.4	85.8	104.8	92.9
	precision (%CV)	6.7	1.5	3.5	2.2	3.7	0.4	3.6	3.0
3	mean (ng/mL)	0.9	11.3	77.1	183.6	1.0	2.7	21.9	38.8
	recovery (%)	94.0	113.5	110.2	114.7	96.3	89.8	109.7	96.9
	precision (%CV)	10.9	1.8	3.6	0.1	8.3	2.8	4.5	3.3
inter- assay									
	mean (ng/mL)	0.9	11.2	69.6	177.3	1.0	2.6	21.3	37.9
	recovery (%)	88.0	111.8	99.4	110.8	96.3	87.2	106.4	94.7
	precision (%CV)	5.2	2.8	5.3	3.0	7.3	2.5	2.2	3.7

Table 5. Results of intra-assay and inter-assay precision and recovery of LPV and RTV in saliva

Nominal concentration (ng/ml)		Lopinavir				Ritonavir			
		1	1.8	40	80	1	1.8	20	40
intra-assay									
1	mean (ng/mL)	0.9	1.6	36.8	76.9	0.9	1.8	18.6	38.8
	recovery (%)	86.5	89.8	91.9	96.2	85.0	99.6	93.2	97.1
	precision (%CV)	5.2	4.0	3.8	3.2	1.7	5.0	4.8	5.2
2	mean (ng/mL)	1.0	1.6	42.4	74.8	1.0	1.7	22.0	35.9
	recovery (%)	97.5	86.2	106.1	93.5	98.4	96.9	110.2	89.8
	precision (%CV)	4.5	1.4	4.7	14.2	7.6	4.0	4.3	4.7
3	mean (ng/mL)	0.9	1.6	36.3	70.4	1.0	2.0	17.9	36.0
	recovery (%)	94.4	90.0	90.7	88.0	96.6	110.7	89.6	90.1
	precision (%CV)	10.2	4.5	6.9	13.0	7.8	4.6	4.4	8.5
inter-assay									
	mean (ng/mL)	1.0	1.6	37.5	75.2	0.9	1.9	19.5	37.9
	recovery (%)	96.7	89.6	93.7	94.1	86.7	105.6	97.7	94.8
	precision (%CV)	12.8	5.8	7.1	8.2	3.5	8.9	10.2	7.6

Table 6. Results of intra-assay and inter-assay precision and recovery of LPV and RTV in ultra-filtrate plasma

Nominal concentration (ng/ml)		Lopinavir				Ritonavir			
		1	10	70	160	1	3	20	40
intra- assay									
1	mean (ng/mL)	0.9	8.8	62.0	153.6	0.9	3.1	18.7	40.0
	recovery (%)	88.0	87.5	88.6	96.0	88.3	104.8	93.5	99.9
	precision (%CV)	6.0	1.1	2.7	2.9	3.5	5.3	12.7	1.8
2	mean (ng/mL)	1.0	8.6	66.5	180.2	1.0	3.2	17.8	45.0
	recovery (%)	97.5	86.3	95.0	112.6	95.8	105.2	89.0	112.5
	precision (%CV)	2.7	1.1	5.2	0.5	8.0	7.8	2.7	3.1
3	mean (ng/mL)	0.9	8.5	61.8	151.6	0.9	2.8	17.3	40.6
	recovery (%)	93.4	85.3	88.3	94.8	91.3	93.3	86.7	101.5
	precision (%CV)	4.3	0.7	2.9	7.2	8.1	2.4	2.0	6.9
inter- assay									
	mean (ng/mL)	0.9	3.1	17.8	41.4	0.9	8.6	65.0	162.5
	recovery (%)	94.7	103.3	89.1	103.4	94.7	85.8	92.8	101.6
	precision (%CV)	8.9	8.7	4.3	4.3	2.4	1.1	7.1	9.8

Table 7. LPV and RTV concentrations in blood plasma, semen, saliva and ultra-filtrate plasma of 6 HIV⁺ individuals under stable treatment with Kaletra® soft gel capsules

Lopinavir				
patient/matrix	plasma	semen	saliva	ultra-filtrate plasma
1	6326.32	378.96	119.98	42.37
2	10263.60	234.32	230.12	96.39
3	8280.46	255.94	198.64	39.88
4	11968.68	751.44	101.16	66.2
5	5830.16	171.76	59.93	10.3
6	15464.00	350.02	282.02	82.12
Ritonavir				
patient/matrix	plasma	semen	saliva	ultra-filtrate plasma
1	200.14	20.54	9.95	1.16
2	300.98	17.72	17.68	3.87
3	216.84	11.96	9.80	1.5
4	357.12	30.24	5.32	2.18
5	262.16	13.58	5.81	1.44
6	1186.26	22.46	28.31	4.91

FIGURE LEGENDS

Figure. 1. MRM chromatograms of LPV (a), RTV (b) and IS (c) after liquid-liquid extraction of QCH in seminal plasma.

Figure. 2 .MRM chromatograms of human blank matrices. (a) blood plasma, (b) seminal plasma, (c) and saliva.

Figure. 3. Ion suppression investigation by post-column infusion experiments positive MRM detection mode. (a) mobile phase, (b) blood plasma, (c) seminal plasma, and (d) saliva.

APÊNDICE B – “Limited Penetration of Lopinavir and Ritonavir in the Genital Tract of Men Infected with HIV-1 in Brazil” publicado na revista Therapeutic Drug Monitoring volume 28, páginas 175-179, 2006. Autores: Tânia R. C. Vergara, **Rita C. E. Estrela**, Guilherme Suarez-Kurtz, Mauro Schechter, José Cerbino-Neto, Paulo F. Barroso.

Limited Penetration of Lopinavir and Ritonavir in the Genital Tract of Men Infected with HIV-1 in Brazil

Tania R. C. Vergara, MD,* Rita C. E. Estrela, MD, Pharm,† Guilherme Suarez-Kurtz, MD, PhD,†
Mauro Schechter, MD, PhD,* José Cerbino-Neto, MD,* and Paulo F. Barroso, MD, PhD*

Abstract: The concentrations of lopinavir and ritonavir in seminal and blood plasma and the seminal human immunodeficiency virus (HIV) viral load were quantified by HPLC and the Nuclisens[®] assay, respectively, in a cross-sectional study of 16 HIV-1-infected Brazilian men under stable treatment with a lopinavir/ritonavir containing antiretroviral regimen. Semen and blood samples were collected on 2 occasions: at 6 to 60 minutes before ("trough"), and 5 to 6 hours after ("peak") ingestion of regular doses of lopinavir/ritonavir. Median seminal lopinavir levels were 120.6 ng/mL (range, < 20–1481.8 ng/mL) and 233.1 ng/mL (range, 48.4–1133.4 ng/mL) at trough and peak points, respectively. The corresponding values for ritonavir were 9.2 ng/mL (range, < 5–47 ng/mL) and 17.1 ng/mL (range, 6.6–66.7 ng/mL). The median concentrations of lopinavir and ritonavir in semen were, respectively, 1.9% to 3% and 3.7% to 4.4% of those measured in blood plasma

reduction may translate into a reduced probability of sexual transmission of HIV-1.^{2,3} However, a substantial proportion of individuals continue to shed HIV-1 in semen despite treatment with highly active antiretroviral therapy (HAART).² This issue is of substantial public health importance, because, not only are some of these patients infectious, the virus that they transmit has a high likelihood of being drug-resistant. Antiretroviral drug concentration within the genital tract is one of the factors that may be related with the ability of HAART to suppress HIV-1 in semen.^{4,5} In addition, poor penetration of antiretroviral drugs into the genital compartment, or other sanctuaries, may allow the evolution of resistant mutants that can then be transported into the blood, accelerating virologic failure and reducing the durability of HAART, as suggested by mathematical models.⁶ Previous studies have shown that the distribution of

APÊNDICE C – “The distribution of *ABCB1* polymorphisms among Brazilians: Impact of population admixture.” Enviado para publicação em novembro de 2007 na revista Pharmacogenomics. Autores: **Rita C. E. Estrela**, Fabio S. Ribeiro, Renato S. Carvalho, Sheila P. Gregório, Emannuel Dias-Neto, Cláudio J. Struchiner, Guilherme Suarez-Kurtz.

The distribution of *ABCB1* polymorphisms among Brazilians: Impact of population admixture

Rita C. E Estrela¹, Fábio S. Ribeiro¹, Renato S. Carvalho¹, Sheila P. Gregório²,
Emmanuel Dias-Neto², Cláudio J. Struchiner³ and Guilherme Suarez-Kurtz¹

From ¹Divisão de Farmacologia, Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro, Brazil, ²Laboratório de Neurociências (LIM27) Instituto de Psiquiatria, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil, ³Programa de Computação Científica, Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

Short title: Population structure and *ABCB1* polymorphisms

Correspondence to Dr. Guilherme Suarez-Kurtz, Divisão de Farmacologia, Instituto Nacional de Câncer, Rua André Cavalcanti 37, Rio de Janeiro 21230-050, Brazil.

Tel: +55 21 3233-1310 Fax: +55 21 3233-1340 email: kurtz@inca.gov.br

ABSTRACT

Introduction: Interethnic admixture is a source of cryptic population structure that may lead to spurious genotype-phenotype associations in pharmacogenomic studies. We studied the impact of population stratification on the distribution of *ABCB1* polymorphisms (1236C>T, 2677G>T/A and 3435C>T) among Brazilians, a highly admixed population with Amerindian, European and African ancestral roots.

Methods: Healthy adults (N=320), self-identified as White, Intermediate and Black, were genotyped with a panel of ancestry informative markers, and the individual proportions of African component of ancestry (ACA) were estimated. *ABCB1* genotypes were determined by using the single base extension/termination method. We describe the association between the *ABCB1* polymorphisms and ACA by fitting a linear proportional odds logistic regression model to the data.

Results: The allele and genotype distribution of the *ABCB1* 2677G>T/A and 3435C>T, but not the 1236C>T, SNPs displayed a significant trend for decreasing frequency of the T alleles and TT genotypes from White to Intermediate to Black individuals. The same trend was observed in the frequency of the T/nonG/T haplotype at the 1236, 2677 and 3435 loci. When the population sample was proportioned in quartiles, according to the individual ACA estimates, the frequency of the T allele and TT genotype at each locus declined progressively from the lowest (< 0.25 ACA) to the highest (> 0.75 ACA) quartile. Linear proportional odds logistic regression analysis confirmed that the odds of having the T allele at each locus decreases in a continuous manner with the increase of the ACA, throughout the ACA range (0.13 – 0.94) observed in the overall population sample. A significant association was also detected between the individual ACA estimates and the presence of the T/nonG/T haplotype in the overall population.

Conclusion: Self-identification according to the racial/color categories proposed by the Brazilian Census is insufficient to properly control for population stratification in pharmacogenomic studies of *ABCB1*.

Key words: ancestry informative markers, *ABCB1*, Brazil, proportional odds logistic regression analysis, population admixture, population structure

INTRODUCTION

The human *ABCB1* gene encodes a 170-kDa plasma membrane glycoprotein (P-gp), which is a member of the ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. Pgp is expressed in a wide variety of tissues and modulates the transmembrane transport of many therapeutic drugs, such as digoxin, HIV protease inhibitors, anticonvulsants, immunosuppressants, statins and antineoplastic agents [1]. The *ABCB1* gene is highly polymorphic, displaying over 50 SNPs, several of which occur with minor allele frequencies greater than 5% in at least one continental population. Three exonic SNPs, which are in strong linkage disequilibrium (LD), have been most extensively studied from a pharmacogenetic perspective: two of them (1236C>T and 3435C>T) are silent, whereas the third, 2677G>T/A in exon 21 leads to aminoacid changes (Ala893Ser/Thr). The frequency distribution of these SNPs and of their haplotypes varies largely among ethnically identified populations [2]. Such population diversity, if not recognized and controlled for, may lead to spurious results in gene association studies [3]. In a recent review, Leschziner *et al.* [4] emphasized that the absence of any attempt to detect or prevent stratification was a major limitation of many pharmacogenetic trials of *ABCB1*. These authors recommended that future association studies include control for stratification, either by the use of unlinked genetic markers (“ancestry informative markers” or AIMs) or by limiting the study population to one ethnicity. These recommendations are particularly pertinent to the admixed populations of the Americas, such as African Americans, Hispanics and Brazilians. Because the individual proportions of Amerindian, European and African genetic ancestry vary largely and in a continuous manner within each of these populations [5-11], the use of ethnicity labels may be insufficient to properly control for the impact of stratification on pharmacogenetic traits

[4,12-14]. This prompted us to explore alternative representations of the pharmacogenetic diversity among Brazilians, a tri-hybrid population with African, European and Amerindian (Native American) ancestral roots [6,7]. In the present study we compare the effectiveness of self-reported ethnicity and marker-based biogeographical ancestry classifications in typing the 1236C>T, 2677G>T/A and 3435C>T polymorphisms in *ABCB1*. We show that the frequency of these polymorphisms varies by individual African ancestry within self-reported ethnicity/race groups, and present a logistic regression approach to deal with this variation in pharmacogenetic studies in admixed populations.

METHODS

Study population

The study protocols were approved by the Ethics Committee of the Brazilian National Cancer Institute, and written informed consent was obtained from the 320 participating subjects (192 men, 128 women), who were unrelated, healthy volunteers, living in the city of Rio de Janeiro. The subjects answered a questionnaire about their ancestry and demographics. The pronounced level of admixture in the tri-hybrid Brazilian population, with Amerindian, European and African roots, poses special challenges to ethnic classification (see Discussion). In this study we adopted the classification scheme used in the Brazilian Census [101], which relies on self-perception of skin color. Accordingly, the individuals were distributed in three groups: “Branco” (White, n=106; 33.1%), “Pardo”

(meaning Brown, here denoted as Intermediate, $n = 114$; 35.6%) and “Preto” (Black, $n = 100$; 31.3%).

ABCB1 genotyping, linkage disequilibrium and haplotype analyses

A single blood sample (3 ml) was drawn from each subject and DNA was extracted from peripheral leukocytes using the GFX™ Genomic Blood DNA Purification Kit (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA) following the manufacturer's instructions. *ABCB1* was genotyped by the single base extension/termination method using the SNaPshot multiplex system from Applied Biosystems (Foster City, CA, USA). Exonic fragments containing SNPs 1236C>T, 2677G>T/A and 3435C>T, were amplified in a multiplex PCR using primers (Table 1A). The SNPs were subsequently genotyped using internal primers, whose 3' end was just adjacent to the polymorphic bases. Single base extension of multiple primers was performed by a cycle sequencing reaction with fluorescently labeled dideoxynucleotide triphosphates. Due to the absence of deoxynucleotides, only a single base is added to the 3' end of the oligos. A tail of (GACT) n was added to the primers (Table 1B) to avoid overlap among the final SNaPshot products, which were detected with an ABI 3100 capillary electrophoresis instrument and the results were analyzed using GeneScan (Applied Biosystems).

Linkage disequilibrium and haplotype analyses

For LD analyses we used the VG2 and GENEPOP software [102, 103]. Pairwise LD between loci was assessed by D' and rho square (r^2). The *ABCB1* haplotypes were statistically inferred by the HAPLO.STAT software, version 1.3 [15, 104]. This software

attributes a posterior probability value for the diplotype configuration for each individual, based on estimated haplotype frequencies. Diplotypes were inferred with probabilities > 0.96, for all except 33 individuals.

Statistical analysis

Deviations from Hardy-Weinberg equilibrium were assessed by the goodness-of-fit χ^2 test. Allele, genotype and haplotype frequencies were compared using the χ^2 test or, when appropriate, the Fisher exact test. Trends in frequency variation across groups were assessed by the χ^2 test for trends in proportion. Statistical analysis were performed online [1005] or using the package HAPLO.STAT implemented in R [16].

Population structure analysis

All individuals recruited for the current investigation had been enrolled in previous studies from our group [17,18], in which they were genotyped for a set of 40 biallelic short insertion/deletion polymorphisms (indels), validated as ancestry informative markers (AIMs) [19]. The population clustering algorithm *Structure* version 2.1 [20, 106] was used to analyze the data. This software uses multilocal genotypes to allocate ancestry proportions of individuals to different clusters (populations). The software defines "K" clusters (where K is provided by the user), each of them being characterized by a set of allelic frequencies for each locus. The individuals are grouped (probabilistically) on the basis of their genotypes. Analysis of the AIMs data for the 320 participants of the present study with the *Structure* software, without prior population information resulted in a posterior probability of 1 for K = 2, thus indicating the existence of only two significant clusters differing in allele

frequencies[17,18]. The average proportion of individual cluster 2 ancestry among the self-identified White, Intermediate and Black subjects enrolled in this study was, respectively, 0.330, 0.491 and 0.645. From this trend of increasing cluster 2 frequency across the three groups we inferred that cluster 2 is an estimate of the "African component of ancestry" (ACA), and cluster 1 represents the European component. The lack of a significant cluster for the third ancestral root of the Brazilian population, namely the Amerindians, is explained by the fact that the Bayesian K-means algorithm used by the *Structure* software ascertains clusters that best explain differences between the samples, and therefore will miss ancestral contributions that are more or less uniformly distributed, such as the Amerindian one in the present sample of urban Brazilians [17,18].

Logistic regression analysis

To describe the association between the *ABCB1* polymorphisms and ancestry estimated by the AIMs indel set, we fitted a proportional odds linear logistic regression. This method, described by Harrell [21] is implemented as function "lrm" available in the R package "Design" [16]. ANOVA tables describe the Wald statistics for testing the model components [21].

RESULTS

Allele and genotype distribution according to self-categorization

The distribution of the *ABCB1* 1236C>T, 2677G>T/A and 3435 C>T polymorphisms in each self-identified group is shown in Table 2. The genotype distribution did not deviate from Hardy-Weinberg proportions, and the 1236C>T allele and genotype distribution did not

differ significantly across the three population groups. By contrast, significant differences were observed in the allele and genotype frequency distribution of the 2677G>T/A ($P = 0.0001$ and 0.0004) and the 3435C>T ($P = 0.004$ and 0.005) polymorphisms. We detected significant trends for decreasing frequency of the 2677G T allele, 2677G TT genotype, 3435T allele ($P < 0.0001$) and 3435TT genotype ($P = 0.006$) from White, to Intermediate to Black individuals. Pair-wise comparisons among the three groups revealed significant differences between White and Black with respect to allele and genotype distribution at loci 2677 ($P < 0.0001$) and 3435 ($P = 0.012$ for allele and $P = 0.002$ for genotype). The Black and Intermediate groups differed significantly in allele and genotype distribution for the 2677C>T polymorphism ($P = 0.02$ and $P = 0.04$). The White and Intermediate groups differed in allele and genotype frequency at 3435 ($P = 0.02$ for both) and in allele ($P = 0.05$), but not in genotype distribution of the 2677G>T/A polymorphism.

Linkage disequilibrium and haplotype distribution according to self-categorization

Analysis by the VG2 software showed that SNPs 1236C>T, 2677G>T/A and 3435C>T are in linked disequilibrium with each other in the three population groups (Table 3). For haplotype analysis, alleles 2677A ($< 2\%$ in the overall study population) and 2677T were grouped as “nonG”. Based on the three exonic sites examined, eight haplotypes were detected (Table 4), of which one (T/G/T) was not present in self-reported White subjects and another (C/T/T) was not detected in Blacks. Four haplotypes (C/G/C, T/nonG/T, C/G/T and T/G/C) accounted for 91 - 97% of the genetic variability in the three population groups. The haplotype distribution among these groups approached statistical significance ($P = 0.06$, χ^2 test). Pair-wise comparisons revealed significant differences between Black and White

subjects ($P = 0.013$) but no difference between Intermediate and either White or Black subjects. T/nonG/T was the most common variant haplotype in all groups, but its frequency decreased significantly ($P = 0.001$, χ^2 test for trends in proportion) from White to Intermediate to Black individuals (Table 4).

Distribution of ABCB1 polymorphisms according to ancestry

The extensive admixture of the Brazilian population results in a poor correlation between self-identified (color) categorization and genetic ancestry [7,14]. This prompted us to explore alternative representations of the diversity of *ABCB1* polymorphisms in our study sample. To this effect, we took advantage of the fact that the study participants had been previously typed with a validated panel of AIMs, which provided estimates of the individual proportions of the Amerindian, European and sub-Saharan African ancestry (details in [17, 18]). From these data, we derived a parameter representing the African component of ancestry, or ACA (Methods). The individual ACA proportions in overall study population study ranged from 0.13 to 0.94, with mean (SD) values of 0.330 (0.120), 0.491 (0.151) and 0.645 (0.173) in self-reported White, Intermediate and Black subjects, respectively. Despite extensive overlap in individual ACA values among the three groups, each group differed significantly from the other two with $P < 0.0001$ (ANOVA). Using the ACA values, we initially proportioned the overall population sample in four quartiles (<0.25; 0.25 – 0.50; 0.50 – 0.75; >0.75). The χ^2 test for trend in proportions disclosed significant decrease in the frequency of the T allele and TT genotype at each locus, with the increase in ACA range (Figure 1). Linear logistic regression modeling confirmed that the odds of having the T allele at each of the 1236, 2677 or 3435 loci decreases as the ACA increases, throughout the

range of ACA's (0.13 – 0.94) estimated for the study population. The association between ACA and the odds of being a carrier of the T allele at each *ABCB1* locus was highly significant ($P = 0.008$ for 1236T, and $P < 0.0001$ for 2677T and 3435T, Wald statistics).

As a third representation of the impact of population admixture, we analyzed the influence of the African ancestry on the distribution of the *ABCB1* haplotypes. Estimates based on the HAPLO STAT software [15], using only the individual haplotype pairs with a posterior probability >0.91 ($N = 301$ individuals), disclosed significant association of the ACA with the variant haplotypes T/nonG/T and TGT (Table 5).

Finally, we examined whether the distribution of the T/nonG/T haplotype was associated with individual ACA values, within each self-reported “color” group (Table 6). Within the White group, there was no difference in ACA estimates between individuals having zero, 1 or 2 copies of the T/nonG/T haplotype. By contrast, within the Intermediate group the ACA decreased as the copy number of the T/nonG/T haplotype increased ($P = 0.028$, ANOVA) and within the Black group, carriers of the T/nonG/T haplotype had a significant lower ACA than non-carriers ($P < 0.0001$, t test).

DISCUSSION

This is the first study of the impact of population structure on the distribution of the *ABCB1* 1236C>T, 2677G>T/A and 3435C>T polymorphisms among Brazilians. Although Brazilians share three continental ancestral roots, namely Amerindian (Native American), European and African [6,7] the structure of the population sample of this study is best explained by admixture of only two clusters, representing the proportions of European and

African ancestry, respectively [17,18]. Reasons for the lack of a significant Amerindian cluster include the properties of the *Structure* algorithm (Methods) and the relatively small proportion of Amerindian ancestry in the urban population of Rio de Janeiro, a large metropolis in the southeast region of Brazil. Despite substantial overlap in the individual proportions of African ancestry (ACA) among the self-identified White, Intermediate and Black participants, the distribution of the *ABCB1* 2677G>T/A and 3435C>T polymorphisms differed significantly across the three groups. The observed trends for decreasing frequency of the T allele and TT genotype at the 2677 and 3435 loci, and of the T/nonG/T haplotype from self-identified White to Intermediate and to Black Brazilians are consistent with the lower prevalence of these variants in sub-Saharan Africans, compared to Europeans [2,22,23]. However, it is noteworthy that the allele and haplotype distribution at these loci in the Black Brazilian group differs significantly from the data available for sub-Saharan Beninese, Ghanian and Kenian populations (Table 7). These differences reflect the higher frequency of the variant T allele at the three *ABCB1* loci in Black Brazilians, relative to the sub-Saharan populations. We ascribe these differences to the substantial European contribution to the genetic pool of Black Brazilians, over five centuries of admixture [6,7]. African Americans are another admixed population with African and European roots, with individual proportion of African ancestry ranging from <5% to >95% [5,8,10,11]. The frequency distribution of the 1236C>T, 2677G>T/A and 3435C>T polymorphisms in African Americans differs significantly from our data for self-reported Black Brazilians (supplementary Table 2). Of notice, the T/nonG/T haplotype was twice as frequent in Black Brazilians, consistent with the higher average proportion of European contribution to their genetic pool, compared to African-Americans [14].

Because the Portuguese represent the most important source of migrants to Brazil, we compared our data on White Brazilians to published data on Portuguese (Table 7). No differences were disclosed with respect to the 1236C>T and 2677G>T/A polymorphisms. However, allele 3435T occurs at a significantly higher frequency in Portuguese [22] than in the White participants of our study (0.57 vs. 0.46, $P = 0.049$). We mention that the frequency observed in the latter group is in excellent agreement with published data for “European-derived” Brazilians, recruited at two other different locations [23,24]. We suggest that the distinct African contribution to the genetic pool of White Brazilians – confirmed by the ACA estimates in the present study – is one possible cause for the low frequency of the 3435T allele in White Brazilians, compared to the Portuguese.

The discrepancies noted above in relation to *ABCB1* polymorphisms in White Brazilians vs. Europeans and Black Brazilians vs. African populations are consistent with the evidence that, regardless of their skin color, the overwhelming majority of Brazilians have significant degrees of African and European ancestry. In addition, a sizeable proportion of Brazilians, especially from the Northern (Amazonian) region have a significant degree of Amerindian ancestry [7,14,26]. It follows that skin color correlates poorly with genetic ancestry and, by extension, represents poorly the pharmacogenetic diversity in Brazilians. We propose that estimates of genetic ancestry provided by AIMs allow more realistic representations of such diversity, and verified this proposal with respect to *ABCB1* polymorphism, using different approaches. First, we showed that the frequency of the variant T allele and TT genotype at loci 1236, 2677 and 3435 decreases from the lowest to the highest ACA quartile (Figure 1), irrespective of self-identified categorization. A logistic regression model approach confirmed that the odds of having the T allele at each polymorphic loci decreases as the

individual ACA proportion increases, throughout the overall range of ACA's observed in the study population. Accordingly, haplotype analysis disclosed a significant inverse relationship between the individual ACA proportions and the frequency of the T/nonG/T haplotype. Finally, we showed that within the Intermediate and the Black self-identified groups, African ancestry is lower in carriers, than in non-carriers of T/nonG/T, the most common variant *ABCB1* haplotype among Brazilians. Collectively, these results support the notion that admixture must be dealt with as a continuous variable, which may be assessed by logistic regression modeling. Self-reported ethnic categorization based on skin color – as recommended by the Brazilian Census - does not represent adequately the distribution of polymorphisms in *ABCB1* in the admixed Brazilian population. Further studies may extend this conclusion to other admixed populations and /or pharmacogenetic targets.

HIGHLIGHTS

- *The allele, genotype and haplotype frequency of polymorphisms in ABCB1 was determined in 320 healthy Brazilians, self-identified as White, Black and Intermediate.*
- *The distribution of the ABCB1 2677G>T/A and 3435C>T (but not the 1236C>T) SNPs displayed significant trends for decreasing frequency of the T alleles and TT genotypes from White to Intermediate to Black individuals. The same trend was observed in the frequency of the T/nonG/T haplotype at the 1236, 2677 and 3435 loci.*
- *A set of insertion-deletion polymorphisms, validated as ancestry informative markers (AIMs), and the Structure software were used to estimate of the individual proportion of African ancestry (ACA).*
- *Proportioning the population sample in quartiles according to the individual ACA proportions, revealed that the frequency of the T allele and TT genotype at the 1236, 2677 and 3435 loci declined progressively from the lowest (< 0.25 ACA) to the highest (> 0.75 ACA) quartile.*
- *Linear proportional odds logistic regression analysis confirmed that the odds of having the T allele at each ABCB1 locus examined, decreases in a continuous manner*

with the increase of the ACA, throughout the ACA range (0.13 – 0.94) observed in the overall population sample.

- The present data supports the contention that admixture must be dealt with as a continuous variable, rather than proportioned in arbitrary sub-categories for the convenience of data quantification and analysis.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) and Swiss Bridge Foundation.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declared no conflict of interest.

BIBLIOGRAPHY

1. Chinn LW, Kroetz DL. ABCB1 pharmacogenetics: progress, pitfalls, and promise. *Clin Pharmacol Ther* 81(2), 265-269 (2007).
2. Kroetz DL, Pauli-Magnus C, Hodges LM SJ *et al.* Sequence diversity and haplotype structure in the human ABCB1 (MDR1, multidrug resistance transporter) gene. *Pharmacogenetics* 13(8), 481-494 (2003).

**** An overview of *ABCB1* polymorphisms and haplotypes**

3. Freedman ML, Reich D, Penney KL *et al.* Assessing the impact of population stratification on genetic association studies. *Nat Genet* 36(4), 388-393 (2004).
 4. Leschziner GD, Andrew T, Pirmohamed M, Johnson MR. ABCB1 genotype and PGP expression, function and therapeutic drug response: a critical review and recommendations for future research. *Pharmacogenomics J* 7(3), 154-179 (2007).
- ** A critical review of the clinical significance of ABCB1 polymorphisms**
5. Parra EJ, Kittles RA, Shriver MD. Implications of correlations between skin color and genetic ancestry for biomedical research. *Nat Genet* 36(11), 54-60 (2004).
 6. Salzano FM, Bortolini MC. The evolution and genetics of Latin American populations. Cambridge University Press, Cambridge, UK. (2002).
- * An overview of population genetics in Latin America**
7. Parra FC, Amado RC, Lambertucci JR, Rocha J, Antunes CM, Pena SDJ. Color and genomic ancestry in Brazilians. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(1), 177-182 (2003).
 8. Parra EJ. Admixture In North America. In: *Pharmacogenomics in Admixed Populations*. Suarez-Kurtz G (Ed.), Landes Bioscience, Austin, USA, 28-46 (2007). Available at <http://www.eurekah.com/chapter/3125> [Accessed 25 September, 2007].
- * A recent, comprehensive review of admixture in North American populations**
9. Salari K, Choudhry S, Tang H *et al.* Genetic admixture and asthma-related phenotypes in Mexican American and Puerto Rican asthmatics. *Genet Epidemiol* 29(1), 76-86 (2005).
 10. Sinha M, Larkin EK, Elston RC *et al.* Self-reported race and genetic admixture. *N Engl J Med* 354(4), 421-422 (2006).
 11. Reiner AP, Carlson CS, Ziv E, Iribarren C, Jaquish CE, Nickerson DA. Genetic ancestry, population sub-structure, and cardiovascular disease-related traits among

- African-American participants in the CARDIA Study. *Hum Genet* 121(5), 565-575 (2007).
12. Suarez-Kurtz, G. Pharmacogenetics in admixed populations. *Trends Pharmacol Sci* 26(4), 196-201 (2005).
 13. Barnholtz-Sloan JS, Chakraborty R, Sellers TA, Schwartz AG. Examining population stratification via individual ancestry versus self-reported race. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14(6), 1545-1551 (2005).
 14. Suarez-Kurtz G, Pena SDJ. Pharmacogenomics in the Americas: Impact of genetic admixture. *Curr Drug Targets* 7(12), 1649-1658 (2006).
- ** A recent analysis of the impact of genetic admixture in the peoples of the Americas**
15. Schaid DJ, Rowland CM, Tines DE, Jacobson RM, Poland GA. Score tests for association between traits and haplotypes when linkage phase is ambiguous. *Am J Hum Genet* 70(2), 425-434 (2002).
 16. R Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria (2005).
 17. Suarez-Kurtz G, Vargens DD, Struchiner CJ, Bastos-Rodrigues, Pena SDJ. Self-reported skin color, genomic ancestry and the distribution of *GST* polymorphisms. *Pharmacogenetics and genomics* 17(9), 765-772 (2007).
- ** Development of regression models to analyze the impact of population admixture on the distribution of pharmacogenetic polymorphisms**
18. Suarez-Kurtz G., Perini JA, Bastos-Rodrigues L, Pena SDJ, Struchiner CJ. Impact of population admixture on the distribution of the *CYP3A5*3* polymorphism. *Pharmacogenomics* (2007, in press)

* **Validation of regression models to analyze the impact of population admixture on the distribution of the CYP3A5*3 polymorphism**

19. Bastos-Rodrigues L, Pimenta JR, Pena SDJ. The genetic structure of human populations studied through short insertion-deletion polymorphisms. *Ann Human Genet* 70(5), 658-665 (2006).

* **Validation of a panel of insertion-deletion polymorphisms as ancestry-informative markers**

20. Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155(2), 945-959 (2000).
21. Harrell FE. Regression modeling strategies: with applications to linear models, logistic regression, and survival analysis. New York: Springer (2001).
22. Ameyaw MM, Regateiro F, Li T *et al*. MDR1 pharmacogenetics: frequency of the C3435T mutation in exon 26 is significantly influenced by ethnicity. *Pharmacogenetics* 11(3), 217-221 (2001).
23. Allabi AC, Horsmans Y, Issaoui B, Gala JL. Single nucleotide polymorphisms of ABCB1 (MDR1) gene and distinct haplotype profile in a West Black African population. *Eur J Clin Pharmacol* 61(12), 97-102 (2005).
24. Fiegenbaum M, da Silveira FR, Van der Sand CR *et al*. The role of common variants of ABCB1, CYP3A4, and CYP3A5 genes in lipid-lowering efficacy and safety of simvastatin treatment. *Clin Pharmacol Ther* 78(5), 551-558 (2005).
25. Rodrigues AC, Rebecchi IM, Bertolami MC, Faludi AA, Hirata MH, Hirata RD. High baseline serum total and LDL cholesterol levels are associated with MDR1 haplotypes

in Brazilian hypercholesterolemic individuals of European descent. *Braz J Med Biol Res* 38(7), 1389-1397 (2005).

26. Suarez-Kurtz G, Pena SDJ. Pharmacogenetics in the Brazilian population. In: *Pharmacogenomics in Admixed Populations*. Suarez-Kurtz G (Ed.), Landes Bioscience, Austin, USA, 75-98 (2007). Available at: <http://www.eurekah.com/chapter/3157> [Accessed 25 September, 2007].
- * **A recent, comprehensive review of pharmacogenomics in the Brazilian population**
27. Wadelius M, Sörlin K, Wallerman O *et al.* Warfarin sensitivity related to CYP2C9, CYP3A5, ABCB1 (MDR1) and other factors. *Pharmacogenomics J* 4(1), 40-48 (2004).
28. Oliveira E, Marsh S, van Booven DJ, Amorim A, MJ Prata, HL McLeod. Pharmacogenetically relevant polymorphisms in Portugal. *Pharmacogenomics* 2007 (in press).

WEBSITES

101. <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/censo2000/>],
102. <http://pga.gs.washington.edu/VG2.html>
103. <http://department.obg.cuhk.edu.hk/>
104. http://mayoresearch.mayo.edu/mayo/research/schaid_lab/software.cfm
105. <http://pritch.bsd.uchicago.edu/software.html>
- 106 http://genepop.curtin.edu.au/genepop_op2.html

Table 1 Detection of *ABCB1* polymorphisms by SNaPshot multiplex

A PCR primers for amplification of <i>ABCB1</i> fragments ^a			
<i>Exon</i>	<i>Forward primer</i>	<i>Reverse primer</i>	
12	TATTCGAAGAGTGGGCACAA	CTGATCACCGCAGGGTCTA	
21	AGCAAATCTTGGGACAGGAA	AAGATTGCTTTGAGGAATGGTT	
26	GAGCCCATCCTGTTTGACTG	CATGCTCCCAGGCTGTTTAT	
B Internal SNaPshot primers for <i>ABCB1</i> genotyping			
<i>Exon</i>	<i>Position</i>	<i>Primer^b</i>	<i>Primer length</i>
12	1236C>T	Forward GTCAGTCAGTCAGTCGTCCTGGTAGATCTT GAAGGG	36
21	2677G>T/A	Reverse GACTGACTGACTGACTGACTAGTTTGACTCACCTTC CCAG	40
26	3435C>T	Reverse GACTGACTGACTGACTGACTGACTGACTGACTGCCTCCTTTGCTGCCCTCAC	52

^a cf. Wadelius *et al.* [27]^b Tail in bold

Table 2 Allele and genotype distribution of *ABCB1* polymorphisms in self-identified Brazilians^a

<i>Polymorphisms</i>	<i>Genotypes</i>					<i>Alleles</i>		
1236C>T	CC	CT	TT			C	T	
White	0.40 (0.31-0.49)	0.39 (0.30-0.48)	0.21 (0.15-0.30)			0.59 (0.53-0.65)	0.41 (0.35-0.47)	
Intermediate	0.47 (0.37-0.57)	0.38 (0.28-0.48)	0.16 (0.09-0.24)			0.66 (0.58-0.72)	0.34 (0.28-0.42)	
Black	0.46 (0.37-0.57)	0.41 (0.31-0.51)	0.13 (0.07-0.21)			0.67 (0.60-0.74)	0.33 (0.26-0.40)	
2677G>T/A	GG	GT	GA	TT	TA	G	T	A
White	0.40 (0.32-0.50)	0.40 (0.31-0.49)	0.02 (0.002-0.06)	0.18 (0.12-0.27)	0.00	0.61 (0.55-0.67)	0.38 (0.32-0.45)	0.01 (0.001-0.03)
Intermediate	0.50 (0.40-0.60)	0.38 (0.28-0.48)	0.02 (0.003-0.07)	0.08 (0.04-0.16)	0.02 (0.003-0.07)	0.70 (0.63-0.76)	0.28 (0.22-0.35)	0.02 (0.006-0.05)
Black	0.65 (0.54-0.74)	0.33 (0.24-0.44)	0.00	0.01 (0.0003-0.06)	0.01 (0.0003-0.06)	0.81 (0.75-0.87)	0.18 (0.13-0.24)	0.01 (0.0001-0.03)
3435C>T	CC	CT	TT			C	T	
White	0.32 (0.24-0.41)	0.45 (0.36-0.54)	0.23 (0.12-0.26)			0.55 (0.48-0.61)	0.45 (0.39-0.52)	
Intermediate	0.40 (0.30-0.50)	0.52 (0.42-0.62)	0.08 (0.04-0.16)			0.66 (0.58-0.72)	0.34 (0.28-0.42)	
Black	0.50 (0.39-0.60)	0.41 (0.31-0.52)	0.9 (0.04-0.17)			0.69 (0.63-0.76)	0.31 (0.24-0.37)	

^aN=320, 106 White, 114 Intermediate, 100 Black

Table 3 Pair-wise linkage disequilibrium of *ABCB1* polymorphisms

<i>Group (n)</i>	<i>Pair-wise comparison^a</i>	<i> D¹</i>	<i>rho²</i>
White (106)	1236 vs. 2677	0.89	0.74
	1236 vs. 3435	0.74	0.45
	2677 vs. 3435	0.90	0.61
Intermediate (114)	1236 vs. 2677	0.68	0.38
	1236 vs. 3435	0.53	0.27
	2677 vs. 3435	0.75	0.45
Black (100)	1236 vs. 2677	0.89	0.35
	1236 vs. 3435	0.55	0.27
	2677 vs. 3435	0.85	0.37

^a **P < 0.0001 for all pair-wise comparisons; Fisher exact test, assessed online using the GENEPOP software, available at [103].**

Table 4 *ABCB1* haplotype frequency in self-identified Brazilians

<i>Haplotype</i>	<i>Group (N)</i>		
	<i>White (106)</i>	<i>Intermediate (114)</i>	<i>Black (100)</i>
C/G/C	0.484	0.554	0.589
C/G/T	0.085	0.065	0.074
C/nonG/C	0.004	0.011	0.005
C/nonG/T	0.016	0.032	0.000
TGC	0.044	0.070	0.100
TGT	0.000	0.032	0.063
T/nonG/C	0.008	0.016	0.011
T/nonG/T	0.359	0.217	0.158

Table 5 Association of the African component of ancestry (ACA) with the distribution of the *ABCB1* haplotypes in the overall study population

Haplotypes ^a	Frequency ^b	Hap-Score ^c	P ^d
T/nonG/T	0.221	-5.406	<0.0001
C/nonG/T	0.022	-1.002	0.316
C/T/C	0.011	-0.888	0.374
G/C/T	0.083	0.388	0.697
T/nonG/C	0.017	0.408	0.683
T/G/C	0.078	1.568	0.117
C/G/C	0.535	2.810	0.005
TGT	0.029	2.949	0.003

^a Haplotype analysis by HAPLO.STAT

^b Haplotype frequency in the study population, based on diplotypes with an inferred posterior probability >0.91 (N=301 individuals).

^c Haplotype-specific scores to test the association between ACA and the haplotype

^d Asymptotic chi-square (1 df) p-value, calculated from the square of the score statistic.

Table 6 Proportion of the African component of ancestry (ACA) in each color group according to number of copies of haplotype T/nonG/T

<i>Group</i>	<i>T/nonG/T copies</i>			<i>P</i>
	<i>0</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	
White	0.304 (0.122)	0.302 (0.122)	0.308 (0.124)	0.98 ^a
Intermediate	0.516 (0.154)	0.451 (0.147)	0.367 (0.152)	0.028 ^a
Black	0.684 (0.153)	0.539 (0.158)	0.582 (N=1)	0.0008 ^b

Data are expressed as mean (S.D.) of the individual ACA proportions

^a *P* values for one-way ANOVA

^b *P* value for *t* test between zero and 1 copy of the T/nonG/T haplotype

Table 7. Distribution of *ABCB1* polymorphisms in Portuguese, Sub-Saharan Africans and African-Americans.

<i>Group</i>	<i>Allele Frequency</i>				<i>Refs.</i>
	<i>1236T</i>	<i>2677T</i>	<i>2677A</i>	<i>3435T</i>	
Beninese	0.15 ^a	0.009 ^b	0.00	0.140 ^a	23
Ghanian				0.170 ^a	22
Kenian				0.170 ^a	22
African American	0.209 ^c	0.100 ^d	0.0005	0.202 ^d	2
Portuguese				0.570 ^e	22
Portuguese	0.460	0.419	0.021		28

	<i>Haplotype Frequency</i>					
	<i>CGC</i>	<i>TGT</i>	<i>CGT</i>	<i>TGC</i>	<i>TTT</i>	
Beninese ^f	0.793	0.075	0.138	0.062	0.045	23
African American ^g	0.726	0.09	0.035	0.04	0.075	2

^a $P < 0.0001$ vs. Black Brazilians

^b $P < 0.01$ vs. Black Brazilians

^c $P < 0.001$ vs. Black Brazilians

^d $P < 0.03$ vs. Black Brazilians

^e $P < 0.05$ vs. White Brazilians

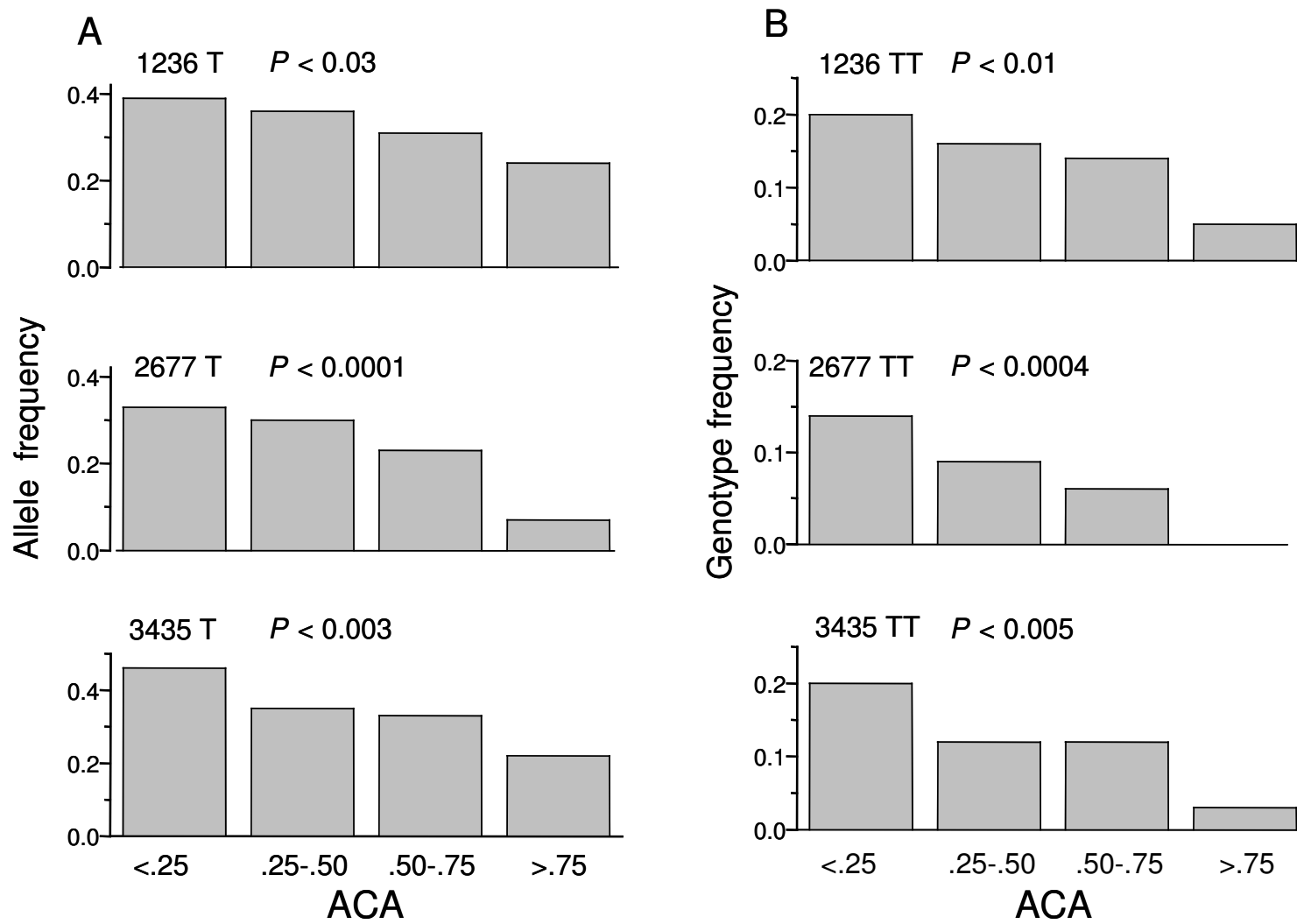
^f $P < 0.0001$ vs. Black Brazilians

^g $P < 0.002$ vs. Black Brazilians

Legend for Figure 1.

Figure 1 Frequency distribution histograms of the T allele (A) and TT genotype (B) at the 1236, 2677 and 3435 loci of the *ABCB1* gene, according to the African component of ancestry (ACA) in the overall population sample (N = 320). The *P* values are for the χ^2 test for trend in proportions among the four ACA quartiles.

Figure 1



APÊNDICE D – “CYP3A5 Genotype has no Impact on Plasma Concentrations of Lopinavir and Ritonavir in HIV-infected Subjects” enviado para publicação na revista Clinical Pharmacology Therapeutics em setembro de 2007. Autores: **Rita C. E. Estrela**, Ana B. Santoro, Paulo F. Barroso, Mary Tuyama, Guilherme Suarez-Kurtz.

CYP3A5 Genotype has no Impact on Plasma Trough Concentrations of Lopinavir and Ritonavir in HIV-infected Subjects

RCE Estrela¹, AB Santoro¹, PF Barroso², M Tuyama² and G Suarez-Kurtz¹

¹Divisão de Farmacologia, Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro, Brazil; ² Infectious Diseases Service, Department of Preventive Medicine, Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, School of Medicine, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brazil

Correspondence: Guilherme Suarez-Kurtz, Divisão de Farmacologia, Instituto Nacional de Câncer, Rua André Cavalcanti 37, Rio de Janeiro 21230-050, Brazil.

Tel: +55 21 3233-1310 Fax: +55 21 3233-1340 email: kurtz@inca.gov.br

Key words: *CYP3A5*, pharmacogenetics, Brazilian, protease inhibitors, lopinavir, ritonavir

***CYP3A5* genotype has no impact on the trough plasma concentrations of lopinavir and ritonavir in HIV-infected individuals on stable highly active antiretroviral therapy (HAART). This is ascribed to a drug interaction, such that ritonavir by inhibiting *CYP3A* activity, may occlude the pharmacokinetic consequences of functional polymorphisms in the *CYP3A5* gene. In the clinical setting, where lopinavir and ritonavir are always combined, *CYP3A5* genotype is of no consequence on these drugs' trough plasma concentrations.**

RESULTS

The “trough” concentrations of lopinavir (median 6351 ng/mL, 25% percentile 3840 ng/mL, 75% percentile 8695 ng/ml) and ritonavir (262, 154, 425 ng/mL respectively) in plasma of 98 HIV-infected individuals were in good agreement with previous data from our group² and others.^{3,4} The frequencies of *CYP3A5**3 and *CYP3A5**6 in the study sample were 0.67 (95%CI 0.61-0.74) and 0.05 (0.02-0.08), respectively. Assuming that alleles *CYP3A5**3 and *6 do not occur in the same DNA strand,⁵ the study participants were genotyped as *1/*1 (n=11), *1/*3 (32), *1/*6 (1), *3/*3 (47); *3/*6 (6), *6/*6 (1). The distribution of the trough concentrations of lopinavir and ritonavir in plasma among individuals having two (n=11), one (33) or zero (54) *CYP3A5* functional alleles, is plotted in Figure 1. The overlapping of the plasma trough concentrations of each protease inhibitor (PI), among the three groups is evident and no statistically significant inter-group difference was detected for either lopinavir or ritonavir (Kruskal-Wallis test).

DISCUSSION

The purpose of this study was to examine whether the observed impact of *CYP3A5* genotype on the disposition of saquinavir, administered as a single dose and with no ritonavir boosting to Tanzanian healthy individuals¹ prevails under a natural clinical setting. When included in HAART regimens, saquinavir is administered in repeated doses over long periods of time, and in combination with a ritonavir booster. Our data indicate that *CYP3A5**3 and *CYP3A5**6 polymorphisms do not affect the trough plasma concentration of lopinavir and ritonavir in HIV-infected males on a stable HAART regimen. The apparent discrepancy between this conclusion and the results reported by Josephson *et al.*¹ most likely reflect different experimental conditions in the two studies, pertaining to ritonavir boosting, different PIs, single versus stable dosing, pharmacokinetic parameters examined and study populations. We believe that ritonavir boosting is critical for the lack of impact of *CYP3A5* polymorphism in our study. By virtue of its inhibitory effects on CYP3A activity,^{6,7,8} ritonavir may occlude the pharmacokinetic consequences of functional polymorphisms in the *CYP3A5* gene, in such a manner that through a drug interaction, ritonavir would turn a ‘normal metabolizer’ polymorphism genotype into that of a poor metabolizer phenotype. Lopinavir may interact synergistically with ritonavir in this regard, in view of the evidence that lopinavir inhibits CYP3A5 activity in vitro.^{7,8} Of note, both ritonavir and lopinavir, but not saquinavir, were reported to cause a time- and concentration-dependent decrease of CYP3A5 activity in vitro.⁸ Ernst *et al.* ascribed this pattern to mechanism-based inactivation and suggested that in vivo, this might be occurring, in addition to the PI-induced reversible inhibition of CYP3A5 activity.⁸ Accordingly, the lack of mechanism-based inactivation with saquinavir might be relevant to the results reported by Josephson *et al.*¹ Nevertheless, because low-dose ritonavir is a potent booster of saquinavir, it is reasonable to extend our conclusion of no clinical

relevance of *CYP3A5* polymorphism to the pharmacokinetics of saquinavir, when this PI is administered in combination with ritonavir as part of HAART regimens.

The possibility that differences in study population (healthy Tanzanians selected on the basis of *CYP3A5* genotypes versus HIV-infected Brazilians under stable HAART) may have contributed to the different outcome of the two studies cannot be excluded. The participants of our study were receiving other drugs as part of the HAART regimen, and drug-drug or drug-gene interactions, are possible confounding factors. Furthermore, the distribution of *CYP3A5* polymorphisms varies markedly among continental populations.⁹ In this regard it is relevant that the Brazilian population is extensively admixed, due to five centuries of interethnic crosses between peoples from three continents, namely Europeans, Africans and Amerindians. We have recently shown that, among Brazilians, the frequency of the *CYP3A5**3 allele decreases continuously with the increase in estimated individual sub-Saharan African ancestry, irrespective of self-reported “color” identification.¹⁰ This supports the notion¹¹ that studies in the admixed Brazilian population are pertinent to sub-Saharan African populations, such as the Tanzanians studied by Josephson *et al.*¹

Together, this latter study and the present Communication describe complementary steps towards the implementation of pharmacogenetics in clinical practice, namely the discovery of association(s) between genetic polymorphisms and pharmacological traits under specific experimental conditions, followed by examination of the impact of the association(s) in the targeted patient populations, studied in the relevant clinical setting.

METHODS

The enrolled participants were 98 HIV-infected Brazilian adult males (median age: 42.5 years old, range: 28 - 68 years old) on a stable lopinavir/ritonavir containing HAART for

at least 4 weeks. The study protocol and written consent form were approved by the IRB of Hospital Universitário Clementino Fraga Filho. Patients self-identified according to the criteria adopted by the Brazilian Census (<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/censo2000/>) as White (n=45), “Pardo” (meaning “Brown”, here denoted as Intermediate, n=43), Black (n=10) and Amerindian (n=1). Lopinavir and ritonavir soft-gel capsules (Kaletra®, Abbott Laboratórios do Brasil Ltda., São Paulo, Brazil) were administered at standard doses of 400 mg and 100 mg, respectively, twice daily in association with other antiretroviral agents as part of their drug regimen. A single blood sample collected from each individual 30 to 5 minutes before the scheduled morning dose was used for quantification of lopinavir and ritonavir concentrations in plasma by a validated LC/MS/MS procedure² and for genotyping for the non-functional *CYP3A5**3 and *CYP3A5**6 alleles by PCR-RFLP.¹² These two variants account for >95% of the identified non-functional *CYP3A5* alleles in all populations thus far examined.⁹ The primary end point of the study was the difference in the achieved plasma trough lopinavir and ritonavir concentrations in individuals with two, one, or no functionally active alleles. Kruskal-Wallis testing was used to examine differences in lopinavir and ritonavir trough concentrations among the genotypes. A p-value < 0.05 was accepted as significant. We used our previous data² for the trough plasma concentrations of lopinavir and ritonavir in HIV+ Brazilians under stable treatment with Kaletra®, to calculate the statistical power of the present study to detect a 35% and a 50% difference in the mean trough plasma concentrations of both drugs, between individuals having two (n = 11) or no functional *CYP3A5* alleles (n = 54). At a two-sided α level of 0.05, the calculated statistical power was 0.80 (35% difference) and 0.98 (50% difference) for lopinavir. The corresponding power values for ritonavir were 0.62 and 0.86.

ACKNOWLEDGMENTS

Research supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) and Swiss Bridge Foundation. Abbott Laboratories (Chicago, Ill) provided samples of lopinavir, ritonavir and A-86093.0 (used as internal standard) for the bioanalytical study.

CONFLICT OF INTEREST.

None to declare.

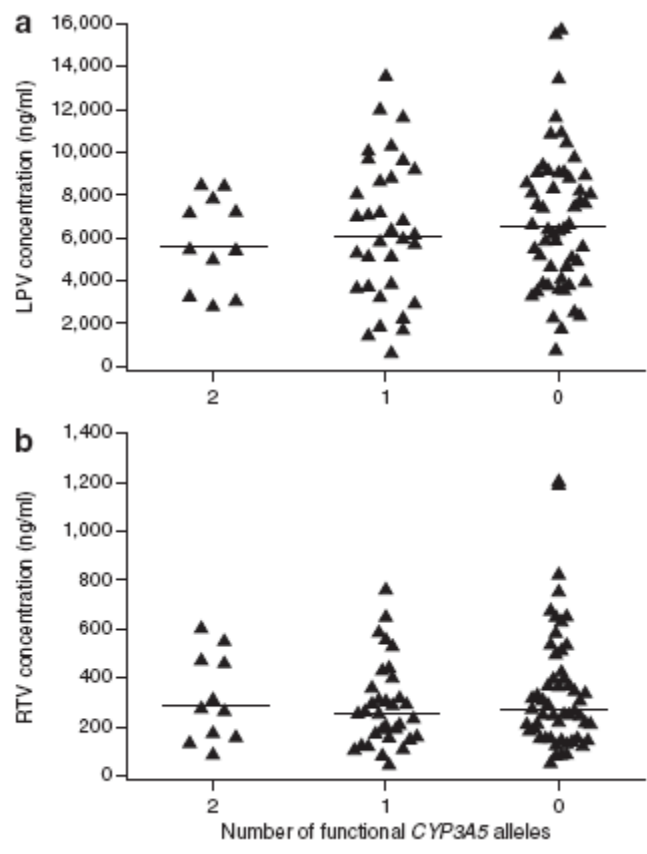
REFERENCES

1. Josephson, F. *et al.* CYP3A5 genotype has an impact on the metabolism of the HIV protease inhibitor saquinavir. *Clin. Pharmacol. Ther.* **81**, 708-712 (2007).
2. Vergara, T.R., Estrela, R.C., Suarez-Kurtz, G., Schechter, M., Cerbino-Neto, J. & Barroso, P.F. Limited penetration of lopinavir and ritonavir in the genital tract of men infected with HIV-1 in Brazil. *Ther. Drug Monit.* **28**, 175-179 (2006).
3. Solas, C., Lafeuillade, A., Halfon, P., Chadapaud S., Hittinger G. & Lacarelle, B. Discrepancies between protease inhibitor concentrations and viral load in reservoirs and sanctuary sites in human immunodeficiency. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**, 238-243 (2003).
4. Crommentuyn, K.M. *et al.* Population pharmacokinetics of lopinavir in combination with ritonavir in HIV-1-infected patients. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **60**, 378-89 (2007).

5. Mirghani, R.A. *et al.* CYP3A5 genotype has significant effect on quinine 3-hydroxylation in Tanzanians who have lower total CYP3A activity than a Swedish population. *Pharmacogenet. Genomics* **16** 637-45 (2006).
6. Sham, H.L. *et al.* ABT-378, a highly potent inhibitor of the human immunodeficiency virus protease. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**, 3218-3224 (1998).
7. Granfors, M.T., Wang, J.S., Kajosaari, L.I., Laitila, J., Neuvonen, P.J., Backman, J.T. Differential inhibition of cytochrome P450 3A4, 3A5 and 3A7 by five human immunodeficiency virus (HIV) protease inhibitors in vitro. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **98**,79-85 (2006).
8. Ernest, C.S. II, Hall, S.D., Jones, D.R. Mechanism-based inactivation of CYP3A by HIV protease inhibitors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **312**, 583-591 (2005).
9. Thompson, E.E., Kuttub-Boulos, H., Witonsky, D., Yang, L., Roe, B.A. & Di Rienzo; A. CYP3A variation and the evolution of salt-sensitivity variants. *Am. J. Hum. Genet.* **75**, 1059-1069 (2004).
10. Suarez-Kurtz G., Perini JA, Bastos-Rodrigues L, Pena SDJ & Struchiner CJ. Impact of population admixture on the distribution of the *CYP3A5**3 polymorphism. *Pharmacogenomics* **8**,1299-1306 (2007).
11. Suarez-Kurtz, G. & Pena, S.D.J. Pharmacogenetics in the Brazilian population. In *Pharmacogenomics in Admixed Populations* (ed. Suarez-Kurtz G.) 75-98 (Landes Bioscience, Austin, 2007).
12. Liu, T.C., Lin, S.F., Chen T.P. & Chang, J.G. Polymorphism analysis of CYP3A5 in myeloid leukemia. *Oncol. Rep.* **9**, 327-329 (2002).

Legend to Figure 1

Figure 1 Distribution of the trough concentrations of lopinavir (A) and ritonavir (B) in plasma among HIV infected subjects with 2 (n=11), 1 (n=33) or 0 (n=54) *CYP3A5* functional alleles ($P=0.65$ for lopinavir and $P=0.78$ for ritonavir, Kruskal-Wallis test). The lines denote the median values for each genotype.



CURRICULUM VITAE

Nome: Rita de Cássia Eslias Estrela Marins

Nascimento: 16/07/1975

Naturalidade: Rio de Janeiro

Formação Acadêmica:

- Faculdade de Farmácia na Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ (1995-2000).
- Especialização em Farmacologia na Coordenação de Pesquisa do Instituto Nacional de Câncer- RJ (2000-2001).
- Mestrado no Departamento de Bioquímica Médica da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ com a dissertação: “Didanosina: determinação em soro humano por LC-MS/MS, farmacocinética e amostragem limitada”, (2001-2003).
- Doutorado no Instituto de Bioquímica Médica da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, (2003- 2007).

Orientação de Estudantes:

- Fabio Schneider Ribeiro – iniciação científica, Curso de Biologia/UFRJ. Período: 2002-2006.
- Renato Sampaio Carvalho – iniciação científica, Curso de Farmácia/UFRJ. Período: 2004-2005.
- Brayan Viegas Seixas - estágio curricular, Técnico Biotecnologia/CEFETQ-URJ. Período: jan/2007-dez/2007.
- Rafael Santos –monitoria do curso de Toxicologia Clínica. Período: dez/2006-jul/2007.
- Alessandra Moreira de Oliveira – curso de Especialização em Farmácia Hospitalar em Oncologia. Período: jun/2008.

Comunicação em Congresso:

14 comunicações em congressos nacionais

Publicações:

Ponte CG; **Estrela RCE**; Suarez-Kurtz G. (2000). Modulation of the Ca^{+2} release channel of sarcoplasmic reticulum by amiloride analogs. European J. Pharmacol. 391:11-20.

Suarez-Kurtz G; Ribeiro FM; **Estrela RCE**; Vicente FL; Struchiner C (2001). Limited-sampling strategy models for estimating the pharmacokinetic parameters of 4- methylaminoantipyrine, a active metabolite of dypirone. Braz. J. Med. Biol. Res. 34(11):1475-1485.

Estrela RCE; Salvadori MC; Raices R; Suarez-Kurtz G (2003). Determination of didanosine in human serum by on-line solid phase extraction coupled to HPLC with ESI-MS/MS detection: application to a bioequivalence study. Journal of Mass Spectrometry 38(4): 378-385.

Raices R; Salvadori MC; **Estrela RCE**; Aquino-Neto FR; Suarez-Kurtz G (2003). Determination of Stavudine in Human Serum by On-Line Solid Phase Extraction Coupled to High-Performance Liquid Chromatography with Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry Detection: Application to a Bioequivalence Study. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 17: 1611-1618.

Suarez-Kurtz G; **Estrela RCE**; Salvadori MC (2004). Prednisolone: limited sampling strategies for estimating pharmacokinetic parameters. *Therapeutic Drug Monitoring* Feb; 26(1):16-22.

Estrela RCE; Salvadori MC; Suarez-Kurtz G (2004). A Rapid and Sensitive Method for Simultaneous Determination of Lamivudine and Zidovudine in Human Serum by On-Line Solid Phase Extraction Coupled to Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry Detection. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 18:1147-1155.

Velasque LS, **Estrela RCE**, Suarez-Kurtz G, Struchiner CJ (2005). Estimating the genetic component (RGC) in pharmacokinetic variability of the antiretroviral didanosine among healthy Brazilians. *AIDS*;19 Suppl 4:S76-80.

Vergara T, Schechter M, **Estrela RCE**, Suarez-Kurtz G, Barroso PF (2006). Limited Penetration of Lopinavir in the Genital Tract of Men Infected with HIV-1 in Brazil. *Therapeutic Drug Monitoring* 28:175-179.

Velasque LS; **Estrela RC**; Suarez-Kurtz G; Struchiner CJ (2007). A new model for the population pharmacokinetics of didanosine in healthy subjects. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 40, p. 97-104.

Estrela RC; Ribeiro FS; Carvalho RS; Gregório SP; Struchiner CJ; Suarez-Kurtz G (2008). Distribution of ABCB1 polymorphisms among Brazilians: impact of population admixture. *Pharmacogenomics (London)*, v. 9, p. 267-276.

Estrela R; Santoro AB; Barroso P; Tuyama M; Suarez-Kurtz G (2008). CYP3A5 Genotype Has No Impact on Plasma Trough Concentrations of Lopinavir and Ritonavir in HIV-infected Subjects. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 84(2):205-7.

Estrela RC ; Ribeiro FS; Seixas BV; Suarez-Kurtz G (2008) . Determination of lopinavir and ritonavir in blood plasma, seminal plasma, saliva and plasma ultrafiltrate by liquid chromatography/tandem mass spectrometry detection. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, v. 22, p. 657-664.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)