

Edição Especial 2009!

# CartaMolecular

O Centro de Genomas Compartilhando Informação - Nº25

## Testes de Resistência do HIV aos medicamentos anti-HIV (antirretrovirais)

Informações mais detalhadas do exame que tem se tornado fundamental para o acompanhamento de pacientes portadores do vírus.

### Como se dá a resistência aos antirretrovirais?

A resistência aos antirretrovirais é um mecanismo de seleção natural, Darwiniano, portanto, isto significa que com a pressão seletiva do meio ambiente em que o vírus vive, na presença de antirretrovirais, cepas virais mais adaptadas a este meio ambiente vão ser selecionadas e prevalecer. Esta seleção acontece muito facilmente no caso do HIV em função do ciclo de vida dinâmico do vírus. Quando se leva em consideração (i) o índice de erros naturais da enzima que polimeriza o vírus, que é a transcriptase reversa ( $4 \times 10^4$ ), (ii) o altíssimo índice de replicação do vírus, onde uma pessoa cronicamente infectada e sem tratamento produz e elimina 10 bilhões de vírus diariamente, (iii) e o tamanho do genoma do vírus, que é 10 kB, percebe-se que todas as mutações possíveis são geradas diariamente ao longo do genoma do HIV-1. Portanto, as mutações, que têm relação com resistência aos antirretrovirais emergem diariamente, porém normalmente não se fixam. Fixar-se significaria que a cepa viral com a mutação de resistência deveria infectar um linfócito T CD4+ suscetível. Isto, provavelmente, não ocorrerá, posto que esta cepa estará competindo com outros 10 bilhões de vírus do tipo selvagem que estão sendo liberados na corrente sanguínea desta pessoa infectada. Entretanto, quando se utiliza qualquer antirretroviral em monoterapia, vai haver a eliminação de todos os vírus sensíveis e a consequente seleção do vírus com mutações de resistência. Assim, esta cepa viral é capaz de infectar o "próximo" linfócito suscetível e haverá a expansão do vírus com a mutação de resistência, pois, de cada célula infectada saem de 5 a 10 mil vírus com a mutação de

resistência selecionada. Isto é o que fundamenta a terapia antirretroviral combinada, onde havendo a seleção de um vírus com mutação de resistência, esta cepa ainda continua suscetível aos outros antirretrovirais presentes no esquema de tratamento. Desta forma, é fácil o entendimento de que a falha no uso adequado dos medicamentos pode levar a seleção de mutações de resistência.

### Qual a repercussão da resistência aos antirretrovirais?

Recentemente ficou claro que quando o vírus volta a replicar na corrente sanguínea do paciente em decorrência da resistência aos medicamentos, pode ocorrer a progressão da doença com queda dos níveis de células T CD4+, aparecimento de doenças oportunistas e risco de óbito.

### Quais os testes de resistência disponíveis?

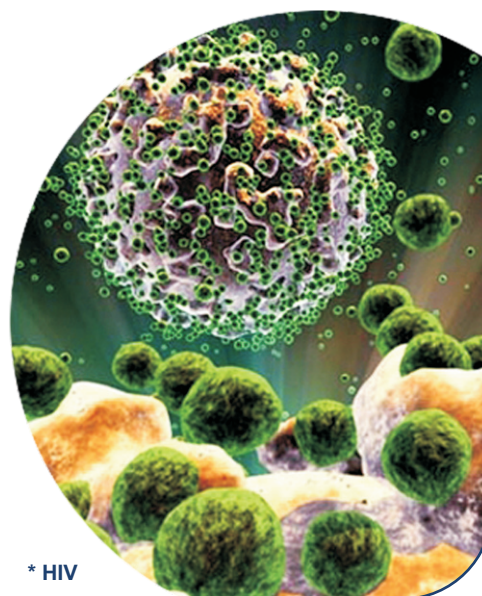
São os (i) Testes de Resistência Genotípica (genotipagem), que são testes laboratoriais que determinam a presença de mutações genéticas no HIV-1 relacionadas à diminuição de suscetibilidade às drogas e os (ii) Testes de Resistência Fenotípica (fenotipagem), que são testes usados para determinar em cultura a suscetibilidade do vírus aos antirretrovirais. Além disto, temos a (iii) Fenotipagem virtual, que é um Teste de genotipagem cujo resultado é submetido a bancos de dados que contém pares de amostras que possuem testes de geno e fenotipagem. O sistema de informática procura no banco de dados a sequência mais semelhante à sequência genômica testada. Como cada sequência do banco de dados possui um resultado de fenotipagem equivalente, o resultado de resistência fenotípica do banco de

dados é atribuído ao paciente testado, e, portanto, fornece-se o resultado do paciente testado no formato de um resultado de fenotipagem.

### Quais os passos laboratoriais de cada teste?

#### Passos laboratoriais do teste de Genotipagem.

- 1- Purificação do RNA ou DNA do HIV-1 presente na corrente sanguínea do paciente.
- 2- Transcrição reversa (transformação de RNA viral em cDNA).
- 3- Amplificação da região da transcriptase reversa e protease pela metodologia da PCR (reação em cadeia pela polimerase).
- 4- Sequenciamento do genoma do HIV do fragmento amplificado pela PCR.
- 5- Produção de uma lista de mutações dos códons relacionados com resistência aos antirretrovirais.
- 6- Interpretação. A principal fragilidade do teste está na falta de conhecimento sobre as mutações que causam diminuição de suscetibilidade às drogas.



\* HIV

## Passos laboratoriais do teste de Fenotipagem.

- 1- Purificação do RNA ou DNA do HIV-1 presente na corrente sanguínea do paciente. \*
  - 2- Transcrição reversa (transformação de RNA viral em cDNA). \*
  - 3- Amplificação da região da transcriptase reversa e protease pela metodologia da PCR. \*
  - 4- Transfecção de células utilizadas para cultura pela utilização de clones infecciosos. Clone infeccioso consiste no fragmento de DNA do HIV-1 com exceção do fragmento da protease e transcriptase reversa que virá a partir de (3) acima. Introduce-se o clone infeccioso e o fragmento da TR e PR do paciente no interior da célula por metodologia conhecida como eletroporação. \*
  - 5- Cultura do vírus na presença de cada um dos antirretrovirais.
  - 6- Quantificação da perda de suscetibilidade do vírus testado comparado ao vírus do tipo selvagem.
  - 7- Interpretação, A principal fragilidade do teste está na ausência de corte (cut off) definido para cada uma das drogas.
- \* As fases 1-4 ocorrem quando vírus recombinantes obtidos a partir de clone infeccioso são utilizados.

## Passos laboratoriais do teste de Fenotipagem Virtual.

- 1- Teste de Genotipagem.
- 2- Compara a sequência de nucleotídeos do paciente com sequências referência do tipo selvagem.
- 3- Sumariza o genótipo do paciente baseado em um perfil de mutações.
- 4- Procura em banco de dados sequências com perfil semelhante de mutações.
- 5- Identifica resultado de fenotipagem a partir do perfil de mutações.
- 6- Produz laudo de fenotipagem virtual.

## Quais as vantagens e desvantagens de cada teste?

### TESTES DE GENOTIPAGEM

VANTAGENS	DESVANTAGENS
Mais simples de serem realizados	Pouca sensibilidade a variantes minoritárias (sensibilidade superior a 25%)
Mais rápidos (1 a 2 semanas) e baratos	Interpretação requer conhecimento prévio dos determinantes genéticos da resistência
Amplamente disponíveis	Interações entre mutações ainda não são bem conhecidas
Mais sensíveis; podem detectar mutações emergentes (misturas) antes que elas tenham repercussão fenotípica, o que pode promover um sinal de alerta para o desenvolvimento de resistência ampla	Informações limitadas relacionadas a novas drogas, novas combinações de drogas e subtipos de vírus que não sejam B
	É uma medida indireta da suscetibilidade fenotípica.

### TESTES DE FENOTIPAGEM

VANTAGENS	DESVANTAGENS
Medida direta da resistência, mensurando a replicação do vírus modificado presente no paciente frente a concentrações diferentes de antirretrovirais	Cut offs ainda não estabelecidos para boa parte das drogas, o que é crítico para determinação da resistência, especialmente com relação aos cut offs clínicos.
Quantifica a perda de suscetibilidade às drogas testadas	Tecnicamente mais complexos
Formato mais familiar ao clínico	Mais caros e demorados
Menor dependência do acúmulo de conhecimento para interpretação, o que tem especial valor para drogas novas	Necessita de laboratórios muito mais especializados e equipados.

CONTINUA -->

Praticamente não necessitando de interpretação externa.	Tende a subestimar resistência na vigência de misturas entre vírus resistentes e sensíveis.
Avalia melhor os efeitos da hipersusceptibilidade proporcionada pela complexa combinação de muitas mutações selecionadas pelos antirretrovirais	

## TESTES DE FENOTIPAGEM VIRTUAL

VANTAGENS	DESVANTAGENS
Mais simples de serem realizados pois se trata de um teste de genotipagem	
Quantifica a perda de suscetibilidade às drogas testadas	Quantidade limitada de informações a drogas novas e subtipos não B.
Formato mais familiar ao clínico	
Mais rápido e mais baratos que uma fenotipagem	
Considera as "misturas" entre vírus selvagens e resistentes como vírus resistentes	Também se trata de uma medida indireta da suscetibilidade fenotípica
Avalia melhor os efeitos da hipersusceptibilidade proporcionada pela complexa combinação de muitas mutações selecionadas pelos antirretrovirais	

## QUAIS AS CONSIDERAÇÕES IMPORTANTES COM RELAÇÃO AOS TESTES?

CONSIDERAÇÕES	OBSERVAÇÕES
Testes de resistência devem ser realizados com carga viral detectável.	Alguns laboratórios podem acessar o DNA proviral ao invés de RNA plasmático, possibilitando o teste mesmo com carga viral indetectável.
Sangue deve ser coletado na vigência da medicação.	As mutações devem persistir até duas semanas após a interrupção, mas algumas mutações como a do códon 184 da TR podem desaparecer rapidamente na ausência de medicação.
Falha virológica deve ser confirmada por dois testes com intervalo superior a 3 semanas.	A transativação heteróloga, secundária a infecções transitórias e vacinação podem aumentar a carga viral por períodos curtos de tempo sem que haja repercussões relacionadas a falha virológica.
Falha virológica pode ser decorrente de fatores não relacionados a resistência viral	Outros fatores como adesão ou interações medicamentosas devem ser investigados antes da solicitação do teste. Resistência celular pode também ser a causa da falha.
	antes da solicitação do teste. Resistência celular pode também ser a causa da falha
Interpretação dos testes pode ser complexa e necessitar da interação entre os clínicos assistentes e virologistas clínicos.	
Os testes apresentam valor preditivo positivo alto.	Uma vez detectadas as mutações ou uma diminuição da susceptibilidade de uma droga <i>in vitro</i> , é muito provável que a droga não apresente ação <i>in vivo</i> .

CONTINUA -->

CONSIDERAÇÕES	OBSERVAÇÕES
Os testes apresentam valor preditivo negativo baixo.	A ausência da detecção da resistência não significa necessariamente que a mesma não exista.
Os testes apresentam valor preditivo positivo alto.	Uma vez detectadas as mutações ou uma diminuição da susceptibilidade de uma droga <i>in vitro</i> , é muito provável que a droga não apresente ação <i>in vivo</i> .
Os testes apresentam valor preditivo negativo baixo.	A ausência da detecção da resistência não significa necessariamente que a mesma não exista.
Manipulação antirretroviral previa e resultado de testes anteriores devem ser considerados na interpretação de padrões de resistência apontados nos testes atuais.	Mutações selecionadas no passado podem desaparecer na ausência da droga que a selecionou e reemergirem rapidamente quando a droga é re-introduzida (falsa reversão de mutações na ausência das drogas). Mutações como a M184V ocorrem muito frequentemente por ocasião da falha ao 3TC, mesmo que o teste não aponte esta mutação se no momento o individuo não estiver usando 3TC.

### **Conceitos e definições importantes:**

**Mutação** - Alteração na composição genética do vírus.

**Códon** - Grupos de 3 nucleotídeos que codificam um aminoácido.

**Mutação principal ou primária** - Aquela que produz significativa perda de suscetibilidade ao antirretroviral que a selecionou. Normalmente é a primeira mutação que emerge decorrente do uso do antirretroviral em questão.

**Mutação acessória ou secundária** - Mutação que emerge normalmente para recuperar o fitness perdido pelo aparecimento da mutação principal. Propicia uma perda modesta de suscetibilidade ao antirretroviral que a selecionou.

**Vírus do tipo selvagem** - Cepa viral com constituição genética considerada normal, sendo sensível aos antirretrovirais.

**Vírus mutante** - Cepa viral com alterações genéticas.

**Polimorfismos virais** - Mutações genéticas que podem estar presentes nos vírus na ausência de pressão seletiva dos antirretrovirais. Muitas vezes são "assinaturas" de vírus de diferentes subtipos do HIV-1.

**Resistência primária** - Resistência aos antirretrovirais, detectadas em pacientes virgens de tratamento antirretroviral.

**Resistência secundária** - Resistência aos antirretrovirais decorrentes da pressão seletiva exercida pelas drogas.

**Resistência a múltiplas drogas (MDR)** - Mutações que normalmente conferem resistência a todas as drogas de uma mesma classe.

**Inserções** - Adição de nucleotídeos, geralmente múltiplos de 3, que levam ao acréscimo no número de aminoácidos na sequência viral. Ex: cccagtagtg - > cccagtag**act**tg (o triplete colorido representa uma inserção na sequência de nucleotídeos, que não existia na sequência original).

**Deleções** - Perda de fragmento genético nucleotídico, geralmente múltiplo de 3, que leva a uma diminuição no número de aminoácidos da sequência.

### **Qual a importância dos testes de resistência na prática clínica:**

- 1 - Evita trocas desnecessárias de antirretrovirais
- 2 - Levanta suspeita com relação a falta de adesão
- 3 - Propicia trocas direcionadas ao invés de trocas empíricas de antirretrovirais.
- 4 - Propicia o uso de drogas ativas por períodos mais prolongados.
- 5 - Economiza custos relacionados a trocas de drogas.
- 6 - Evita toxicidade desnecessária de drogas inativas.
- 7 - Propicia uma noção mais realista do desempenho futuro do tratamento.

[WWW.CENTRODEGENOMAS.COM.BR](http://WWW.CENTRODEGENOMAS.COM.BR)

**MATRIZ - ÁREA TÉCNICA** - Rua Leandro Dupré, 967 - Vl. Clementino - São Paulo / SP - Cep. 04025-014 - PABX: 11 5079 9593

**FILIAL - PESQUISA E DESENVOLVIMENTO** - Av. Dr. Altino Arantes, 1233 - Vl. Clementino - São Paulo / SP - Cep. 04042-035 - PABX: 11 5079 9593

Todas as edições estão disponíveis para consulta e impressão no [www.cartamolecular.com.br](http://www.cartamolecular.com.br)

Editoração: Andrea Curty - Produção: Aldeia Brasil



Control Lab

