

Cecília Salete Alencar Silva

Avaliação da sensibilidade aos inibidores de entrada do HIV-1 em pacientes em falha virológica à terapia antirretroviral e novos aos inibidores de entrada.

Dissertação apresentada à Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina para obtenção do título de Mestre em Ciências.

SÃO PAULO
2009

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Cecília Salete Alencar Silva

Avaliação da sensibilidade aos inibidores de entrada do HIV-1 em pacientes em falha virológica à terapia antirretroviral e novos aos inibidores de entrada.

Orientadora
Profa. Dra. Ester Cerdeira Sabino

SÃO PAULO
2009

Silva, Cecília Salete Alencar

Avaliação da sensibilidade aos inibidores de entrada do HIV-1 em pacientes em falha virológica à terapia antirretroviral e novos aos inibidores de entrada /Cecília Salete Alencar Silva - São Paulo, 2009. XIII, f.82.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Infectologia.

Título em inglês: Evaluation of sensitivity to inhibitors of entry of HIV-1 in patients with virological failure to antiretroviral therapy and new inhibitors of the entry.

1. HIV/AIDS 2. Resistência primária 3. Falha terapêutica 4. Inibidores de entrada

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
ESCOLA PAULSITA DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA

Chefe do Departamento de Medicina

Prof. Ângelo Amato Vincenzo de Paola

Chefe da Disciplina de Infectologia

Prof. Dr. Eduardo Alexandrino Sérvolo de Medeiros

Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Infectologia

Prof. Dr. Ricardo Sobhie Diaz

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Sorologia, Fundação Pró-Sangue, Hemocentro de São Paulo, com auxílio financeiro fornecido pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior (CAPES) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Projeto Temático N.º 2004/15856-9.

Cecília Salete Alencar Silva

Avaliação da sensibilidade aos inibidores de entrada do HIV-1 em pacientes em falha virológica à terapia antirretroviral e novos aos inibidores de entrada.

Presidente da banca:-

Profª Dra. Ester Cerdeira Sabino

Banca Examinadora

Prof. Dr. Dercy José de Sá Filho

Prof. Dr. Jorge Casseb

Profa. Dra. Maria Cecília Araripe Sucupira

Suplente

Prof. Dr. Ricardo Sobhie Diaz

Sumário

Agradecimentos.....	VII
Lista de Tabelas.....	VIII
Lista de Figuras.....	IX
Lista de Abreviaturas e Símbolos.....	X
Abstract.....	XIII
Resumo.....	XIV
1.Introdução.....	1
1.1 Surgimento da aids.....	1
1.2. Perfil do HIV.....	2
1.3. Organização Genômica do HIV.....	4
1.4. Ciclo Replicativo do HIV.....	9
1.5. Variabilidade Genética do HIV.....	12
1.6..Mutação.....	12
1.7. Classificação do HIV.....	13
1.8. Resistência aos Antirretrovirais.....	17
1.8.1. Inibidores da Transcriptase Reversa Análogos Nucleosídeos (ITRNI)	21
1.8.2 Inibidores da Transcriptase Reversa Não Nucleosídeos (ITRNN).....	21
1.8.3 Inibidores da Protease.....	22
	V

1.8.4 Inibidores da Integrase.....	23
1.8.5 Inibidores da Entrada de Entrada.....	24
1.9 Identificação das Mutações de Resistência do HIV-1 aos Antirretrovirais.....	29
2. Justificativa.....	31
3. Objetivos do Estudo	32
4. Material e Métodos	33
4.1 Casuística	33
4.2 Extração de DNA e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	34
4.3 Sequenciamento e Análise de Resistência	36
4.4 Método Estatístico	38
5. Resultados	39
6. Discussão.....	47
7. Conclusão.....	53
8. Referência Bibliográfica.....	54
9. Anexos.....	75

Agradecimentos

Ao trilhar os caminhos da vida, descobrimos que em cada ponto de partida contamos com o apoio de pessoas especiais, que tornam essa difícil travessia mais tranqüila. A vocês pessoas especiais, dedico este espaço.

A **Deus** por iluminar o meu caminho estimulando sempre a procura pelo melhor.

À **Profª. Dra. Ester Cerdreira Sabino**, minha querida e estimada orientadora, faltariam palavras para expressar tanta gratidão, pelo acolhimento, pelos ensinamentos que me ajudaram a trilhar o difícil caminho do conhecimento através da ciência.

À **Dra. Nanci**, expresso minha admiração pela excelente profissional, agradeço pelo apoio e por abrir as portas da Instituição para o desenvolvimento da minha pesquisa.

À minha amiga **Anna Nishiya**, pelos primorosos ensinamentos biomoleculares e pelo companheirismo de todos os momentos.

À minha amiga **Sheila Rodrigues**, que participou ativamente dessa etapa da minha vida.

Ao meu amigo **Charlys**, pelo apoio no desenvolvimento desse trabalho.

Aos **amigos** conquistados em minha trajetória acadêmica na Fundação Pró-Sangue (Biologia Molecular/Sorologia).

Aos meus **familiares** pela credibilidade e apoio em minha trajetória de vida.

A todos **pacientes** envolvidos nesse trabalho, certamente sem a confiança e contribuição de cada um, não seria possível que a ciência cumprisse seu verdadeiro papel na humanidade.

Lista de Tabelas

Tabela 1. Representação da prevalência dos subtipos e formas circulantes do HIV-1 no mundo	17
Tabela 2. Drogas antirretrovirais aprovadas pelo FDA	28
Tabela 3. Seqüência de <i>primers</i> utilizadas para amplificar a região do envelope.....	35
Tabela 4. Seqüência de <i>primers</i> utilizados no sequenciamento.....	37
Tabela 5. Características sociais epidemiológicos de 100 pacientes envolvidos no estudo.....	39
Tabela 6. Mutações encontradas nas regiões gp 120 e gp 41 do envelope do vírus das 80 amostras analisadas.....	41
Tabela 7. Dados em relação ao subtipo e a presença de mutações para Enfuvirtida (T20) e BMS 378806.....	44
Tabela 8. Dados em relação o uso de co-receptores e a carga viral das amostras HIV-1 positivo.....	45
Tabela 9. Frequência de resistência ao Enfuvirtida e ao BMS 378806 de acordo com o co-receptor de entrada.	46
Tabela 10. Descrição dos resultados de trabalhos publicados da resistência primária em pacientes não tratados com o inibidor de Fusão Enfuvirtida (T20)	

Lista de Figuras

Figura 1. Estrutura do vírus da imunodeficiência humana do tipo I (HIV-1).....	3
Figura 2. Genoma do vírus da imunodeficiência humana tipo1 (HIV-1)	8
Figura 3. Entrada do HIV nas células hospedeiras.....	11
Figura 4. Mutações conforme IAS.....	26
Figura 5. Polimorfismos encontrados entre as posições 30-71 da gp 41(região relacionada à resistência ao Enfuvertida).....	43
Figura 6. Frequência dos polimorfismos entre as posições 410-450 da gp 120 (região relacionada com a resistência ao BMS 378806).....	44

Lista de Símbolos e Abreviaturas

aids (SIDA)	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
AZT(ZDV)	Zidovudina
°C	Graus Celsius
CA	Capsídeo
CCR5	Receptor de Quimiocinas
CD4	Receptor Celular
CDC	Centro de Controle e Prevenção de Doenças (Centers for Disease Control).
cDNA	DNA Complementar
CRT/DST/AIDS	(Centro de Referência e Treinamento DST/AIDS SP)
CXCR4	Receptor de Quimiocinas
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos Trifosfato
DST	Doença Sexualmente Transmissível
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
<i>env</i>	Gene que Codifica as Proteínas do Envelope do HIV
et al.	e outros
FDA	Food and Drug Administration
FPS/HSP	Fundação Pró-Sangue/Hemocentro de São Paulo
<i>gag</i>	Gene que Codifica as Proteínas da MA,CA e NC
gp	Glicoproteína
h	Hora
HAART	Terapia Antirretroviral Altamente Ativa (Highly Active Antiretroviral Therapy)
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HIV-1	Vírus da Imunodeficiência Humana- Tipo 1
HIV-2	Vírus da Imunodeficiência Humana- Tipo 2

IAS	Sociedade Internacional AIDS (International AIDS Society)
IC	Concentração Inibitória
IN	Integrase
INNRT	Inibidor não Nucleosídeo da Transcriptase Reversa
INRT	Inibidor Nucleosídeo da Transcriptase Reversa
IP	Inibidor de Protease
Kb	Kilobase
KDa	KiloDaltons
LTR	Repetições Terminais Longas (Long Terminal Repeats).
“M”	Major
M	Molar
MA	Matriz
Min	Minuto
mM	Milimolar.
N	New ou Non M-Non O
<i>nef</i>	Gene Acessório da Replicação Viral
NFV	Nelfinavir
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
O	Outlier
P	Probabilidade de um evento ocorrer ao acaso.
pb	Pares de Bases
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
Pmoles	Picomol
<i>pol</i>	Gene que codifica as proteínas da polimerase do HIV-1
PR	Protease

RENAGENO	Rede Nacional de Genotipagem
<i>rev</i>	transativador pós-transcricional do HIV
RNA	Ácido Ribonucléico
RNA _m	Ácido Ribonucléico Mensageiro
RRpm	Rotações por Minuto
RT	Transcriptase Reversa
seg	Segundos
su	Superfície
T.A	Temperatura Ambiente
Taq	Thermus Aquaticus
tat	Gene Transativador Transcricional do HIV-1
TBE	Tris Borato EDTA.
TM	Transmembranar
U	Unidade
UNAIDS	Comitê das Nações Unidas para a aids (Joint United Nations Programme).
ug	Micrograma
μL	Microlitro
μM	Micromolar
V3	Região Hipervariável 3 da Proteína gp120
Vif	Fator de Infectividade do HIV.
<i>Vpr</i>	Fator de Infectividade do HIV.
<i>Vpu</i>	Fator Auxiliar de Infectividade do HIV-1.
<i>Vpx</i>	Fator Auxiliar de Infectividade do HIV-2.
%	Por Cento

Abstract

Evaluation of sensitivity to inhibitors of entry of HIV-1 in patients with virological failure to antiretroviral therapy and new inhibitors of the entry.

Introduction: The chance of using combination of drugs within Highly Active Antiretroviral Therapy (HAART) has been resulted in a dramatic fall in the mortality and morbidity caused by the Human Immunodeficiency Virus-1 (HIV-1). Nevertheless, over the past years, there was observed a selection of strains resistant to some of these drugs, and today constitutes a major obstacle for the control of the disease, this fact highlights the need for the development of new drugs for the continuity of care. **Objective:** The aim of this study was to analyze the frequency of primary resistance to drugs that inhibit binding or fusion as Enfuvirtide (T20) and BMS 378806, in samples of HIV-1 positive patients undergoing antiretroviral therapy and presenting virological failure. **Methods:** This study included 100 HIV-1 positive patients attending the Outpatient department of the Centro de Referência para o tratamento da AIDS (CRTA), using antiretroviral drugs and that show virological failure and with a result of viral load equal or above than 5000 copies / mL. The patients responded a questionnaire and medical records were also analyzed. The proviral DNA was amplified and sequenced for the region of the envelope of HIV-1. **Results:** Of 100 samples analyzed, 87 (87%) were positive and 13 (13%) were negative to the proviral DNA of HIV-1. Among the positive samples 80 (92%) were sequenced. Of the 80 samples sequenced, 73 (91.25%) were classified as subtype B, 2 (2.5%) recombinant (B 1 / F and 1 BC) and 5 (6.25%) were subtype F. Regarding the coreceptors used by viruses, 56 (70%) samples were classified as CCR5 and 24 (30%) as CXCR4. Among the samples analyzed, 8 (10%) had mutations for the fusion inhibitor Enfuvirtide (T20), being one of them classified according to the criteria of the Consensus of the International Society for AIDS and the others as cited previously in another works. For the inhibitor BMS 378806, 6 (7.5%) samples had mutations, with a frequency of 28,6% for the subtype B. **Conclusion** In this study was detected primary resistance to antiretroviral class entry inhibitors of HIV-1 and was observed the importance of establishing criteria for identification of strains resistant to Enfuvirtide (T20) before indicate the testing of genotyping.

Resumo

Avaliação da sensibilidade aos inibidores de entrada do HIV-1 em pacientes em falha virológica à terapia antirretroviral e novos aos inibidores de entrada.

Introdução: A possibilidade da utilização das drogas de forma combinada (HAART), resultou em uma queda dramática da mortalidade e morbidade da infecção pelo HIV-1. Apesar disso, com o passar dos anos, houve seleção de cepas resistentes a estes medicamentos, sendo hoje um importante entrave para o controle da doença, esse fato evidencia a necessidade de implantação de novas drogas para a continuidade dos tratamentos. **Objetivo:** O objetivo desse estudo foi analisar a frequência de resistência primária aos medicamentos inibidores de fusão ou ligação Enfuvertida (T20) e BMS 378806, em amostras de pacientes HIV-1 positivos, submetidos a terapias com antirretrovirais apresentando falha virológica aos mesmos. **Métodos:** Foram incluídos no estudo 100 pacientes HIV-1 positivos do serviço ambulatorial do CRT utilizando drogas antirretrovirais, apresentando falha virológica e com resultado de carga viral igual ou superior 5000 cópias/ml. Os pacientes foram submetidos a um questionário e houve consulta aos prontuários. O DNA pró-viral foi amplificado e seqüenciado para a região do envelope do vírus HIV-1. **Resultados:** Das 100 amostras analisadas 87 foram positivas na PCR, sendo possível de obter sequenciamento de 80 amostras. Dessas, 73 (91.3%) foram classificadas como subtipo B; 2(2,5%) como recombinantes (1 B/F e 1 BC) e 5 (6.3%) como subtipo F. Em relação aos co-receptores, 56 (70%) amostras foram classificadas como CCR5 e 24 (30%) CXCR4. Entre as amostras analisadas, 8(10%) apresentaram mutações para o inibidor de fusão Enfuvertida (T20), sendo 1(1,3%) conforme critérios do Consenso da Sociedade Internacional de AIDS e as demais conforme citações em outros trabalhos. Para o inibidor BMS 378806, 6 (7,5%) amostras apresentaram mutações, sendo que no subgrupo não B a frequência foi de 28,6%. **Conclusão:** Em nosso estudo detectamos resistência primária à classe de antirretrovirais inibidores de entrada do HIV-1 e constatamos a importância da definição dos critérios para identificação de cepas resistentes ao Enfuvertida (T20) antes de se indicar a realização de testes de genotipagem.

1.Introdução

1.1Surgimento da aids

Por volta 1980 foram diagnosticados os cinco primeiros casos de aids, entre homens homossexuais e usuários de drogas, nesses indivíduos constataram-se o desenvolvimento de Sarcoma de Kaposi e também um tipo raro de pneumonia causada pelo *Pneumocistis carinii* (Cdc, 1981; Gottlieb, Schroff *et al.*, 1981).

Eles apresentavam uma evidente queda do número de células T CD4+ associadas com a alteração funcional do sistema imunológico (Cdc, 1981; Masur, Michelis *et al.*, 1981). Em 1982 a doença é definida como Síndrome da Imunodeficiência Adquirida ou aids (Marx, 1982). No primeiro momento acreditava-se que a síndrome estava restrita a homossexuais masculinos, mas posteriormente, foram relatados casos em grupos de pessoas hemofílicas, crianças nascidas de mães contaminadas, prostitutas, parceiras de membros de grupos de riscos e grupos de pessoas que receberam transfusões de sangue e hemocomponentes (Cdc, 1981; Gallo, Salahuddin *et al.*, 1984).

O HIV-1 foi definido em 1983 como o agente causador da aids (Barre-Sinoussi, Chermann *et al.*, 1983). Em 1986 foi isolado um novo retrovírus de africanos sintomáticos, no qual classificaram como agente etiológico da aids e definiram como HIV-2 (Clavel, Guetard *et al.*, 1986). Sendo o HIV-1 mais virulento que o HIV-2 (Kiwanuka, Laeyendecker *et al.*, 2008).

1.2 Perfil do HIV

O vírus HIV-1 pertence à família *Retroviridae* da subfamília *Orthoretrovirinae* do gênero *Lentivirus*. Tem morfologia esférica, é envolto por um envelope constituído por uma membrana fosfolipídica dupla e por um complexo glicoproteico trimérico (Figura 1) (Ozel, Pauli *et al.*, 1988; Weiss, Levy *et al.*, 1990).

Seu genoma viral é constituído por duas fitas simples e idênticas de RNA com extensão de aproximadamente 9.8 kb, as enzimas virais: transcriptase reversa (RT), protease (PR) e integrase (IN) localizam-se dentro da partícula viral, que é constituída por um envelope que envolve a matriz (p17) e o capsídeo (p24) (Vaishnav e Wong-Staal, 1991; Kuby, 1997).

Na forma de provírus, o genoma viral possui em cada uma de suas extremidades, uma seqüência LTR (*Long Terminal Repeats*), que possibilita a integração do genoma da célula hospedeira e nelas são encontrados os elementos reguladores, que participam da iniciação da replicação viral (Soriano, 2005).

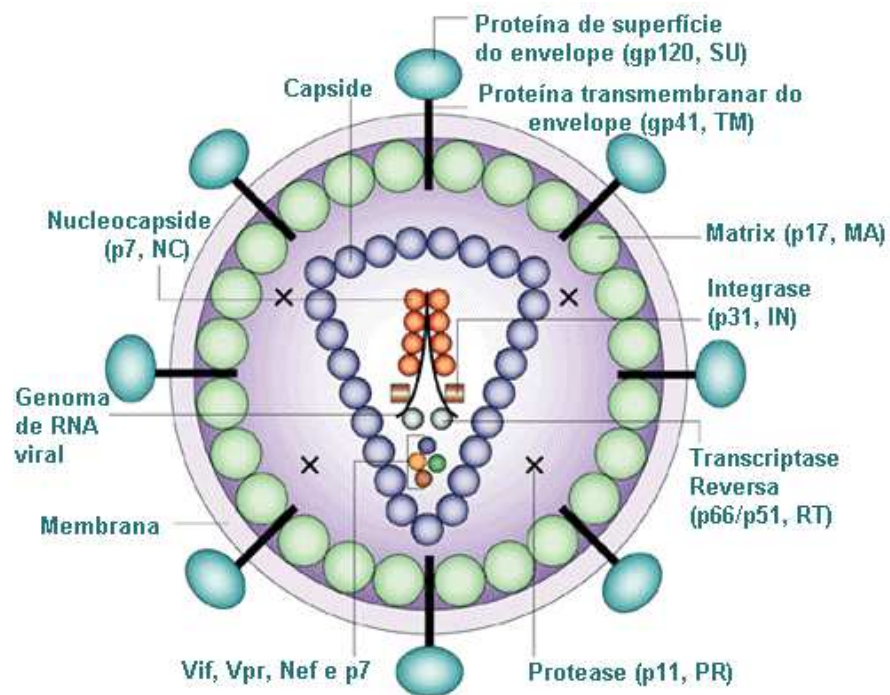


Figura 1: Estrutura do vírus da imunodeficiência humana do tipo I (HIV-1).

Adaptado de (Robinson, 2002).

1.3 Organização Genômica do HIV

O genoma do HIV contém várias fases abertas de leituras (*ORFs Open Reading Frame*) que são delimitados por duas Repetições Terminais Longas, conhecidas como *Long Terminal Repeat* (LTR), que modulam e promovem a transcrição proviral (Ramirez De Arellano, Martin *et al.*, 2007).

A variabilidade genética da LTR, dentro dessa complexa organização genômica do HIV, é apontada em estudos como um possível fator de influência na replicação viral e progresso da doença (Ramirez De Arellano, Martin *et al.*, 2007).

Na LTR inicia-se a expressão dos três genes, que são essenciais para a replicação do HIV-1: *gag*, *pol* e *env*, que também codificam os dois genes reguladores *tat*, *rev* e as quatro proteínas acessórias *Vif*, *Nef*, *Vpr* e *Vpu* (ou *Vpx* no HIV-2), que fazem parte da partícula viral (Tristem, Marshall *et al.*, 1992; Ou, 1995; Peterlin, 1995; Takasaki, Kurane *et al.*, 1997).

As partículas do HIV-1, são inicialmente produzidas como virions imaturos, que durante ou imediatamente após o brotamento da membrana celular, passam pelo processo de maturação (Craven e Parent, 1996; Von Schwedler, Stuchell *et al.*, 2003). Para que este processo aconteça é necessário, a segmentação proteolítica das estruturas *Gag* e *Gag Pol* pela protease viral (PR) (Kaplan, Manchester *et al.*, 1994).

A principal proteína estrutural do HIV é sintetizada como uma única poliproteína, chamada *Gag Pr 55*, na qual é clivada em matriz (p17 MA),

capsídeo (P24 CA), nucleocapsídeo (P7 NC) e P6 (Wills e Craven, 1991; Holguin, Alvarez *et al.*, 2005).

As três enzimas da replicação viral, protease (PR), transcriptase reversa (RT) e integrase (IN) são formadas pela segmentação da segunda poliproteína Gag -Pol ou P160 (Wills e Craven, 1991). A produção desse polipéptido maior é resultado de um deslizamento do ribossomo chamado *Read – Through*, que causa uma troca na fase de leitura *frameshift*, gerado entre 5% a 10% durante a expressão do gene *gag* (Hung, Patel *et al.*, 1998).

A segmentação das proteínas *Gag* e *Gag–Pol* são essenciais para a maturação e infectividade do HIV-1 (Muesing, Smith *et al.*, 1985; Holguin, Alvarez *et al.*, 2005).

O gene *env* codifica uma proteína precursora denominada gp160 (160 KDa), que é clivada por uma protease celular para produzir as proteínas do envelope viral, glicoproteína de superfície (SU ou gp120) e transmembrana (TM ou gp41) , que são endereçadas para a membrana citoplasmática e agrupadas para posteriormente ocorrer o brotamento viral ((Robey, Safai *et al.*, 1985).

As proteínas acessórias são expressas a partir de populações de RNAm sub genômicas, produtos de *splicing* múltiplos diferenciados, que ocorrem nos primeiros ciclos de transcrição do cDNA viral, modulados pela proteína Rev, que atua em nível pós- transcricional (Feinberg, Jarrett *et al.*, 1986).

A proteína Rev do HIV-1 permite o transporte de transcritos do vírus para o citoplasma, que codificam as genes *gag*, *pol* e *env* (Tristem, Marshall *et al.*, 1992).

A pequena proteína *Tat* é essencial para a replicação do HIV-1 (Ou, 1995; Kuciak, Gabus *et al.*, 2008), e atua como transativadora na região 5' LTR do RNAm, através da sua via de interação com o elemento de resposta transativadora (TAR) (Cullen, 1991; Jeang, Xiao *et al.*, 1999; Gatignol, 2007).

A proteína *Nef* diminui a expressão dos receptores CD4 das células hospedeiras e estimula a infectividade do vírus (Garcia e Miller, 1991; Aiken e Trono, 1995; Stoddart, Geleziunas *et al.*, 2003; Yang, Bielawski *et al.*, 2003).

A proteína *Vif* é um fator de infectividade viral (Tremblay, Numazaki *et al.*, 1990; Sakai, Ma *et al.*, 1991). Neutraliza a atividade antiviral dos membros celulares da família citidina deaminase recentemente identificados APOBEC 3G, APOBEC3F e APOBEC3B1, sendo APOBEC 3G um fator antiviral natural, que promove hipermutação G para A do DNA, durante a transcriptase reversa (Sheehy, Gaddis *et al.*, 2002; Bell, Connell *et al.*, 2007; Ulenga, Sarr *et al.*, 2008).

A proteína viral *Vpu* regula a expressão do receptor CD4+ sendo essencial para uma efetiva liberação de partículas virais (Bell, Connell *et al.*, 2007; Neil, Zang *et al.*, 2008; Van Damme, Goff *et al.*, 2008).

A proteína acessória *Vpr* é essencial para a replicação viral e possui múltiplas funções, incluindo o transporte do complexo pré-integração para o núcleo, transativação de genes celulares e indução da diferenciação celular (Willey, Maldarelli *et al.*, 1992; Le Rouzic e Benichou, 2005)

Embora essas proteínas multifuncionais do HIV-1, não recebam ainda devida atenção em pesquisas científicas, podem representar novos caminhos

para as intervenções preventivas e terapêuticas nos tratamentos da aids (Bell, Connell *et al.*, 2007).

Os antivirais naturais como a APOBEC3G e a proteína Trim 5 alpha, começaram a despertar interesses em áreas de pesquisas do HIV, representando também alvos para novos medicamentos contra o vírus.

Trim 5 alpha é uma proteína citoplasmática que faz parte do sistema imune intrínseco, que restringe infecções retrovirais nos primatas (Lin e Emerman, 2008). Em algumas espécies a proteína Trim 5 alpha é capaz de reconhecer o capsídeo viral do HIV, promovendo sua retirada prematura e bloqueando a infecção viral (Stremlau, Perron *et al.*, 2005; Lin e Emerman, 2008). Recentemente foi descoberto que a proteína Trim alfa rh também bloqueia a fase tardia de replicação do vírus (Sakuma, Mael *et al.*, 2007). A atividade dessa proteína é maior em macacos *Rhesus* do que em humanos (Stremlau, Perron *et al.*, 2005).

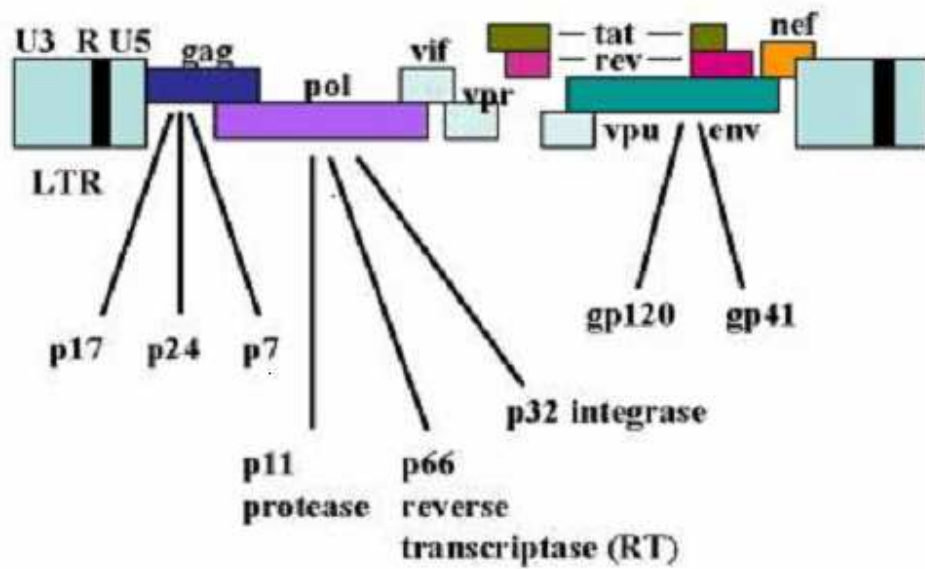


Figura 2 – Genoma do vírus da imunodeficiência humana tipo1 (HIV-1).
 (Adaptado de www.aids.harvard.edu/research/discoveries.html)

1.4 Ciclo Replicativo do HIV

O primeiro passo para o início da infecção do HIV-1 é a ligação da partícula viral a receptores específicos na superfície da célula. O envelope do HIV consiste de uma glicoproteína externa gp120 e uma proteína transmembrana gp 41 (Mavoungou, Poaty-Mavoungou *et al.*, 2005).

A proteína responsável pelo reconhecimento das células alvos do vírus é a gp120, e o principal receptor e alvo é o CD4. O quadro clínico da aids é caracterizado pela diminuição da contagem sangüínea de linfócitos T CD4+ no indivíduo infectado (Klatzmann, Champagne *et al.*, 1984; Mcdougal, Mawle *et al.*, 1985).

Após a ligação à membrana celular, a proteína gp120 sofre um processo de reestruturação, levando à exposição da alça V3, que interage com receptores de quimiocinas (Deng, Liu *et al.*, 1996).

Os co-receptores CCR5 e CXCR4 são membros da subfamília de quimiocinas formada por 7 receptores de domínios transmembranares (Doms, 2004). Em raros casos, outros co-receptores, também tem demonstrado mediar a entrada do HIV-1 dentro da célula hospedeira, embora os co-receptores CCR5 e CXCR4 são os mais importantes na patogênese do HIV-1 (Brumme, Goodrich *et al.*, 2005).

O co-receptor CCR5 é o mais comumente utilizado pelo HIV-1, está presente nas células T primárias e macrófagos. Indivíduos que não expressam o co-receptor CCR5 são muito mais resistentes à infecção pelo vírus (Popik,

Alce *et al.*, 2002; Wei, Decker *et al.*, 2002; Bar e Alizon, 2004; Doms, 2004; Kang, Quan *et al.*, 2005; Mavoungou, Poaty-Mavoungou *et al.*, 2005; Moyle, Wildfire *et al.*, 2005; Heredia, Gilliam *et al.*, 2007).

O co-receptor CXCR4 expressa-se em vários tipos de células, incluindo tímócitos, células T e macrófagos (Collin, Illei *et al.*, 1994; Moyle, Wildfire *et al.*, 2005). Quando o co-receptor CXCR4 é utilizado pelo HIV-1 pode ocorrer a formação de sinsícios *in vitro* (Doms, 2004; Moyle, Wildfire *et al.*, 2005). Os indutores de sinsícios ou vírus utilizando CXCR4 são tipicamente encontrados em indivíduos com a doença avançada (Huang, Eshleman *et al.*, 2007).

Ainda não está claro porque essas variantes são mais patogênicas, ou como causam uma maior disfunção no sistema imune, resultando de certa maneira em um progresso mais rápido da doença (Brumme, Goodrich *et al.*, 2005).

Após o processo de interação com os receptores, a gp120 dissocia-se da proteína gp41, passando por modificações conformacionais, que promovem a fusão vírus-célula e possibilita a entrada do material genético na célula hospedeira (Figura 3) (Deng, Liu *et al.*, 1996).

Esse material genético sofre a ação da enzima transcriptase reversa, que a partir do RNA genômico, possibilita a síntese de uma fita simples de DNA, resultando em um filamento híbrido RNA-DNA (Varmus, 1985)

Em seguida a RNase degrada a fita simples de RNA e a transcriptase reversa agindo como uma DNA polimerase, promove a síntese de um DNA

complementar (cDNA), que resulta em uma fita dupla de DNA (Smith e Daniel, 2006).

Pela ação da integrase o genoma viral é incorporado ao cromossomo da célula hospedeira, sob a forma de provírus (Varmus, 1985; Bar e Alizon, 2004; Heredia, Gilliam *et al.*, 2007).

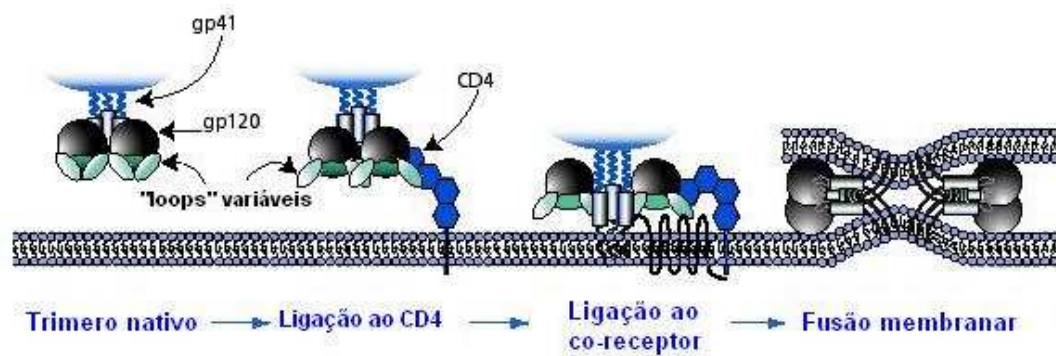


Figura 3: Entrada do HIV nas células hospedeiras Adaptado do (Doms, 2004).

1.5 Variabilidade Genética do HIV-1

A população do vírus da Imunodeficiência Humana (HIV-1) é caracterizada pela extensa variabilidade genética, que resulta da grande taxa de erros durante o processo da transcriptase reversa, podendo ocorrer mutação pontual, inserções e deleções (Roberts, Bebenek *et al.*, 1988; Mansky, 1998; Sharp, Bailes *et al.*, 1999; Ramirez, Simon-Loriere *et al.*, 2008). A complexidade da variabilidade genética do HIV atualmente é um fascinante alvo para estudos.

1.6 Mutação

O HIV-1 possui alta capacidade de replicação e bilhões de novos vírus são produzidos diariamente (Ho, Neumann *et al.*, 1995).

É consenso relatar a elevada taxa de replicação viral, como o fator principal na evolução do vírus (Coffin, 1995), pois a taxa de erros da transcriptase reversa (10^4 bases a cada ciclo de replicação viral) associada à ausência ou a baixa eficiência da atividade de correção no processo de transcrição reversa do genoma viral, resulta em um elevado número de variantes provirais durante a replicação viral (Preston, Poiesz *et al.*, 1988; Bebenek, Abbotts *et al.*, 1989; Steinhauer, Domingo *et al.*, 1992; Williams e Loeb, 1992; Shafer, Winters *et al.*, 1998; Erickson, Gulnik *et al.*, 1999; Miller, Duus *et al.*, 2001).

Não se encontram duas cepas virais idênticas num mesmo indivíduo infectado, pois à população viral do vírus HIV, apresenta-se como uma quasispecie, ou seja, microvariantes bem relacionadas, porém geneticamente distintas entre si (Shafer, 2002).

Outro mecanismo importante na diversidade genética do vírus é a recombinação genética (Hu e Temin, 1990; Temin, 1993). Recombinações entre subtipos do HIV-1 são freqüentemente encontradas nas regiões dos genes *env* e *gag* (Robertson, Sharp *et al.*, 1995; Kampinga, Simonon *et al.*, 1997). A recombinação requer a infecção simultânea de uma célula por dois vírus diferentes (Peeters e Sharp, 2000)

Os eventos de recombinações são responsáveis pela formação de genomas mosaicos, compostos inclusive por diferentes subtipos em regiões genômicas distintas (Peeters e Sharp, 2000).

1.7 Classificação do HIV

O HIV pertence à família *Retroviridae* gênero *Lentiviridae*, dois tipos foram isolados em humanos: HIV-1 e HIV-2 (Barre-Sinoussi, Chermann *et al.*, 1983).

A classificação é baseada em análises filogenéticas das suas similaridades de nucleotídeos. Os grupos e os diferentes subtipos do HIV-1, são definidos pelas suas similaridades, que são encontradas em um certo número de nucleotídeos nos genomas desses vírus (Soares, 2008).

Embora o gene *env* seja variável, encontramos distinções como nas seqüências das Repetições Terminais Longas (LTR), *gag*, *pol*, nos genes que codificam a regulamentação e nas proteínas acessórias (Soares, 2008). Diferenças nas seqüências de nucleotídeos do grupo M do vírus HIV-1, podem ser tão elevados como 30% no gene *env*, 15% no gene *gag* e aproximadamente 10-15% no gene *pol*, sendo os maiores alvos das terapias antirretrovirais (Gao, Robertson *et al.*, 1998).

Inicialmente as seqüências das cepas do HIV-1, foram classificadas de acordo com a sua relação filogenética, em grupos e subtipos. No entanto, à crescente complexidade de novas seqüências do HIV-1, levaram a uma reavaliação do sistema de nomenclatura, assim foram divididas em grupos, subtipos, sub subtipos e CRFS (Robertson, Anderson *et al.*, 2000).

O HIV-1 é amplamente disseminado mundialmente e através de análises filogenéticas de seqüências de nucleotídios dos genes *env* e *gag* de isolados do vírus, foi dividido em três grupos genéticos: grupo M (maior ou principal), grupo O (outlier) e grupo N (new ou não M, não O) (Myers, Macinnes *et al.*, 1992; Garrido, Zahonero *et al.*, 2008).

Enquanto os grupos O e N do HIV-1 são restritos a países da África central na República dos Camarões, o grupo M é responsável por mais de 90% das infecções mundial do vírus HIV-1 (Myers, Macinnes *et al.*, 1992; Nkengasong, Janssens *et al.*, 1994; Sharp, Shaw *et al.*, 2005; Hemelaar, Gouws *et al.*, 2006; Van Heuverswyn, Li *et al.*, 2006).

Os grupos M e N são descendentes do SIV que circula em chimpanzés no oeste Africano (Sharp, Shaw *et al.*, 2005).

O HIV-2 representa a minoria das infecções virais, e a sua prevalência diminui ao longo do tempo. A sua ocorrência é mais restrita para algumas regiões da África Ocidental e Central. Os indivíduos infectados são principalmente encontrados na África Ocidental e Índia (Eholie e Anglaret, 2006).

No grupo M, foram classificados nove subtipos (A-B-C-D-F-G-H-J e K) e alguns subtipos são ainda mais divididos em sub subtipos, assim como os subtipos F (F1 e F2) e A (A1, A2 e A3) (Simon, Mauclore *et al.*, 1998; Spira, Wainberg *et al.*, 2003; Atlas, Granath *et al.*, 2005).

Os Subtipos e sub-subtipos podem formar mosaicos adicionais e atualmente são reconhecidas mais de 40 CRFs em diversas partes do mundo (Garrido, Zahonero *et al.*, 2008)

Kiwanuka, Laeyendecker *et al.*, 2008, constataram que, pacientes portadores de infecções com subtipos recombinantes ou com múltiplos subtipos do HIV-1, são associados com o rápido progresso da doença comparada aos pacientes portadores de um único subtipo.

O subtipo B do HIV-1, representa 10% das infecções no mundo, sendo encontrado nas Américas, Europa Ocidental, Japão e Austrália, o subtipo A representa 12% nas infecções mundiais, sendo tipicamente encontrado no leste Europeu, países da antiga União Soviética e alguns países Africanos (Buonaguro, Tornesello *et al.*, 2007)

Atualmente o subtipo C do HIV-1, representa 50% das infecções no mundo, tem predominância no Sul, Leste da África Central, Índia e China (Soares, Santos *et al.*, 2007).

O subtipo D é predominante em 3% nas infecções no mundo, pode ser encontrado na República Democrática de Congo e Tanzânia (Buonaguro, Tornesello *et al.*, 2007; Ramirez, Simon-Loriere *et al.*, 2008). Subtipo F está presente em países da África Ocidental e na República Democrática de Congo com aproximadamente 1% de presença nas infecções destes países (Hemelaar, Gouws *et al.*, 2006)

As CRFs estão presentes em algumas cepas em certas regiões geográficas , assim como, CRF01_AE em países do Sudeste Asiático, CRF02_AG em países do Oeste Africano e CRF07_BC e CRF08_BC na China . A Tabela 1 mostra os mais prevalentes subtipos do HIV-1 no mundo com as suas respectivas freqüências. (Hemelaar, Gouws *et al.*, 2006).

O subtipo B do HIV-1 é o dominante na epidemia brasileira, corresponde a 85% dos indivíduos infectados no Brasil (Morgado, Sabino *et al.*, 1994; Sabino, Shpaer *et al.*, 1994; Janini, Pieniazek *et al.*, 1996; Peuchant, Capdepon *et al.*, 2007; Sa-Filho, Kallas *et al.*, 2007; Veras, Veras *et al.*, 2007; Waleria-Aleixo, Martins *et al.*, 2008; Oliveira, Martins *et al.*, 2009). Em relação às variantes não B predomina o subtipo F, responsável por 15% a 20% da população infectada e o subtipo C predomina no Sul do país (Sabino, Shpaer *et al.*, 1994; Hu, Dondero *et al.*, 1996; Janini, Pieniazek *et al.*, 1996; Veras, Veras *et al.*, 2007; Diaz, Leal *et al.*, 2008; Waleria-Aleixo, Martins *et al.*, 2008).

Tabela 1: Representação da prevalência dos subtipos e formas circulantes do HIV-1 no Mundo

HIV-1SUBTIPOS/ CRFs	Prevalência Global %
C	50
A	12
B	10
F,G,H, J e K	7
CRF01_AE	5
CRF02_AG	5
D	3
Outros	8

(Hemelaar, Gouws *et al.*, 2006)

1.8 Resistências aos Antirretrovirais

Após 27 anos do primeiro relato de caso de aids, a doença já causou a morte de mais de 40 milhões de pessoas e atualmente são 33 milhões infectadas no mundo (AIDS Epidemic update, UNAIDS 2008).

O início do uso dos antirretrovirais começou por volta dos anos 80 (Fischl, Richman *et al.*, 1987) e em 1993 após 6 anos de introdução do AZT foram identificados pacientes infectados com cepas resistentes à droga. Com o emprego da HAART iniciaram em 1996 os relatos de transmissão de cepas do

HIV-1 com resistência a uma ou múltiplas drogas antirretrovirais (Erice, Mayers *et al.*, 1993; Masquelier, Lemoigne *et al.*, 1993; Boden, Hurley *et al.*, 1999; Balotta, Berlusconi *et al.*, 2000; Little, 2000; Simon, 2001; Little, Holte *et al.*, 2002).

A HAART aumentou o tempo e a qualidade de vida dos pacientes com HIV/aids e foi um marco na evolução do desenvolvimento e aplicação de novos fármacos nos tratamentos. Porém o seu sucesso fica comprometido pela adesão inadequada e pelo desenvolvimento de cepas resistentes aos antirretrovirais, que podem causar a temida falha terapêutica, pois os pacientes submetidos a tratamentos contínuos com combinações de drogas apresentam no decorrer do tratamento menos aderência com tendência a acumular resistência aos antirretrovirais (Palella, Delaney *et al.*, 1998) (Cozzi-Lepri, Phillips *et al.*, 2008).

No início do tratamento o vírus é exposto a uma mudança no seu meio ambiente, nesse momento recombinações são potencialmente importantes para a geração de cepas, que combine as várias mutações, exigidas para o aumento de resistência no tratamento (Ramirez, Simon-Loriere *et al.*, 2008).

Os estudos da diversidade genética na resistência as drogas, são de extrema importância no tratamento de indivíduos infectados com o HIV-1 de subtipos não B, pois o regime terapêutico presentemente em uso foi desenvolvido visando o subtipo B, que pode não ser igualmente efetivo nos subtipos não B. Essas diferenças genéticas entre os subtipos pode ser um ponto crítico para a vigilância as resistências, com a expansão do tratamento

com antirretrovirais para várias regiões do mundo, onde diversos vírus dos subtipos não B predominam (Kantor, Katzenstein *et al.*, 2005). Em alguns estudos verificou-se que, as infecções do HIV-1 subtipos não-B, são menos susceptíveis a HAART e associadas estatisticamente a uma progressão mais rápida dos padrões mutacionais pós HAART, em comparação aos isolados do subtipo B (Spira, Wainberg *et al.*, 2003).

As resistências aos antirretrovirais podem ser primárias, podendo ocorrer em pacientes, que não foram submetidos a tratamento prévio com as drogas. O conhecimento das cepas que apresentam resistência primária na população pode ser útil na prevenção e na decisão de cuidados nos tratamentos aplicados contra a doença, pois está correlacionado com vários resultados adversos, inclusive a rápida queda do número de células T CD4+ durante o curso da doença (Pillay, Bhaskaran *et al.*, 2006; Buskin, Ellis *et al.*, 2008)

O número de pacientes infectados com cepas HIV-1 apresentando resistências primárias aos antirretrovirais vem crescendo no Brasil (Sa-Filho, Kallas *et al.*, 2007). Em um estudo realizado na cidade de Santos, a prevalência encontrada está entre as mais altas descritas até a data no Brasil ou no mundo todo (Sucupira, Caseiro *et al.*, 2007).

Também existe a possibilidade de ocorrer resistência cruzada aos fármacos, onde populações de vírus demonstram diminuição da susceptibilidade a outro antirretroviral, que ainda não foi utilizado no tratamento e pertence a uma classe específica desta droga, inclusa na terapia (Call, Saag *et al.*, 2001).

As mutações associadas a resistências podem ser classificadas em principais e secundárias. Mutações principais são capazes de reduzir a suscetibilidade à determinada droga (s) por conta própria e as mutações secundárias são capazes de reduzir a suscetibilidade à droga quando em combinação com a mutação primária ou aumenta o *fitness* de cepas virais com a mutação primária. (Wilson, Bean *et al.*, 2000; Call, Saag *et al.*, 2001).

Mais de 200 mutações são associadas à resistência aos antirretrovirais entre as 6 classes de antirretrovirais licenciadas para uso clínico, incluindo mutações principais e secundárias (Shafer, 2008)

Apesar de todas as inconveniências já mencionadas durante o tratamento, o risco de morbidade e mortalidade dos pacientes tratados com as drogas antirretrovirais esta diminuindo e conseqüentemente aumentando o tempo de vida dos mesmos (Schneider, Gange *et al.*, 2005; Lundgren e Mocroft, 2006).

Desde 1995 o Brasil tem uma história de acesso universal e gratuito aos mesmos medicamentos que são prescritos nos países desenvolvidos (Schneider, Gange *et al.*, 2005).

Hoje existem 25 drogas pertencentes a 6 diferentes classes de antirretrovirais aprovadas no mundo para o tratamento do HIV-1. O progresso para aids está associado a altos níveis de RNA, assim o objetivo do tratamento é reduzir a níveis não detectáveis (carga viral) (Greene, 2008)

Vários experimentos demonstram que combinações de três ou mais drogas antirretrovirais podem alcançar supressão máxima da carga viral e certo atraso na seleção de mutações associadas à resistência (Greene, 2008). E no caso dos pacientes com falência virológica para as classes ITRN, ITRNN e IP, existem novas classes de drogas disponíveis: inibidores da integrase, inibidores de receptores e inibidores de fusão

1.8.1 Inibidores da Transcriptase Reversa Análogos Nucleosídeos (ITRN)

No processo de transcrição reversa os ITRNs substituem de forma competitiva os nucleosídeos verdadeiros. Durante a polimerização dos vírus, em vez de usar um nucleotídeo verdadeiro a RT passa a incorporar um falso nucleotídeo, que impede a continuidade da síntese da cadeia de DNA, interrompendo o ciclo replicativo (Shafer, 2002). Em 1987 o Zidovudine (AZT) foi à primeira droga disponível para o tratamento dos pacientes infectados com o HIV-1. Esta droga foi inicialmente desenvolvida como quimioterápico (Hughes, Barber *et al.*, 2008).

1.8.2 Inibidores da Transcriptase Reversa Não Nucleosídeos (ITRNN)

São pequenas moléculas que tem forte afinidade pelo sítio hidrofóbico, localizado próximo ao domínio catalítico da RT. A ligação dos inibidores afeta a

flexibilidade da enzima, bloqueando a síntese do DNA. (Esnouf, Ren *et al.*, 1997).

Nevirapina (NVP) foi a primeira droga liberada dessa classe para tratamento (Bowersox, 1996). Etravirine é a segunda geração de ITRNN e apresenta uma alta barreira genética em relação aos outros ITRNN (Hughes, Barber *et al.*, 2008).

1.8.3 Inibidores da Protease

A enzima da PR do HIV-1 tem a forma de dímero com a função de aderir a sítios específicos de uma grande poliproteína precursora de enzimas necessárias à formação de partículas virais, no período que antecede o encapsulamento do vírus e por meio de clivagem ela libera as proteínas estruturais (Clavel e Hance, 2004). O desenho das drogas inibidoras dessa enzima é específico em sua estrutura química e mimetiza os peptídeos virais que normalmente são reconhecidos e clivados pela PR (Roberts, Martin *et al.*, 1990; Erickson e Kempf, 1994). De maneira competitiva a formação dos IPs permite a ocupação do sítio da PR e ocorre a inibição da atividade catalítica da enzima de maneira altamente seletiva (Clavel e Hance, 2004).

O excesso de IPs dentro da célula leva à inibição da replicação do vírus, quando comparada à quantidade natural do substrato natural do HIV-1, mesmo sob a ação dos IPs, continua o processo de encapsulamento e liberação viral das células por mais um ciclo. Por possuírem proteínas imaturas em seu

interior, as partículas virais que tiveram interferência dos IPs perdem a capacidade de infecção e dessa maneira o ciclo de vida do HIV-1 é interrompido (Clavel e Hance, 2004).

Em 1996 foi liberado o primeiro inibidor de protease para uso clínico e atualmente temos outras drogas dessa classe disponível como o Tipranavir, que possui sua atividade voltada para os pontos onde existem mutações que causam resistências para das demais drogas dessa classe (Valdez H, 2005) e também o Darunavir uma nova droga inibidora da protease, que tem uma estrutura similar ao inibidor Amprenavir, mas possui potência mais elevada contra cepas resistentes do vírus HIV-1 (Ghosh, Sridhar *et al.*, 2006).

1.8.4 Inibidores da Integrase

Os inibidores de integrase são uma nova classe de drogas antirretrovirais com um novo mecanismo de ação, que impede a incorporação da cópia de DNA no genoma da célula hospedeira (Hughes, Barber *et al.*, 2008).

Raltegravir é primeira droga inibidora de integrase licenciada, sendo ativa contra resistências do HIV-1 para outras classes de drogas e sinérgica com outros antirretrovirais *in vitro* (Markowitz, (2006)).

1.8.5 Inibidores de Entrada e Fusão

Os inibidores de entrada e de fusão atuam no início do ciclo de vida do HIV-1, que ultimamente tem sido identificado como um promissor alvo para o desenvolvimento de novas drogas (Nishikawa, Oishi *et al.*, 2008).

O Inibidor de Fusão Enfuvirtida (T20) é a primeira droga pertencente a essa nova classe de antiretrovirais, aprovada em 2003 para uso clínico em combinação com outras drogas, é um peptídeo sintético constituído por 36 aminoácidos, que se liga a gp41 do HIV-1 impedindo a fusão do vírus com a célula hospedeira (Lu, Sista *et al.*, 2004; Bai, Wilson *et al.*, 2008; Svicher, Aquaro *et al.*, 2008).

Esta droga não pode ser administrada por via oral o que dificulta muito o seu uso em larga escala, sendo importante o seu uso com um outro fármaco evitando a monoterapia (Hughes, Barber *et al.*, 2008).

Enfuvirtida foi projetada com bases no subtipo B do HIV-1, e as mutações que podem causar resistência para essa droga foram investigadas primeiramente nos indivíduos portadores dessa variante viral, mas tem sido efetiva contra subtipos não-B (D'arrigo, Ciccozzi *et al.*, 2007; Holguin, Faudon *et al.*, 2007). Embora sejam raras informações sobre a eficácia do inibidor de fusão Enfuvirtida (T20), em pacientes portadores do subtipo não-B do HIV-1 (Holguin, Faudon *et al.*, 2007; Nunn, Fonseca *et al.*, 2007)

O Brasil já incluiu o inibidor de fusão Enfuvertida (T20) em tratamentos de pacientes com poucas opções terapêuticas (Nunn, Fonseca *et al.*, 2007).

O Consenso da Sociedade Internacional de aids reconhece apenas as mutações G36D/S, I37V, V38A/M/E, Q39R, Q40H, N42T e N43D, como causadoras de possíveis resistências ao inibidor de Fusão Enfuvertida (T20) (Figura 4) (Johnson, Brun-Vezinet *et al.*, 2008)

Outros autores porém descreveram outras mutações como capazes de gerar resistência ao inibidor de fusão Enfuvertida (T20) (Greenberg e Cammack, 2004; Carmona, Perez-Alvarez *et al.*, 2005; Perez-Alvarez, Carmona *et al.*, 2006).



Figura 4. Mutações conforme IAS (Johnson, Brun-Vezinet *et al.*, 2008)

O inibidor de fusão Enfuvertida (T20), não confere resistência cruzada para outros inibidores, bloqueadores de co-receptores e inibidores da ligação CD4, não afetando a suscetibilidade de nenhuma das outras classes de antirretrovirais (Greenberg e Cammack, 2004; Ray, Harrison *et al.*, 2007).

Um fator importante para a eficácia do inibidor de fusão Enfuvertida (T20) é a expressão dos co-receptores, pois a alta afinidade do vírus com o co-receptor ou mesmo as células que exibem altos níveis de co-receptores de maneira natural ou por ativação do sistema imune, prejudicam a atuação do inibidor de fusão Enfuvertida (T20), porque altos níveis de co-receptores resultam em uma fusão mais rápida da membrana (Reeves, Gallo *et al.*, 2002; Heredia, Gilliam *et al.*, 2007; Ray, Harrison *et al.*, 2007)

Foi desenvolvida uma droga chamada BMS 378806, uma pequena molécula, que ainda não está aprovada para uso clínico, que é capaz de inibir a interação entre gp 120 do HIV-1 e CD4 da célula, impedindo que se processe a entrada do HIV-1 na célula hospedeira (Lin, Blair *et al.*, 2003; Madani, Perdigoto *et al.*, 2004; Kong, Tan *et al.*, 2006) Esta droga pode ser administrada via oral (Guo, Ho *et al.*, 2003).

Os antagonistas de CCR5 não são ativos contra CXCR4 e o Maraviroc é o primeiro antagonista CCR5 licenciado em 2007 para uso clínico . Possui ação de interação com o co-receptor CCR5 evitando as mudanças conformacionais na V3 da gp120 e prevenindo a entrada do HIV-1 na célula hospedeira (Brumme, Goodrich *et al.*, 2005; Hughes, Barber *et al.*, 2008).

Os inibidores ou antagonistas de CCR5 são novas opções para os tratamentos de pacientes com falha virológica, mesmo não sendo eficazes para indivíduos infectados com HIV-1 que utilizam os co-receptores CXCR4 (Wilkin, Su *et al.*, 2007).

Tabela 2: Drogas Antirretrovirais Aprovadas pelo FDA

Drogas Antiretrovirais	Data de Aprovação
Inibidores de Entrada	
Maraviroc (UK-427,857, Selzentry)	6/ago/07
Inibidores de Fusão	
Enfuertide (T20, Fuzeon)	13/mar/03
Inibidores da Integrase	
Raltegravir (MK-0518, Isentress)	12/out/07
Inibidores da Transcriptase Reversa	
Análogos Nucleosídeos	
Abacavir(ABC, Ziagen)	17/dez/98
Combivir	27/set/97
Didanonise (ddI, Videx)	9/out/91
Entricitabine (FTC, Emtriva)	2/jul/03
Epzicom	2/ago/04
Stavudine (d4T, Zerit)	24/jun/94
Lamivudine (3TC, Epivir)	17/nov/95
Tenofovir (DF, Viread)	26/out/01
Trizivir	14/nov/00
Truvada	2/ago/04
Videx EC	31/out/00
Zalcitabine (ddC, Hivid)	19/jun/92
Zidovudine (AZT, Retrovir)	19/mar/87
Inibidores Não-Nucleosídeos	
Delavirdine (DLV, Rescriptor)	4/abr/97
Efavirenz (EFV, Sustiva)	17/set/98
Etravirine (TMC 125, Intelence)	18/jan/08
Nevirapine (NVP Viramune)	21/jun/96
Inibidores da Protease	
Amprenavir(AMP, Agenerase)	15/abr/99
Atazanavir (ATZ, Reyataz)	20/jun/03
Darunavir (TMC-114, Prezista)	23/jun/03
Fosamprenavir (GW-43908, Lexiva)	20/out/03
Indinavir (IDV, Crixivan)	13/mar/96
Lopinavir (ABT-378, Kaletra)	15/set/00
Nelfinavir (NFV, Viracept)	14/mar/97
Ritonavir (RTV, Norvir)	1/mar/96
Saquinavir (SQV, Fortovase, Invirase)	7/nov/97
Tipranavir (TPV, Aptivus)	22/jun/05
Invirase	6/dez/95

1.9 Identificação das Mutações de Resistência do HIV-1 aos Antirretrovirais

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

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

- ✓ Uma outra maneira é correlacionar as mutações encontradas e a resposta virológica a um novo regime de tratamento (Shafer, 2002)

Estudos clínicos consideram que o teste de genotipagem é importante para pacientes em terapia de resgate. (Shafer, 2002; Haubrich, Kemper *et al.*, 2005)

A IAS possui uma lista consensual de mutações associadas à resistência, mas que não é seguida por todos algoritmos, isso continua sendo um dos maiores problemas enfrentados pelos clínicos, pois não existe um consenso para interpretar as mutações.

O teste de fenotipagem acrescenta informações complementares aos testes de genotipagem, porém por serem mais difíceis de serem realizados são menos disponíveis para os clínicos (Gallego, Martin-Carbonero *et al.*, 2004).

Há no mercado para comercialização alguns métodos fenotípicos, Antivirogram (Virco Mechelen, Belgium), PhenoSense (ViroLogic, South San Francisco, Calif) e Phenoscript (Viralliance-SAS) (Soriano, 2005)

2. Justificativa

O uso de HAART reduziu dramaticamente a morbidade e mortalidade entre pacientes infectados com o HIV-1 (Palella, Delaney *et al.*, 1998; Jaggy, Von Overbeck *et al.*, 2003)

Existem vários entraves para o pleno sucesso da terapia antirretroviral combinada, que tem como objetivo reduzir os níveis de carga viral (Greene, 2008). O principal deles é o surgimento de cepas resistentes aos medicamentos.

O presente estudo foi direcionado aos pacientes em tratamento que apresentam falha virológica para uma das classes de antirretrovirais (ITRN), (ITRNN), (IP) e que ainda não foram submetidos a tratamentos com a nova classe de inibidores de entrada sendo possíveis candidatos a tratamentos com os mesmos.

Os inibidores de Entrada/fusão têm como alvo a região do envelope, que é muito variável, sendo assim, possível à presença de mutações de resistência pré-tratamento.

Neste sentido precisamos verificar a frequência de mutações que geram resistência para definir a necessidade de testes de genotipagem pré-tratamento.

3. Objetivos do Estudo

- ✓ Analisar a resistência primária aos medicamentos inibidores de entrada em amostras de pacientes HIV-1 positivos, com falha virológica para os inibidores da protease ou RT.
- ✓ Determinar o uso do co-receptor por estas cepas.

4. Materiais e Métodos

4.1 Casuística e Métodos

Foram avaliados 100 pacientes positivos para o HIV-1, com idade igual ou superior de 18 anos, realizando tratamento no CRTA (Centro de Referência e Treinamento Aids de São Paulo), que utilizaram drogas antirretrovirais (inibidores de RT e ou protease), e para os quais tivesse sido solicitado teste de genotipagem por falência virológica (CV > 5000 cópias/ml). Os pacientes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido. Foram coletados dados sócio-demográficos, epidemiológicos, laboratoriais e clínicos, que foram armazenados (Anexo A).

Foram coletados 10mL de sangue em tubo de EDTA. O DNA de cada amostra foi extraído e após as reações de PCR e sequenciamento foram submetidos à análise de mutações, que conferem resistência aos inibidores de ligação (BMS 378806) e fusão Enfuvertida (T20).

A subtipagem do HIV-1 e a análise do tipo de co-receptor utilizado pelo HIV-1, também foram determinadas. A utilização dessas amostras foi aprovada pelo Comitê de Ética do CRT (Centro de Referência e Treinamento da Aids de São Paulo).

4.2 Extração de DNA e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

O DNA de cada amostra foi extraído a partir de 200 µl do componente celular do sangue tratado com anticoagulante (EDTA), após separação do plasma, com o *Kit* de extração *QIAamp DNA Blood Mini Kit* (QIAGEN, GmbH, Hilden, Alemanha) conforme protocolo do fabricante. Para a detecção do pró-vírus (DNA) foi amplificado um fragmento de 1489 pb da região do envelope do genoma do HIV-1. Foi utilizada a técnica de PCR *nested* para amplificação dos genes do envelope.

Na primeira reação foram utilizados os *primers* de cada um dos iniciadores ED5 e 2142 (*outer*) e na segunda ED31 e gp41/T20_2AS (*inner*). (Delwart, Shpaer *et al.*, 1993; Carmona, Perez-Alvarez *et al.*, 2005; Perez-Alvarez, Carmona *et al.*, 2006)

A amplificação foi realizada em um termociclador Eppendorf automático (Hamburgo /Alemanha) da seguinte forma: um ciclo inicial de 94° C por 1 min, seguido de 35 ciclos de 94° C por 45 seg, 55° C por 45 seg e 72° C por 2 min e extensão final de 72°C por 10 min na primeira amplificação e na segunda amplificação um ciclo inicial de 94° C por 1 min, seguido de 35 ciclos de 94°C por 1 min, 55° C por 1 min e 72° C por 1:30 min e extensão final de 72° por 10 min. Foram adicionados 5µl do DNA a 50 µl da solução de amplificação descrita a seguir:

Água Milliq Depc	33,2 µl
Tampão 10x (1,5 mM MgCL2) Amersham Pharmacia biotech	4,5µl
dNTPs 10mM Amersham Pharmacia biotech	2,0µl
MgCL2 50mM Introgen	1,0µl
<i>Primer</i> (5 pmoles/ul)	2,0µl
<i>Primer</i> (5 pmoles/ul)	2,0µl
Taq polimerase (5U/ul) Invitrogen	0,3µl
Amostra	5,0µl

Tabela 3. Seqüência de *primers* utilizados para amplificar a região do envelope:

PCR primeira amplificação

ED5 (*outer*) 5' –Atg ggA TCA AAg CCT AAA gCC ATg Tg -3'

HIV *env* 2142 5' – GGTGAGTATCCCTGCCTAAC – 3'

(*outer*)

PCR segunda amplificação

ED31 (*inner*) 5' – CCT CAg CCATTA CAC Agg CCT gTC CAA Ag – 3'

gp41T20_2as 5' – CTACCAAGCCTACTATC – 3'

(*inner*)

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

4.3 Sequenciamento e Análise de Resistência

Os produtos da segunda amplificação foram purificados com o *Kit QIAquick* (QIAGEN, Germany, Hilden, Alemanha) conforme protocolo do fabricante. O DNA foi quantificado utilizando-se o padrão *Low DNA mass Ladder* (Invitrogen).

Foram adicionados 15-45 ng de DNA à reação de sequenciamento, seguindo o protocolo do fabricante do *Kit ABI 3100* seqüenciador com o *ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction* (Applied Biosystems, Foster City, CA). A reação de sequenciamento foi realizada em termociclador automático com 25 ciclos de 96°C por 10 seg, 50°C por 5 seg e 60°C por 4 min.

O produto da reação de sequenciamento foi amplificado com a adição de 80 μ l de isopropanol 80% e, após agitação, mantido à temperatura ambiente por 15 min. O material foi centrifugado por 30 min, em microcentrifuga Eppendorf (12500g), sendo o precipitado lavado duas vezes com 100 μ l de etanol 70%. Foram adicionados ao precipitado seco 5 μ l de formamida e 1 μ l de tampão. Foram utilizados 2 μ l da mistura para a eletroforese em seqüenciador automático (*ABI 377 Sequencer; ABI; Applied Biosystems*) usando os seguintes *primers*: ED31, gp41/T20_2as, ED33, gp41/T20_1s e gp41/T20_6as (Delwart, Shpaer *et al.*, 1993; Carmona, Perez-Alvarez *et al.*, 2005; Perez-Alvarez, Carmona *et al.*, 2006). As seqüências foram editadas usando programa *SEQUENCHER* (GENECODES)

Tampão da reação de sequenciamento

<i>Mix</i> (Kit ABI Prism)	4,0 µl
<i>Primer</i> (1,0 pmol/ul)	1,0 µl
DNA purificado (15-45 ng)	1,0 a 2,00 µl
Água MilliQ qsp	10,0 µl
Amostra primeira amplificação	1,0 a 3,0

Tabela 4 . Seqüência de *primers* utilizados no sequenciamento

ED31	5'--CCT CAg CCA TTA CAC Agg CCT Agg CCT gTC CAA Ag-3'
gp41 T20_2as	5'-CTACCAAGCCTCCTACTATC-3'
ED33	5'-TTA Cag TAg AAA AAT Tcc CCT CCT-3'
gp41 T20_1s	5'-TGGAGGAGGAGATATGAGG-3'
gp41 t20_6AS	5'-CAGATGYGTTGMGCCTC3'

As seqüências das amostras foram alinhadas e comparadas com a seqüência de aminoácidos que compõem a proteína do envelope da cepa padrão do vírus HIV-1 HXB2 utilizando programa *BIOEDIT*, um editor de seqüências biológicas e programa de análises Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41: 95-98)

Analizamos a presença de mutações de aminoácidos em determinadas posições para BMS 378806 como M426L ;M475I e M434I (Guo, Ho *et al.*, 2003; Lin, Blair *et al.*, 2003; Madani, Perdigoto *et al.*, 2004). Para a Enfuvirtida (T20), foram analisadas, seguindo a lista de mutações IAS Q36D/S;I37V;

V38A/M/E;Q39R;Q40H;N42T e N43D (Johnson, Brun-Vezinet *et al.*, 2008) Também analisamos outras mutações que já foram descritas como associadas à resistência ao inibidor de fusão Enfuvertida (T20) como G36D/S, I37V, V38A/M, Q39R/H, Q40H, N42T/D/Q/H, N43D/K/Q/S, L44M, L45M, R46M, I69V E E137Q (Rimsky, Shugars *et al.*, 1998; Wei, Decker *et al.*, 2002; Greenberg e Cammack, 2004; Perez-Alvarez, Carmona *et al.*, 2006).

Para a análise da subtipagem das cepas virais da região do envelope do HIV-1, as seqüências em forma “fastas” foram submetidas utilizando o algoritmo Rega HIV Subtyping Tool Version 2.0, disponível no endereço <http://WWW.Bioafrica.net/subtypetool/html> e a análise de co-receptor através da submissão das seqüências “fastas” utilizando o algoritmo Geno2pheno Versão 1.1 disponível no endereço <http://coreceptor.bionf.mpi-inf.mpg.de/>.

4.4 Método Estatístico

As análises estatísticas foram feitas utilizando-se o pacote de programas Epi-info (version 6.04). Variáveis com um *p value* menor que 0.05 foram consideradas estaticamente significativas.

5. Resultados

Foram analisadas 100 amostras de pacientes em falha de tratamento com inibidores de protease e RT, que não faziam uso de inibidores de fusão (Enfuvertida) ou ligação (BMS 378806).

Tabela 5: Características sócio-epidemiológicas de 100 pacientes envolvidos no estudo.

CARACTERÍSTICAS	TOTAL 100 n°(%)
SEXO	
Feminino	18 (18)
Masculino	82 (82)
ESCOLARIDADE	
Primário	4 (4)
1º grau	28 (28)
2º grau	42 (42)
Superior	26 (26)
USO DE DROGAS INTRAVENOSAS	
Sim	9 (9)
Não	91 (91)
RELAÇÃO SEXUAL DESPROTEGIDA	
Sim	84 (84)
Não	16 (16)
OPÇÃO SEXUAL	
Bissexuais 11 (11)	11 (11)
Homossexuais	40 (40)
MEDIA DA IDADE DOS PACIENTES	45 anos (dp 7.6)
MEDIA DO TEMPO DE TRATAMENTO	11 anos (dp 3.4)
MEDIA DO N° DE PARCEIROS SEXUAIS NO ULTIMO ANO	08 (dp 13)
MEDIANA DA CARGA VIRAL	>100.000

Das 100 (cem) amostras analisadas, 87(87%) foram positivas e 13 (13%) negativas para o DNA proviral do HIV-1. Dentre as amostras positivas 80 (92%) foram seqüenciadas e 07(8%) não sequenciaram, por prováveis inserções ou deleções.

Das 80 amostras seqüenciadas, 73 (91%) foram classificadas como subtipo B do vírus HIV-1; 2 (2,5%) como recombinantes (1 B/F e 1 BC) e 5 (6%) como subtipo F.

Em relação aos co-receptores utilizados pelo vírus, 56 (70%) amostras foram classificadas como CCR5 e 24 (30%) CXCR4.

A freqüência de amostras resistentes para Enfuvertida (T20), depende principalmente do critério utilizado. Se levarmos em consideração as mutações descritas pela IA(Johnson, Brun-Vezinet *et al.*, 2008), apenas 1 amostra era resistente (42T).

Se considerarmos todas as mutações descritas, como associadas à resistência ao inibidor de fusão Enfuvertida (T20), (G32H/R, G36D/S, I37V, V38A/M/E, Q39R/T, Q40H, N42T/D/Q/H, N43D/K/S/Q, L44M, L45M, R46M , I69Ve E137Q (Rimsky, Shugars *et al.*, 1998; Wei, Decker *et al.*, 2002; Greenberg e Cammack, 2004; Perez-Alvarez, Carmona *et al.*, 2006), a freqüência é maior 8 (10%) de casos. (Tabela 6).

Para o inibidor de ligação BMS 378806 foram consideradas as seguintes mutações M426L / M475I e M434I (Guo, Ho *et al.*, 2003; Lin, Blair *et al.*, 2003; Wang, Zhang *et al.*, 2003; Madani, Perdigoto *et al.*, 2004).

Das 80 amostras, 6 (7,5%) apresentaram pelo menos uma dessas mutações, M426L em três e M434I em outras três amostras. Na Tabela 6 estão listadas as mutações encontradas nas regiões que codificam as proteínas gp120 e gp41 do HIV-1 nas 80 amostras sequenciadas. Nas figuras 5 e 6 estão descritos os polimorfismos encontrados entre as posições 30-71 da gp41 (região associada à resistência primária ao Enfuvertida) e entre as posições 410-450 da gp120 (região associada à resistência primária ao BMS378806) respectivamente.

Tabela 6: Mutações encontradas nas regiões gp120 e gp41 do envelope do vírus das 80 amostras analisadas.

MUTAÇÕES NA REGIÃO GP120 PARA <u>BMS 378806</u>	Nº	MUTAÇÕES NA REGIÃO GP41 PARA <u>T20(ENFUVERTIDE)</u>	Nº
M426L	3	N42D	1
M434I	3	N42H	1
		N42T	1
		L44M	2
		R46M	3
TOTAL	6	TOTAL	8

Figura 5: Polimorfismos encontrados entre as posições 30-71 da gp 41 (região relacionada à resistência ao Enfuvertida)

A30	R31	Q32	L34	S35	N42	L44
T 3(4%)	K 1(1,3%)	L 13(16,3%)	M 2(3%)	T 1(1,3%)	D 1(1,3%)	M 2(3%)
					H 1(1,3%)	
					R 1(1,3%)	
					S 5(6,3%)	
					T 1(1,3%)	
R46	E49	A50	Q52	H53	L54	Q56
M 3(4%)	D 1(1,3%)	V 1(1,3%)	H 1(1,3%)	Q 1(1,3%)	M 33(41,3%)	K 1(,3%)
K 7(9%)				R 2(3%)		
I62	Q66	I69	Resistência coforme consenso			
V 2(3%)	R 1(1,3%)	L 2(3%)	Resistência coforme referências			
			Mudanças em relação ao HBX2			

Figura 6: Freqüência dos polimorfismos entre as posições 410-450 da gp120 (região relacionada com a resistência ao BMS 378806).

G410	S411	D412	T413	I414	T415	L416
E 4(5%)	A 2(3%)	A 1(1,3%)	I 4(5%)	V 1(1,3%)	I 6(8%)	I 1(1,3%)
I 4(5%)	D 6(8%)	E 5(6,3%)	L 1(1,3%)		R 1(1,3%)	
K 3(4%)	E 3(4%)	G 11(13,3%)	N 19(24%)		S 1(1,3%)	
L 1(1,3%)	G 2(3%)	K 3(4%)	P 1(1,3%)		V 1(1,3%)	
N 6(8%)	K 5(6,3%)	N 14(18%)	Y 1(1,3%)			
P 1(1,3%)	L 1(1,3%)	S 5(6,3%)				
S 4(5%)	N 13(16,3%)	T 8(10%)				
T 6(8%)	P 2(3%)	V 1(1,3%)				
V 3(3,8%)	T 5(6,3%)					
W 1(1,3%)	V 1(1,3%)					
P417	R419	K421	Q422	I423	I424	M426
L 1(1,3%)	K 4(5%)	R 5(6,3%)	R 1(1,3%)	F 2(3%)	V 16(20%)	L 3(4%)
Q 9(11,3%)	Q 1(1,3%)					R 3(4%)
S 2(3%)						T 1(1,3%)
						K 3(4%)
Q428	K429	V430	K432	A433	M434	A436
W 32(40%)	E 72(90%)	T 1(1,3%)	Q 1(1,3%)	S 3(4%)	I 3(4%)	N 1(1,3%)
	G 2(3%)		R 8(10%)			
	Q 2(3%)					
P437	I439	S440	G441	K442	I443	R444
A 4(5%)	S 1(1,3%)	A 7(9%)	E 2(3%)	E 2(3%)	L 1(1%)	I 1(1,3%)
N 1(1,3%)	V 2(2,3%)	D 1(1,3%)		H 1(1,3%)	V 1(1%)	K 5(6,3%)
		E 4(5%)		I 5(6,3%)		L 1(1,3%)
		G 1(1,3%)		K 2(3%)		N 8(10%)
		K 7(9%)		L 7(9%)		S 11(14%)
		P 1(1,3%)		M 1(1,3%)		T 4(5%)
		Q 9(11,3%)		N 3(4%)		Y 1(1,3%)
		R 13(16,3%)		P 4(5%)		
				R 1(1,3%)		
				S 1(1,3%)		
				V 1(1,3%)		
				Y 3(4%)		
S446	N448	T450				
A 1(1,3%)	I 1(1,3%)	S 1(1,3%)				
L 3(4%)	K 1(1,3%)					
N 3(4%)	S 1(1,3%)					
T 4(5%)						
V 2(3%)						

Resistência conforme referências

Mudanças conforme HBX2

As amostras com mutações para Enfuvirtida (T20) foram todas classificadas como subtipo B do HIV-1(Tabela 7). Para a presença de mutações relacionadas com resistência ao BMS 378806 observamos maior frequência de mutações para os subtipos não-B 28,6% (2/7) em relação ao subtipo B 5,5% (4/73). Esta diferença foi estatisticamente significativa ($p=0,03$ IC 95%) (Tabela 7).

Tabela 7: Dados em relação ao subtipo e a presença de mutações para Enfuvirtida (T20) e BMS 378806.

Subtipo	Presença de mutação para T20		Presença de mutação para BMS		Total de amostras	
	n°	%	n°	%	n°	%
B (N=73)	8	11	4	5,5	12	16,5
Não B (N=7)	0	0	2	28,6	2	28,6

Nas análises das amostras o HIV-1, utilizou os co-receptores CCR5 em 56 (70%), sendo 23 (41%) com carga viral igual ou maior que 100.000 cópias /mL. Os co-receptores CXCR4 foram utilizados pelo vírus em 24(30%) das amostras, das quais 7 (29,1%) apresentaram carga viral igual ou maior que 100.000 cópias/mL (Tabela 8). Não houve associação entre a carga viral e o co-receptor utilizado pelo HIV-1 ($p=0,3135$).

Tabela 8: Dados em relação o uso de co-receptores e a carga viral das amostras HIV-1 positivo

Carga viral	5000-10000 Cópias/ml	10000-50000 Cópias/ml	50000-100000 Cópias/ml	>100000 Cópias/ml
Co-receptores utilizados pelo vírus HIV-1				
CCR5	16/56 (28,5%)	12/56 (21,4%)	5/56 (8,9%)	23/56 (41%)
CXCR4	5/24 (20,8%)	7/24 (29,1%)	5/24 (20,8%)	7/24 (29,1%)

Quando analisamos a frequência de mutações relacionadas com resistência primária ao Enfuvirtida (T20) e ao BMS 378806 em relação ao tipo de co-receptor utilizado pelo HIV-1, não observamos diferença estatisticamente significativa ($p=0,60$) entre os grupos (Tabela 9).

Tabela 9: Frequência de resistência ao Enfuvirtida e ao BMS 378806 de acordo com o co-receptor de entrada.

Tipo de co-receptor utilizado pelo vírus HIV-1	Presença de mutação para Enfuvirtida (T20)		Presença de mutação para BMS 378806		Total de amostras	
	n°	%	n°	%	n°	%
CCR5 (n=56)	5	8,9	4	7,1	9	16
CXCR4 (n=24)	3	12,5	2	8,3	5	21

6. Discussão

O estudo da análise de resistência primária aos medicamentos inibidores de ligação BMS 378806, inibidores de Fusão Enfuvertida (T20) e os inibidores de CCR5 são de extrema importância para as políticas de tratamentos, pois indicam se a população irá responder as novas drogas.

Os inibidores de entrada possuem uma vantagem adicional em relação às demais classes de antirretrovirais liberadas para tratamentos em pacientes doentes de aids. Atuam fora da célula e no início do ciclo viral do HIV-1, evitando a necessidade da penetração do agente terapêutico na célula hospedeira.

Conforme o consenso da Sociedade Internacional aids (IAS/USA), as mutações G36D/S, I37V, V38A/M/E Q39R, Q40H, N42T e N43D, estão associadas com resistência para o inibidor de fusão Enfuvertida (T20), nesse estudo foi encontrada apenas uma mutação N42T, que esta inclusa nessa relação citada (Johnson, Brun-Vezinet *et al.*, 2008)

Também foram identificadas em nossas análises outras 07 mutações na gp 41, N42D/H/N/, L44M e R46M, que de acordo com estudos realizados por Carmona, Perez-Alvarez *et al.*, 2005 poderiam estar associadas com resistência ao inibidor de fusão Enfuvertida (T20).

Tabela 10: Descrição dos resultados publicados da resistência primária em pacientes não tratados com o inibidor de Fusão Enfuvertida (T20).

Referência	Critério utilizado para classificação das mutações	Ano	Pais	Nº de Pacientes	Frequência de Mutações (%)	Perfil dos pacientes
(Oliveira, Martins et al., 2009)	IAS	2008	BRASIL	65	7,6	Tratados com ARVS
				1079	0,7	Não tratados com ARVS
(Carmona, Perez-Alvarez et al., 2005)	Q32H/R, V38A/M, Q39R/HQ40R, N42/D/Q/H, N43/S/K/Q, LM44, R46M/E V69I IAS	2005	Espanha	200	10	Tratados com ARVs
					0,5	
(Peuchant, Capdepont et al., 2007)	IAS	2007	França	55	3,75	Tratados com ARVs

Conforme descrito na tabela 10, os nossos resultados são similares aos estudos realizados por Carmona, Perez-Alvarez *et al.*, 2005 e Peuchant, Capdepont *et al.*, 2007 com pacientes não tratados com o inibidor de fusão Enfuvertida (T20). Quando usado o critério da IAS a frequência à prevalência de cepas resistentes é baixa. Quando um número maior de mutações é adicionado ao critério, à prevalência aumenta consideravelmente. Isto aconteceu tanto em nosso estudo quanto no de Carmona, Perez-Alvarez *et al.*, 2005. Nos não encontramos dados similares a Oliveira, Martins *et al.*, 2009 que encontraram

uma alta prevalência de resistência usando o critério da IAS em pacientes tratados com inibidores de protease e RT mas não nos pacientes não tratados. Nossos pacientes tinham um longo tempo de tratamento ARV e muitos anos de infecção. Nosso estudo não mostrou associação entre mutação ou polimorfismos e tempo de infecção.

Em relação aos subtipos ao contrário de Carmona, Perez-Alvarez *et al.*, 2005, nós não encontramos associações entre resistência ao Enfuvirtida (T20) e subtipos. Isso pode ser devido à população estudada, pois avaliamos apenas subtipos B, F e recombinantes (B /F) (B /C), enquanto eles puderam avaliar amostras de subtipos mais variados.

Não identificamos mutações nos códons 36-38, importantes determinantes da suscetibilidade para o inibidor de fusão Enfuvirtida (T20), e está de acordo com a visão de que esta região é muito conservada entre os diferentes subtipos do grupo M do vírus HIV-1 (Menzo, *et al.*, 2004 (Aquaro, D'arrigo *et al.*, 2006).

Também não encontramos casos com mais de uma mutação. Esse achado está condizente com os já descritos em outros trabalhos, no qual freqüentemente as mutações para esse inibidor ocorrem sozinhas em pacientes não tratados com inibidores de fusão (Menzo, Castagna *et al.*, 2004; Aquaro, D'arrigo *et al.*, 2006)

Para BMS 378806 encontramos mutações importantes que mesmo sozinhas conferem grande grau de resistência à droga. A mutação M426L situada próxima ao bolsão de ligação entre a gp120 e o CD4 confere altos

níveis de resistência e a M434I localizada fora do bolsão de ligação do CD4, confere resistência pois causa mudanças conformacionais na gp 120 (Guo, Ho *et al.*, 2003; Lin, Blair *et al.*, 2003; Wang, Zhang *et al.*, 2003).

Foi significativo o número de mutações para BMS 378806 nas amostras classificadas como subtipo não B do HIV-1. Esse resultado consolida as afirmações de Wang, Zhang, et al .2003, de que o subtipo B é mais suscetível ao inibidor de ligação BMS 378806. No caso da aprovação dessa droga para uso nos tratamentos dos pacientes doentes de aids, serão necessários maiores esclarecimentos da eficácia da mesma em relação aos subtipos não B do vírus HIV-1

Dos 100 pacientes envolvidos no estudo 82(82%) eram do sexo masculino e 18(18%) do sexo feminino, com idade média de 45 anos.Todos os pacientes envolvidos já apresentavam falha virológica para uma das classes de drogas empregadas nos tratamentos.

Os pacientes apresentaram uma média de tratamento de 11 anos e 84 (84%) relataram que a via de contaminação foi através de relações sexuais desprotegidas, com média de 8 parceiros sexuais no último ano.

Nessa população estudada 26(26%) dos pacientes possuíam grau de instrução superior, 42(42%) segundo grau completo, 28(28%) primeiro grau completo e 4 (4%) primário incompleto. Aparentemente os indivíduos têm acesso a informações de prevenção e esclarecimentos da doença. No entanto é impressionante o número de parceiros e de relações sexuais desprotegidas no ano anterior.

Nos resultados de nossos estudos, encontramos uma grande prevalência do subtipo B do HIV-1, está de acordo com outros estudos realizados na cidade de São Paulo onde o subtipo B prevalece dentre outras pequenas proporções de outros subtipos como F,C,B/C e B/F (Sabino, Shpaer *et al.*, 1994; Oliveira, Martins *et al.*, 2009).

Não pudemos demonstrar uma associação entre carga viral e presença de cepa CXCR4, diferente de outros estudos, que associaram o uso do co-receptor CCR5 pelo HIV-1 com baixos níveis de carga viral, (Perez-Alvarez, Carmona *et al.*, 2006; Huang, Eshleman *et al.*, 2007; Wilkin, Su *et al.*, 2007). Uma das limitações do nosso estudo é o fato de ser um estudo de corte transversal que não permite uma análise mais detalhada dos pacientes.

As amostras classificadas como CCR5, são possíveis candidatos para receberem as medicações que bloqueiam este co-receptor. Esse antirretroviral não apresenta eficácia, contra as cepas classificadas como CXCR4 (Hughes, Barber *et al.*, 2008).

Vale ressaltar que nos resultados de nossas análises, nenhuma amostra mostrou-se resistente a mais de uma droga, o que permite um aumento nas opções de escolha de medicamentos para os tratamentos dos pacientes.

Concluindo: nossos dados mostram que a frequência de resistência ao Enfuvertida (T20) em pacientes não expostos previamente a este medicamento é baixa (1%) se forem consideradas apenas os critérios da IAS, no entanto, a prevalência é alta quando critérios menos restritivos são usados. É extremamente importante definir qual a implicação destes polimorfismos na

resistência ao T20, para que se possa definir a necessidade de introdução de testes de genotipagem antes da indicação desta droga.

7. Conclusão

- ✓ A prevalência de Resistência Primária ao inibidor de fusão Enfuvertida (T20) depende do critério usado na definição das mutações, podendo variar entre 1% (critério IAS) a 10% quando um maior número de mutações são usadas no critério de interpretação.
- ✓ Em nosso trabalho a prevalência de Resistência Primária ao inibidor de ligação BMS 378806 nos subtipos não B do HIV-1 é alta em relação aos subtipos B.
- ✓ Cerca de 30% das amostras foram classificadas como CXCR4 e portanto não poderão se beneficiar com o uso de inibidores do CCR5.

Referências Bibliográficas.

Aiken, C. e D. Trono. Nef stimulates human immunodeficiency virus type 1 proviral DNA synthesis. J Virol, v.69, n.8, Aug, p.5048-56. 1995.

Aquaro, S., R. D'arrigo, *et al.* Specific mutations in HIV-1 gp41 are associated with immunological success in HIV-1-infected patients receiving enfuvirtide treatment. J Antimicrob Chemother, v.58, n.4, Oct, p.714-22. 2006.

Atlas, A., F. Granath, *et al.* Impact of HIV type 1 genetic subtype on the outcome of antiretroviral therapy. AIDS Res Hum Retroviruses, v.21, n.3, Mar, p.221-7. 2005.

Bai, X., K. L. Wilson, *et al.* Impact of the Enfuvirtide Resistance Mutation N43D and the Associated Baseline Polymorphism E137K on Peptide Sensitivity and Six-Helix Bundle Structure. Biochemistry, May 29. 2008.

Balotta, C., A. Berlusconi, *et al.* Prevalence of transmitted nucleoside analogue-resistant HIV-1 strains and pre-existing mutations in pol reverse transcriptase and protease region: outcome after treatment in recently infected individuals. Antivir Ther, v.5, n.1, Mar, p.7-14. 2000.

Bar, S. e M. Alizon. Role of the ectodomain of the gp41 transmembrane envelope protein of human immunodeficiency virus type 1 in late steps of the membrane fusion process. J Virol, v.78, n.2, Jan, p.811-20. 2004.

Barre-Sinoussi, F., J. C. Chermann, *et al.* Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). Science, v.220, n.4599, May 20, p.868-71. 1983.

Bebenek, K., J. Abbotts, *et al.* Specificity and mechanism of error-prone replication by human immunodeficiency virus-1 reverse transcriptase. J Biol Chem, v.264, n.28, Oct 5, p.16948-56. 1989.

Bell, C. M., B. J. Connell, *et al.* Molecular characterization of the HIV type 1 subtype C accessory genes *vif*, *vpr*, and *vpu*. AIDS Res Hum Retroviruses, v.23, n.2, Feb, p.322-30. 2007.

Boden, D., A. Hurley, *et al.* HIV-1 drug resistance in newly infected individuals. Jama, v.282, n.12, Sep 22-29, p.1135-41. 1999.

Bowersox, J. Nevirapine approved by FDA. Food and Drug Administration. NIAID AIDS Agenda, Sep, p.10. 1996.

Brumme, Z. L., J. Goodrich, *et al.* Molecular and clinical epidemiology of CXCR4-using HIV-1 in a large population of antiretroviral-naive individuals. J Infect Dis, v.192, n.3, Aug 1, p.466-74. 2005.

Buonaguro, L., M. L. Tornesello, *et al.* Human immunodeficiency virus type 1 subtype distribution in the worldwide epidemic: pathogenetic and therapeutic implications. J Virol, v.81, n.19, Oct, p.10209-19. 2007.

Buskin, S. E., G. M. Ellis, *et al.* Transmission cluster of multiclass highly drug-resistant HIV-1 among 9 men who have sex with men in Seattle/King County, WA, 2005-2007. J Acquir Immune Defic Syndr, v.49, n.2, Oct 1, p.205-11. 2008.

Call, S. A., M. S. Saag, *et al.* Phenotypic drug susceptibility testing predicts long-term virologic suppression better than treatment history in patients with human immunodeficiency virus infection. J Infect Dis, v.183, n.3, Feb 1, p.401-8. 2001.

Carmona, R., L. Perez-Alvarez, *et al.* Natural resistance-associated mutations to Enfuvirtide (T20) and polymorphisms in the gp41 region of different HIV-1 genetic forms from T20 naive patients. J Clin Virol, v.32, n.3, Mar, p.248-53. 2005.

Cdc. Pneumocystis pneumonia - Los Angeles. MMWR; 30:250-2. 1981.

Clavel, F., D. Guetard, *et al.* Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. Science, v.233, n.4761, Jul 18, p.343-6. 1986.

Clavel, F. e A. J. Hance. HIV drug resistance. N Engl J Med, v.350, n.10, Mar 4, p.1023-35. 2004.

Coffin, J. M. HIV population dynamics in vivo: implications for genetic variation, pathogenesis, and therapy. Science, v.267, n.5197, Jan 27, p.483-9. 1995.

Collin, M., P. Illei, *et al.* Definition of the range and distribution of human immunodeficiency virus macrophage tropism using PCR-based infectivity measurements. J Gen Virol, v.75 (Pt 7), Jul, p.1597-603. 1994.

Cozzi-Lepri, A., A. N. Phillips, *et al.* Detection of HIV drug resistance during antiretroviral treatment and clinical progression in a large European cohort study. Aids, v.22, n.16, Oct 18, p.2187-98. 2008.

Craven, R. C. e L. J. Parent. Dynamic interactions of the Gag polyprotein. Curr Top Microbiol Immunol, v.214, p.65-94. 1996.

Cullen, B. R. Regulation of HIV-1 gene expression. Faseb J, v.5, n.10, Jul, p.2361-8. 1991.

D'arrigo, R., M. Ciccozzi, *et al.* gp41 sequence variability in HIV type 1 non-B subtypes infected patients undergoing enfuvirtide pressure. AIDS Res Hum Retroviruses, v.23, n.10, Oct, p.1296-302. 2007.

Delwart, E. L., E. G. Shpaer, *et al.* Genetic relationships determined by a DNA heteroduplex mobility assay: analysis of HIV-1 env genes. Science, v.262, n.5137, Nov 19, p.1257-61. 1993.

Deng, H., R. Liu, *et al.* Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. Nature, v.381, n.6584, Jun 20, p.661-6. 1996.

Diaz, R. S., E. Leal, *et al.* Selective regimes and evolutionary rates of HIV-1 subtype B V3 variants in the Brazilian epidemic. Virology, v.381, n.2, Nov 25, p.184-93. 2008.

Doms, R. W. Unwelcome guests with master keys: how HIV enters cells and how it can be stopped. Top HIV Med, v.12, n.4, Oct-Nov, p.100-3. 2004.

Eholie, S. e X. Anglaret. Commentary: decline of HIV-2 prevalence in West Africa: good news or bad news? Int J Epidemiol, v.35, n.5, Oct, p.1329-30. 2006.

Erice, A., D. L. Mayers, *et al.* Brief report: primary infection with zidovudine-resistant human immunodeficiency virus type 1. N Engl J Med, v.328, n.16, Apr 22, p.1163-5. 1993.

Erickson, J. e D. Kempf. Structure-based design of symmetric inhibitors of HIV-1 protease. Arch Virol Suppl, v.9, p.19-29. 1994.

Erickson, J. W., S. V. Gulnik, *et al.* Protease inhibitors: resistance, cross-resistance, fitness and the choice of initial and salvage therapies. Aids, v.13 Suppl A, p.S189-204. 1999.

Esnouf, R. M., J. Ren, *et al.* Unique features in the structure of the complex between HIV-1 reverse transcriptase and the bis(heteroaryl)piperazine (BHAP) U-90152 explain resistance mutations for this nonnucleoside inhibitor. Proc Natl Acad Sci U S A, v.94, n.8, Apr 15, p.3984-9. 1997.

Feinberg, M. B., R. F. Jarrett, *et al.* HTLV-III expression and production involve complex regulation at the levels of splicing and translation of viral RNA. Cell, v.46, n.6, Sep 12, p.807-17. 1986.

Fischl, M. A., D. D. Richman, *et al.* The efficacy of azidothymidine (AZT) in the treatment of patients with AIDS and AIDS-related complex. A double-blind, placebo-controlled trial. N Engl J Med, v.317, n.4, Jul 23, p.185-91. 1987.

Gallego, O., L. Martin-Carbonero, *et al.* Correlation between rules-based interpretation and virtual phenotype interpretation of HIV-1 genotypes for predicting drug resistance in HIV-infected individuals. J Virol Methods, v.121, n.1, Oct, p.115-8. 2004.

Gallo, R. C., S. Z. Salahuddin, *et al.* Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. Science, v.224, n.4648, May 4, p.500-3. 1984.

Gao, F., D. L. Robertson, *et al.* A comprehensive panel of near-full-length clones and reference sequences for non-subtype B isolates of human immunodeficiency virus type 1. J Virol, v.72, n.7, Jul, p.5680-98. 1998.

Garcia, J. V. e A. D. Miller. Serine phosphorylation-independent downregulation of cell-surface CD4 by nef. Nature, v.350, n.6318, Apr 11, p.508-11. 1991.

Garrido, C., N. Zahonero, *et al.* Subtype variability, virological response and drug resistance assessed on dried blood spots collected from HIV patients on antiretroviral therapy in Angola. J Antimicrob Chemother, v.61, n.3, Mar, p.694-8. 2008.

Gatignol, A. Transcription of HIV: Tat and cellular chromatin. Adv Pharmacol, v.55, p.137-59. 2007.

Ghosh, A. K., P. R. Sridhar, *et al.* Structure-based design of novel HIV-1 protease inhibitors to combat drug resistance. J Med Chem, v.49, n.17, Aug 24, p.5252-61. 2006.

Gottlieb, M. S., R. Schroff, *et al.* Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. N Engl J Med, v.305, n.24, Dec 10, p.1425-31. 1981.

Greenberg, M. L. e N. Cammack. Resistance to enfuvirtide, the first HIV fusion inhibitor. J Antimicrob Chemother, v.54, n.2, Aug, p.333-40. 2004.

Greene, W. C. Novel targets for HIV therapy. AIDS. 2008.

Guo, Q., H. T. Ho, *et al.* Biochemical and genetic characterizations of a novel human immunodeficiency virus type 1 inhibitor that blocks gp120-CD4 interactions. J Virol, v.77, n.19, Oct, p.10528-36. 2003.

Haubrich, R. H., C. A. Kemper, *et al.* A randomized, prospective study of phenotype susceptibility testing versus standard of care to manage antiretroviral therapy: CCTG 575. Aids, v.19, n.3, Feb 18, p.295-302. 2005.

Hemelaar, J., E. Gouws, *et al.* Global and regional distribution of HIV-1 genetic subtypes and recombinants in 2004. Aids, v.20, n.16, Oct 24, p.W13-23. 2006.

Heredia, A., B. Gilliam, *et al.* Rapamycin reduces CCR5 density levels on CD4 T cells, and this effect results in potentiation of enfuvirtide (T-20) against R5 strains of human immunodeficiency virus type 1 in vitro. Antimicrob Agents Chemother, v.51, n.7, Jul, p.2489-96. 2007.

Ho, D. D., A. U. Neumann, *et al.* Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. Nature, v.373, n.6510, Jan 12, p.123-6. 1995.

Holguin, A., A. Alvarez, *et al.* Differences in the length of gag proteins among different HIV type 1 subtypes. AIDS Res Hum Retroviruses, v.21, n.10, Oct, p.886-93. 2005.

Holguin, A., J. L. Faudon, *et al.* Susceptibility of HIV-1 non-B subtypes and recombinant variants to Enfuvirtide. J Clin Virol, v.38, n.2, Feb, p.176-80. 2007.

Hu, D. J., T. J. Dondero, *et al.* The emerging genetic diversity of HIV. The importance of global surveillance for diagnostics, research, and prevention. Jama, v.275, n.3, Jan 17, p.210-6. 1996.

Hu, W. S. e H. M. Temin. Retroviral recombination and reverse transcription. Science, v.250, n.4985, Nov 30, p.1227-33. 1990.

Huang, W., S. H. Eshleman, *et al.* Coreceptor tropism in human immunodeficiency virus type 1 subtype D: high prevalence of CXCR4 tropism and heterogeneous composition of viral populations. J Virol, v.81, n.15, Aug, p.7885-93. 2007.

Hughes, A., T. Barber, *et al.* New treatment options for HIV salvage patients: an overview of second generation PIs, NNRTIs, integrase inhibitors and CCR5 antagonists. J Infect, v.57, n.1, Jul, p.1-10. 2008.

Hung, M., P. Patel, *et al.* Importance of ribosomal frameshifting for human immunodeficiency virus type 1 particle assembly and replication. J Virol, v.72, n.6, Jun, p.4819-24. 1998.

Jaggy, C., J. Von Overbeck, *et al.* Mortality in the Swiss HIV Cohort Study (SHCS) and the Swiss general population. Lancet, v.362, n.9387, Sep 13, p.877-8. 2003.

Janini, L. M., D. Pieniazek, *et al.* Identification of single and dual infections with distinct subtypes of human immunodeficiency virus type 1 by using restriction fragment length polymorphism analysis. Virus Genes, v.13, n.1, p.69-81. 1996.

Jeang, K. T., H. Xiao, *et al.* Multifaceted activities of the HIV-1 transactivator of transcription, Tat. J Biol Chem, v.274, n.41, Oct 8, p.28837-40. 1999.

Johnson, V. A., F. Brun-Vezinet, *et al.* Update of the Drug Resistance Mutations in HIV-1: Spring 2008. Top HIV Med, v.16, n.1, Mar-Apr, p.62-8. 2008.

Kampinga, G. A., A. Simonon, *et al.* Primary infections with HIV-1 of women and their offspring in Rwanda: findings of heterogeneity at seroconversion, coinfection, and recombinants of HIV-1 subtypes A and C. Virology, v.227, n.1, Jan 6, p.63-76. 1997.

Kang, S. M., F. S. Quan, *et al.* Modified HIV envelope proteins with enhanced binding to neutralizing monoclonal antibodies. Virology, v.331, n.1, Jan 5, p.20-32. 2005.

Kantor, R., D. A. Katzenstein, *et al.* Impact of HIV-1 subtype and antiretroviral therapy on protease and reverse transcriptase genotype: results of a global collaboration. PLoS Med, v.2, n.4, Apr, p.e112. 2005.

Kaplan, A. H., M. Manchester, *et al.* The activity of the protease of human immunodeficiency virus type 1 is initiated at the membrane of infected cells before the release of viral proteins and is required for release to occur with maximum efficiency. J Virol, v.68, n.10, Oct, p.6782-6. 1994.

Kiwanuka, N., O. Laeyendecker, *et al.* Effect of human immunodeficiency virus Type 1 (HIV-1) subtype on disease progression in persons from Rakai, Uganda, with incident HIV-1 infection. J Infect Dis, v.197, n.5, Mar 1, p.707-13. 2008.

Klatzmann, D., E. Champagne, *et al.* T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV. Nature, v.312, n.5996, Dec 20-1985 Jan 2, p.767-8. 1984.

Kong, R., J. J. Tan, *et al.* Prediction of the binding mode between BMS-378806 and HIV-1 gp120 by docking and molecular dynamics simulation. Biochim Biophys Acta, v.1764, n.4, Apr, p.766-72. 2006.

Kuby, J. Immunology. Freeman and Company. 1997.

Kuciak, M., C. Gabus, *et al.* The HIV-1 transcriptional activator Tat has potent nucleic acid chaperoning activities in vitro. Nucleic Acids Res, v.36, n.10, Jun, p.3389-400. 2008.

Le Rouzic, E. e S. Benichou. The *Vpr* protein from HIV-1: distinct roles along the viral life cycle. Retrovirology, v.2, p.11. 2005.

Lin, P. F., W. Blair, *et al.* A small molecule HIV-1 inhibitor that targets the HIV-1 envelope and inhibits CD4 receptor binding. Proc Natl Acad Sci U S A, v.100, n.19, Sep 16, p.11013-8. 2003.

Lin, T. Y. e M. Emerman. Determinants of cyclophilin A-dependent TRIM5 alpha restriction against HIV-1. Virology, v.379, n.2, Sep 30, p.335-41. 2008.

Little, S. J. Transmission and prevalence of HIV resistance among treatment-naive subjects. Antivir Ther, v.5, n.1, Mar, p.33-40. 2000.

Little, S. J., S. Holte, *et al.* Antiretroviral-drug resistance among patients recently infected with HIV. N Engl J Med, v.347, n.6, Aug 8, p.385-94. 2002.

Lu, J., P. Sista, *et al.* Relative replicative fitness of human immunodeficiency virus type 1 mutants resistant to enfuvirtide (T-20). J Virol, v.78, n.9, May, p.4628-37. 2004.

Lundgren, J. D. e A. Mocroft. The impact of antiretroviral therapy on AIDS and survival. J HIV Ther, v.11, n.2, Jun, p.36-8. 2006.

Madani, N., A. L. Perdigoto, *et al.* Localized changes in the gp120 envelope glycoprotein confer resistance to human immunodeficiency virus entry inhibitors BMS-806 and #155. J Virol, v.78, n.7, Apr, p.3742-52. 2004.

Mansky, L. M. Retrovirus mutation rates and their role in genetic variation. J Gen Virol, v.79 (Pt 6), Jun, p.1337-45. 1998.

Markowitz, M., Nguyen,B-Y. Et Al. Potent antiretroviral effect of MK-0518, a novel HIV-1 integrase inhibitor, as part of combination ART in tratement-naive HIV-1 infected patients. Sixteenth IAC Toronto (Abstrat THLB0214) (2006).

Marx, J. L. New disease baffles medical community. Science 217:618-21. 1982.

Masquelier, B., E. Lemoigne, *et al.* Primary infection with zidovudine-resistant HIV. N Engl J Med, v.329, n.15, Oct 7, p.1123-4. 1993.

Masur, H., M. A. Michelis, *et al.* An outbreak of community-acquired Pneumocystis carinii pneumonia: initial manifestation of cellular immune dysfunction. N Engl J Med, v.305, n.24, Dec 10, p.1431-8. 1981.

Mavoungou, D., V. Poaty-Mavoungou, *et al.* Inhibition of human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) glycoprotein-mediated cell-cell fusion by immunor (IM28). Virolog J, v.2, p.9. 2005.

Mcdougal, J. S., A. Mawle, *et al.* Cellular tropism of the human retrovirus HTLV-III/LAV. I. Role of T cell activation and expression of the T4 antigen. J Immunol, v.135, n.5, Nov, p.3151-62. 1985.

Menzo, S., A. Castagna, *et al.* Genotype and phenotype patterns of human immunodeficiency virus type 1 resistance to enfuvirtide during long-term treatment. Antimicrob Agents Chemother, v.48, n.9, Sep, p.3253-9. 2004.

Miller, E. D., K. M. Duus, *et al.* Human immunodeficiency virus type 1 IIIB selected for replication in vivo exhibits increased envelope glycoproteins in virions without alteration in coreceptor usage: separation of in vivo replication from macrophage tropism. J Virol, v.75, n.18, Sep, p.8498-506. 2001.

Morgado, M. G., E. C. Sabino, *et al.* V3 region polymorphisms in HIV-1 from Brazil: prevalence of subtype B strains divergent from North American/European prototype and detection of subtype F. AIDS Res Hum Retroviruses, v.10, n.5, May, p.569-76. 1994.

Moyle, G. J., A. Wildfire, *et al.* Epidemiology and predictive factors for chemokine receptor use in HIV-1 infection. J Infect Dis, v.191, n.6, Mar 15, p.866-72. 2005.

Muesing, M. A., D. H. Smith, *et al.* Nucleic acid structure and expression of the human AIDS/lymphadenopathy retrovirus. Nature, v.313, n.6002, Feb 7-13, p.450-8. 1985.

Myers, G., K. Macinnes, *et al.* The emergence of simian/human immunodeficiency viruses. AIDS Res Hum Retroviruses, v.8, n.3, Mar, p.373-86. 1992.

Neil, S. J., T. Zang, *et al.* Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 *Vpu*. Nature, v.451, n.7177, Jan 24, p.425-30. 2008.

Nishikawa, H., S. Oishi, *et al.* Identification of minimal sequence for HIV-1 fusion inhibitors. Bioorg Med Chem, v.16, n.20, Oct 15, p.9184-7. 2008.

Nkengasong, J. N., W. Janssens, *et al.* Genotypic subtypes of HIV-1 in Cameroon. Aids, v.8, n.10, Oct, p.1405-12. 1994.

Nunn, A. S., E. M. Fonseca, *et al.* Evolution of antiretroviral drug costs in Brazil in the context of free and universal access to AIDS treatment. PLoS Med, v.4, n.11, Nov 13, p.e305. 2007.

Oliveira, A. C., A. N. Martins, *et al.* Enfuvirtide (T-20) resistance-related mutations in HIV type 1 subtypes B, C, and F isolates from Brazilian patients failing HAART. AIDS Res Hum Retroviruses, v.25, n.2, Feb, p.193-8. 2009.

Ou, S. H. I., Gaynor, R.B. Et Al. Intracellular factors involved in gene expression of human retroviruses. In: J. A. Levy (Ed.). The Retroviridae New York: Plenum Press 341:1171-4, 1995. Intracellular factors involved in gene expression of human retroviruses

Ozel, M., G. Pauli, *et al.* The organization of the envelope projections on the surface of HIV. Arch Virol, v.100, n.3-4, p.255-66. 1988.

Palella, F. J., Jr., K. M. Delaney, *et al.* Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigators. N Engl J Med, v.338, n.13, Mar 26, p.853-60. 1998.

Peeters, M. e P. M. Sharp. Genetic diversity of HIV-1: the moving target. Aids, v.14 Suppl 3, p.S129-40. 2000.

Perez-Alvarez, L., R. Carmona, *et al.* Long-term monitoring of genotypic and phenotypic resistance to T20 in treated patients infected with HIV-1. J Med Virol, v.78, n.2, Feb, p.141-7. 2006.

Peterlin, B. E. A. Molecular biology of HIV. New York: Plenum Press, v.4:185-238. 1995

Peuchant, O., S. Capdepon, *et al.* Primary resistance to enfuvirtide (T20) in recently HIV-1 infected, antiretroviral-naive patients from the ANRS Aquitaine Cohort. Antivir Ther, v.12, n.4, p.559-62. 2007.

Pillay, D., K. Bhaskaran, *et al.* The impact of transmitted drug resistance on the natural history of HIV infection and response to first-line therapy. Aids, v.20, n.1, Jan 2, p.21-8. 2006.

Popik, W., T. M. Alce, *et al.* Human immunodeficiency virus type 1 uses lipid raft-colocalized CD4 and chemokine receptors for productive entry into CD4(+) T cells. J Virol, v.76, n.10, May, p.4709-22. 2002.

Preston, B. D., B. J. Poiesz, *et al.* Fidelity of HIV-1 reverse transcriptase. Science, v.242, n.4882, Nov 25, p.1168-71. 1988.

Ramirez, B. C., E. Simon-Loriere, *et al.* Implications of recombination for HIV diversity. Virus Res, v.134, n.1-2, Jun, p.64-73. 2008.

Ramirez De Arellano, E., C. Martin, *et al.* Genetic analysis of the long terminal repeat (LTR) promoter region in HIV-1-infected individuals with different rates of disease progression. Virus Genes, v.34, n.2, Apr, p.111-6. 2007.

Ray, N., J. E. Harrison, *et al.* Clinical resistance to enfuvirtide does not affect susceptibility of human immunodeficiency virus type 1 to other classes of entry inhibitors. J Virol, v.81, n.7, Apr, p.3240-50. 2007.

Reeves, J. D., S. A. Gallo, *et al.* Sensitivity of HIV-1 to entry inhibitors correlates with envelope/coreceptor affinity, receptor density, and fusion kinetics. Proc Natl Acad Sci U S A, v.99, n.25, Dec 10, p.16249-54. 2002.

Rimsky, L. T., D. C. Shugars, *et al.* Determinants of human immunodeficiency virus type 1 resistance to gp41-derived inhibitory peptides. J Virol, v.72, n.2, Feb, p.986-93. 1998.

Roberts, J. D., K. Bebenek, *et al.* The accuracy of reverse transcriptase from HIV-1. Science, v.242, n.4882, Nov 25, p.1171-3. 1988.

Roberts, N. A., J. A. Martin, *et al.* Rational design of peptide-based HIV proteinase inhibitors. Science, v.248, n.4953, Apr 20, p.358-61. 1990.

Robertson, D. L., J. P. Anderson, *et al.* HIV-1 nomenclature proposal. Science, v.288, n.5463, Apr 7, p.55-6. 2000.

Robertson, D. L., P. M. Sharp, *et al.* Recombination in HIV-1. Nature, v.374, n.6518, Mar 9, p.124-6. 1995.

Robey, W. G., B. Safai, *et al.* Characterization of envelope and core structural gene products of HTLV-III with sera from AIDS patients. Science, v.228, n.4699, May 3, p.593-5. 1985.

Robinson, H. L. New hope for an AIDS vaccine. Nat Rev Immunol, v.2, n.4, Apr, p.239-50. 2002.

Sa-Filho, D., E. G. Kallas, *et al.* Characterization of the full-length human immunodeficiency virus-1 genome from recently infected subjects in Brazil. AIDS Res Hum Retroviruses, v.23, n.9, Sep, p.1087-94. 2007.

Sabino, E. C., E. G. Shpaer, *et al.* Identification of human immunodeficiency virus type 1 envelope genes recombinant between subtypes B and F in two epidemiologically linked individuals from Brazil. J Virol, v.68, n.10, Oct, p.6340-6. 1994.

Sakai, K., X. Y. Ma, *et al.* Recombinational analysis of a natural noncytopathic human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) isolate: role of the vif gene in HIV-1 infection kinetics and cytopathicity. J Virol, v.65, n.11, Nov, p.5765-73. 1991.

Sakuma, R., A. A. Mael, *et al.* Alpha interferon enhances TRIM5alpha-mediated antiviral activities in human and rhesus monkey cells. J Virol, v.81, n.18, Sep, p.10201-6. 2007.

Schneider, M. F., S. J. Gange, *et al.* Patterns of the hazard of death after AIDS through the evolution of antiretroviral therapy: 1984-2004. Aids, v.19, n.17, Nov 18, p.2009-18. 2005.

Shafer, R. W. Genotypic testing for human immunodeficiency virus type 1 drug resistance. Clin Microbiol Rev, v.15, n.2, Apr, p.247-77. 2002.

Shafer, R. W., M. A. Winters, *et al.* Multiple concurrent reverse transcriptase and protease mutations and multidrug resistance of HIV-1 isolates from heavily treated patients. Ann Intern Med, v.128, n.11, Jun 1, p.906-11. 1998.

Shafer, R. W. E. S., M.J. HIV-1 drug resistance mutations:An updated framework for second decade of HAART. AIDS. 2008.

Sharp, P. M., E. Bailes, *et al.* Origins and evolution of AIDS viruses. Biol Bull, v.196, n.3, Jun, p.338-42. 1999.

Sharp, P. M., G. M. Shaw, *et al.* Simian immunodeficiency virus infection of chimpanzees. J Virol, v.79, n.7, Apr, p.3891-902. 2005.

Sheehy, A. M., N. C. Gaddis, *et al.* Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein. Nature, v.418, n.6898, Aug 8, p.646-50. 2002.

Simon, F., P. Mauclore, *et al.* Identification of a new human immunodeficiency virus type 1 distinct from group M and group O. Nat Med, v.4, n.9, Sep, p.1032-7. 1998.

Simon, F., Vanderhoeven, J. Et Al. Prevalence of drug resistant HIV-1 variants in newly infected individuals during 1999-2000. In: Conference on retroviruses and opportunistic infections, 2001. p.

Smith, J. A. e R. Daniel. Following the path of the virus: the exploitation of host DNA repair mechanisms by retroviruses. ACS Chem Biol, v.1, n.4, May 23, p.217-26. 2006.

Soares, E. A., A. F. Santos, *et al.* Differential drug resistance acquisition in HIV-1 of subtypes B and C. PLoS ONE, v.2, n.1, p.e730. 2007.

Soares, M. A. Drug resistance differences among HIV types and subtypes:a growing problem. Future HIV Ther. 2008.

Soriano, A., Aguilera, A. Et Al. Resistências a Los Antiretrovirales. Permanyer Barcelona. 2005.

Spira, S., M. A. Wainberg, *et al.* Impact of clade diversity on HIV-1 virulence, antiretroviral drug sensitivity and drug resistance. J Antimicrob Chemother, v.51, n.2, Feb, p.229-40. 2003.

Steinhauer, D. A., E. Domingo, *et al.* Lack of evidence for proofreading mechanisms associated with an RNA virus polymerase. Gene, v.122, n.2, Dec 15, p.281-8. 1992.

Stoddart, C. A., R. Geleziunas, *et al.* Human immunodeficiency virus type 1 Nef-mediated downregulation of CD4 correlates with Nef enhancement of viral pathogenesis. J Virol, v.77, n.3, Feb, p.2124-33. 2003.

Stremlau, M., M. Perron, *et al.* Species-specific variation in the B30.2(SPRY) domain of TRIM5alpha determines the potency of human immunodeficiency virus restriction. J Virol, v.79, n.5, Mar, p.3139-45. 2005.

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

Svicher, V., S. Aquaro, *et al.* Specific enfuvirtide-associated mutational pathways in HIV-1 Gp41 are significantly correlated with an increase in CD4(+) cell count, despite virological failure. J Infect Dis, v.197, n.10, May 15, p.1408-18. 2008.

Takasaki, T., I. Kurane, *et al.* Electron microscopic study of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) core structure: two RNA strands in the core of mature and budding particles. Arch Virol, v.142, n.2, p.375-82. 1997.

Tamalet, C., J. Fantini, *et al.* Resistance of HIV-1 to multiple antiretroviral drugs in France: a 6-year survey (1997-2002) based on an analysis of over 7000 genotypes. Aids, v.17, n.16, Nov 7, p.2383-8. 2003.

Temin, H. The high rate of retrovirus: results in rapid evolution "In Emergence Viruses". Oxford University Press. 1993.

Tremblay, M., K. Numazaki, *et al.* Resistance to infection by HIV-1 of peripheral blood mononuclear cells from HIV-1-infected patients is probably mediated by neutralizing antibodies. J Immunol, v.145, n.9, Nov 1, p.2896-901. 1990.

Tristem, M., C. Marshall, *et al.* Evolution of the primate lentiviruses: evidence from *vpx* and *vpr*. Embo J, v.11, n.9, Sep, p.3405-12. 1992.

Ulena, N. K., A. D. Sarr, *et al.* The level of APOBEC3G (hA3G)-related G-to-A mutations does not correlate with viral load in HIV type 1-infected individuals. AIDS Res Hum Retroviruses, v.24, n.10, Oct, p.1285-90. 2008.

Vaishnav, Y. N. e F. Wong-Staal. The biochemistry of AIDS. Annu Rev Biochem, v.60, p.577-630. 1991.

Valdez H, M. S., Kohlbrenner V, Mayer D. Tipanavir / ritonavir (TPVir) 500 mg / 200mg big drives week 24 viral load (VL) below 400 copies / ml when combined with a second active drug (T20) in protease inhibitor experienced HIV+ patients. IAS [abstract We0a0205]. 2005.

Van Damme, N., D. Goff, *et al.* The interferon-induced protein BST-2 restricts HIV-1 release and is downregulated from the cell surface by the viral *Vpu* protein. Cell Host Microbe, v.3, n.4, Apr 17, p.245-52. 2008.

Van Heuverswyn, F., Y. Li, *et al.* Human immunodeficiency viruses: SIV infection in wild gorillas. Nature, v.444, n.7116, Nov 9, p.164. 2006.

Varmus, H. E. S., R. Replication of retrovirus. IN: Weiss,R, Reich,N., Varmus, H., Confin,H, p.75-134. 1985.

Veras, N. M., V. S. Veras, *et al.* HIV type 1 genetic variability in central Brazil. AIDS Res Hum Retroviruses, v.23, n.12, Dec, p.1481-90. 2007.

Von Schwedler, U. K., M. Stuchell, *et al.* The protein network of HIV budding. Cell, v.114, n.6, Sep 19, p.701-13. 2003.

Waleria-Aleixo, A., A. N. Martins, *et al.* Drug resistance mutation profile and accumulation kinetics in human immunodeficiency virus-positive individuals infected with subtypes B and F failing highly active antiretroviral therapy are influenced by different viral codon usage patterns. Antimicrob Agents Chemother, v.52, n.12, Dec, p.4497-502. 2008.

Wang, T., Z. Zhang, *et al.* Discovery of 4-benzoyl-1-[(4-methoxy-1H-pyrrolo[2,3-b]pyridin-3-yl)oxoacetyl]-2-(R)-methylpiperazine (BMS-378806): a novel HIV-1 attachment inhibitor that interferes with CD4-gp120 interactions. J Med Chem, v.46, n.20, Sep 25, p.4236-9. 2003.

Wei, X., J. M. Decker, *et al.* Emergence of resistant human immunodeficiency virus type 1 in patients receiving fusion inhibitor (T-20) monotherapy. Antimicrob Agents Chemother, v.46, n.6, Jun, p.1896-905. 2002.

Weiss, C. D., J. A. Levy, *et al.* Oligomeric organization of gp120 on infectious human immunodeficiency virus type 1 particles. J Virol, v.64, n.11, Nov, p.5674-7. 1990.

Wilkin, T. J., Z. Su, *et al.* HIV type 1 chemokine coreceptor use among antiretroviral-experienced patients screened for a clinical trial of a CCR5 inhibitor: AIDS Clinical Trial Group A5211. Clin Infect Dis, v.44, n.4, Feb 15, p.591-5. 2007.

Willey, R. L., F. Maldarelli, *et al.* Human immunodeficiency virus type 1 *Vpu* protein induces rapid degradation of CD4. J Virol, v.66, n.12, Dec, p.7193-200. 1992.

Williams, K. J. e L. A. Loeb. Retroviral reverse transcriptases: error frequencies and mutagenesis. Curr Top Microbiol Immunol, v.176, p.165-80. 1992.

Wills, J. W. e R. C. Craven. Form, function, and use of retroviral gag proteins. Aids, v.5, n.6, Jun, p.639-54. 1991.

Wilson, J. W., P. Bean, *et al.* Comparative evaluation of three human immunodeficiency virus genotyping systems: the HIV-GenotypR method, the HIV PRT GeneChip assay, and the HIV-1 RT line probe assay. J Clin Microbiol, v.38, n.8, Aug, p.3022-8. 2000.

Yang, W., J. P. Bielawski, *et al.* Widespread adaptive evolution in the human immunodeficiency virus type 1 genome. J Mol Evol, v.57, n.2, Aug, p.212-21. 2003.

9 – Anexos

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

I – DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA RESPONSÁVEL LEGAL

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

II – Dados da Pesquisa Científica

1. **TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA** . Avaliação da sensibilidade aos inibidores de entrada do HIV-1 em pacientes em falha virológica à terapia antirretroviral e novos aos inibidores de entrada.
2. PESQUISADOR (a): Cecília Salete Alencar Silva
Cargo/Função: Bióloga INSCR.CON.S. REGIONAL Nº 20.284/01D
3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA
SEM RISCO () RISCO MÍNIMO (x) RISCO MÉDIO ()
RISCO BAIXO () RISCO MAIOR ()
4. DURAÇÃO DA PESQUISA:- 2 anos

III – Registro das explicações do pesquisador ao paciente o Representante Legal sobre a pesquisa consignando:-

1. Justificativa e os objetivos da pesquisa:- Proporcionar estudos de novas drogas que ainda não estão totalmente disponíveis em tratamentos, para possíveis novas opções de tratamento para pacientes com HIV positivo.
2. Procedimentos que serão utilizados e propósitos, incluindo a Identificação dos procedimentos que são experimentais:-Sua participação neste estudo é voluntária e implica em uma entrevista, coleta de sangue e revisão do seu prontuário médico .
Entrevista: Finalidade de levantar dados sócio-demográficos (sobre as cidades onde morou, anos de escolaridade), dados sobre suas práticas sexuais e riscos de infecção pelo HIV, sobre os medicamentos antirretrovirais que você usou e doenças que você já teve.
Coleta de sangue : Serão coletadas 7 ml de sangue. Neste material será realizado a técnica de Genotipagem da região envelope, do vírus HIV em sangue.
Através dela, será possível analisar se apresentam mutações para as medicações em estudo.
3. Desconfortos e riscos esperados:- Está incluído dor pela punção da veia durante a coleta do sangue, ocasionalmente também pode haver a formação de hematomas ou flebite (inflamação no local da picada). Esta coleta será realizada por profissional capacitado de modo a minimizar os riscos inerentes a este procedimento.
4. Benefícios que poderão ser obtidos:- A possibilidade de realizar exame de genotipagem da região envelope do vírus HIV-1. O resultado deste exame será encaminhado para o seu prontuário.
5. Procedimento alternativo que possam ser vantajosos para o indivíduo:- como benefício deste estudo esta a possibilidade de contribuir para novos estudos de drogas, que ainda não estão totalmente disponíveis nos tratamentos de pacientes HIV positivos e a realização de genotipagem da região envelope do vírus HIV em pacientes portadores de HIV positivo.

IV – Esclarecimento dados do Pesquisador sobre Garantias do Sujeito da pesquisa consignando:-

1. Acesso a qualquer tempo às informações sobre os procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para dirimir eventuais dúvidas. Entrar em contato com Dra. Éster Cerdeira Sabino ou Cecília Salete Alencar Silva, Av. Dr. Enéas Aguiar nº 155, 1º andar, Fundação Pró Sangue – SP, telefone nº 3061-5544 ramal 221 ou no Comitê de ética em pesquisa – CEP-CRT-DST/AIDS, com o Coordenador, Dr. Eduardo Ronner Lago Negro, pelo telefone 5087-9837.
2. Liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem que haja prejuízo à continuidade da assistência. O estudo não implica em riscos do ponto de vista clínico. Sua participação é voluntária, podendo seu consentimento ser retirado a qualquer momento, sem que isto traga prejuízo ao seu atendimento.
3. Salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade.

O estudo garante confidencialidade dos dados obtidos. Em nenhum momento serão tornados públicos os dados relacionados à sua identidade.

V - Informações de Nomes, Endereços e Telefones dos Responsáveis pelo Acompanhamento da Pesquisa, para Contato em Caso de Intercorrências Clínicas e Reações Adversas.

Entrar em contato com Dra. Éster C. Sabino ou Cecília Salete Alencar Silva, Av. Dr. Enéas de Cavalho Aguiar, nº 155 – 1º andar – Fundação Pró-Sangue- SP telefone 3061-5544 ramal 221.

VI - Observações Complementares: Não necessárias

VII - Consentimento Pós-Esclarecido

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

São Paulo, de de 2006

assinatura do paciente
ou responsável legal

assinatura do pesquisador

Avaliação da sensibilidade aos inibidores de entrada do HIV-1 em pacientes em falha virológica à terapia antirretroviral e novos aos inibidores de entrada.

Formulário 1:- Entrevista com o paciente

Dados do paciente:-

1. Nome _____
2. Prontuário _____ 3. Data de nascimento ___/___/___ 4. Sexo M F
5. Cor branco negra/Pardo amarelo vermelho
6. Nome da mãe: _____
7. Até que ano escolar cursou? _____ ano do _____ grau
8. Ocupação Atual _____ 9. Gestante sim não não explica
10. Endereço: _____
- Bairro: _____ Município: _____
- Estado: _____ Telefone: (_____) Cep: _____
- Zona:- urbana rural Morador de Rua:- sim não
11. Nós últimos 20 anos morou ou esteve em outras cidades nas quais tenha passado por alguma situação de risco para o HIV? sim não

Se sim, em qual cidade esteve e qual período aproximado de permanência

_____ Período ___/___ á ___/___
_____ Período ___/___ á ___/___
_____ Período ___/___ á ___/___

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

Se sim, especificar local e período

_____ Período __/__/__ á __/__/__
_____ Período __/__/__ á __/__/__
_____ Período __/__/__ á __/__/__

13. Autoriza contato :- sim não

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

II – Dados Laboratoriais

1. Quando foi seu primeiro teste anti HIV positivo? Data (mês/ano) ___/___
2. Antes desse primeiro teste positivo o sr(a) tinha feito algum teste que tivesse sido negativo ?
 sim não não quis responder não sabe
3. Se sim, quando foi ___/___ (mês/ano)

III- Categoria de exposição

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

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

1. O sr(a) teve relações sexuais desprotegidas com indivíduos sabidamente HIV positivo ou com Aids?
 sim não
2. O sr(a) mantinha relações sexuais:-
 somente com mulheres somente com homens com homens e mulheres

3. Manteve relações sexuais com profissional do sexo ? sim não

4. Seu parceiro(a):

- Mantinha relações sexuais só com homens tinha múltiplos parceiros
- Mantinha relações sexuais só com mulheres usava drogas injetáveis
- Mantinha relações sexuais com homens e mulheres era hemofílico
- Já havia recebido transfusão de sangue/derivados

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

- nenhum somente 1 2-10 11-50 não quis responder

6. Nos 5 anos anteriores à descoberta quantos parceiros sexuais teve no total ?

- nenhum somente 1 2-10 11-50 não quis responder

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

7. O sr(a) é hemofílico ? sim não

8. Fazia uso de drogas injetáveis? sim não

9. Se sim, partilhou seringas com alguém ? sim não

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

- sim não

11. Se sim, onde e quando foi? Data ___/___ (mês/ano) Município ___ UF _____

Instituição: _____

12. O sr(a) alguma vez já se acidentou com material biológico que pudesse estar contaminados pelo HIV?

- sim não

13. O sr(a) enfrentou alguma outra situação, diferente das situações que foram colocadas nas questões anteriores, no qual você possa ter se contaminado com HIV ? sim não

14. Se sim, qual foi ela:

15. Usou droga injetável ? sim não

16. Caso use ou tenha usado partilhou seringas ? sim não

17. Manteve relações sexuais desprotegidas? sim não

18. Quantos parceiros sexuais teve no último ano?

nenhum somente 1 2-10 11-50 não quis responder

IV – Dados Clínicos

1. Em relação às doenças e/ou associadas a Aids, o sr(a)
Nunca apresentou doença e/ou condição associada a Aids? sim não
Se já apresentou quais foram?

2. Já teve ou tem alguma doença sexualmente transmissível como:
Sífilis, HPV, Hepatite (especificar B ou C) sim não
Se sim, quais doenças:-

3. Atualmente o sr(a) está :-
Sem nenhum sintoma da doença:- sim não
Se sim, quais sintomas:-

Terapêutica Antirretroviral

1. Está atualmente fazendo uso de ARV? Sim Não

2. De 1 a 10 (sendo nota máxima) que nota o Sr(a) daria para sua regularidade na tomada dos medicamentos ARVs prescritos pelo seu médico ?

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](#)