

Tendências

em

HIV • AIDS

VOLUME 6 - NÚMERO 2 - 2011



Disciplina de Infectologia
Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina

Tendências em HIV•AIDS

Volume 6 - Número 2 - 2011

Editor chefe

Ricardo Sobhie Diaz – *Universidade Federal de São Paulo*

Corpo editorial

Adauto Castelo Filho – *Universidade Federal de São Paulo*

André Lomar – *Hospital Israelita Albert Einstein*

Artur Kalichman – *Centro de Referência e Treinamento de DST/AIDS – SP*

Artur Timerman – *Hospital Heliópolis*

Breno Riegel – *Hospital Nossa Senhora da Conceição, Rio Grande do Sul*

Celso Spada – *Universidade Federal de Santa Catarina*

Celso Ramos – *Universidade Federal do Rio de Janeiro*

Celso Francisco Hernandez Granato – *Disciplina de Infectologia, Universidade Federal de São Paulo*

David Salomão Lewi – *Universidade Federal de São Paulo – Hospital Israelita Albert Einstein*

Eduardo Sprinz – *Universidade Federal do Rio Grande do Sul*

Érico A. Gomes de Arruda – *Hospital São José de Doenças Infecciosas do Ceará*

Esper Georges Kallas – *Universidade de São Paulo - USP*

Estevão Portella – *Universidade Federal do Rio de Janeiro*

Giovana Lótici Baggio-Zappia – *Disciplina de Infectologia, Universidade Federal de São Paulo*

Guido Levi – *Hospital do Servidor Público Estadual de São Paulo*

João da Silva Mendonça – *Hospital do Servidor Público Estadual de São Paulo*

José Luiz de Andrade Neto – *Universidade Federal do Paraná*

Jeová Keny Baima Colares - *Universidade de Fortaleza, Ceará.*

Jorge Simão do Rosário Casseb – *Universidade de São Paulo, USP*

Márcia Rachid – *Assessoria de DST/Aids da Secretaria do Estado do Rio de Janeiro*

Marcos Montani Caseiro – *Fundação Lusíadas, Santos, SP*

Marcos Vitória – *Organização Mundial de Saúde*

Marinella Della Negra – *Instituto de Infectologia Emílio Ribas*

Paulo Feijó Barroso – *Universidade Federal do Rio de Janeiro*

Paulo Roberto Abrão – *Disciplina de Infectologia, Universidade Federal de São Paulo*

Reinaldo Salomão – *Universidade Federal de São Paulo – Casa de Saúde Santa Marcelina*

Ricardo Pio Marins – *Organização Panamericana de Saúde*

Rosana Del Bianco – *Secretaria Municipal de Saúde de São Paulo*

Shirley Cavalcante Vasconcelos Komninakis – *Fundação Lusíadas, Santos – SP*

Simone Barros Tenore – *Disciplina de Infectologia, Universidade Federal de São Paulo*

Unai Tupinambás – *Universidade Federal de Minas Gerais*

Valdez Madruga – *Centro de Referência e Treinamento de DST/AIDS – SP*

ÍNDICE

PRECISAMOS NOS PREOCUPAR COM O ABACAVIR E O RISCO DE INFARTO DO MIOCÁRDIO?.....	37
RELÓGIO MOLECULAR E TAXAS EVOLUTIVAS DO HIV-1 ATRAVÉS DA ANÁLISE DE COALESCÊNCIA DE SEQUÊNCIAS DA INTEGRASE E ENV (V2V3) OBTIDAS DO HIV DATABASE.....	41
<i>Jean Paulo Lopes Zukurov, Luiz Mário Ramos Janini</i>	
SEGUE O SECO.....	46
<i>Michelle Zanoni</i>	
SEPSE NO PACIENTE HIV – UM RELATO DE CASO.....	51
<i>Tatiana Mohovic, Eliana Nogueira</i>	
RESUMO DE DISSERTAÇÕES E TESES	54
DESTAQUES.....	55



Atha Comunicação & Editora

Planejamento Editorial, Diagramação e Produção Gráfica

Rua Machado Bittencourt, 190 - Cep: 04044-000 - São Paulo - SP - Tel: 55-11-5087-9502 - Fax: 55-11-5579-5308

E-mail: 1atha@uol.com.br

A CURA PARA INFECÇÃO PELO HIV

A “6th IAS Conference on HIV Pathogenesis, Treatment na Prevention” que ocorreu na cidade de Roma de 17 a 20 de julho de 2011 (<http://www.ias2011.org/>) teve como uma das tônicas principais a cura da infecção pelo HIV, que eu prefiro denominar como erradicação da infecção no hospedeiro humano. Uma mesa redonda especial ocorreu no período pré congresso e durante todo o congresso foram apresentados temas sobre persistência viral, reservatórios, latência e estratégias para diminuir a assim chamada replicação viral residual. De fato, a Sociedade Internacional de Aids desenvolve um programa em apoio a um consórcio de especialistas na tentativa de obtenção deste objetivo (<http://www.iasociety.org/>). A cura parece ser realmente necessária no estágio atual da pandemia. Sem a cura, sabemos que o tratamento antirretroviral em uma pessoa será para a vida toda, culminando com a toxicidade cumulativa dos medicamentos. A toxicidade de longo prazo dos antirretrovirais de fato ainda não é plenamente conhecida por um motivo simples: o longo prazo ainda não chegou. Além disto, sabe-se que a despeito do tratamento antirretroviral eficaz, a sobrevida das pessoas infectadas pelo HIV está diminuída com relação à sobrevida das pessoas não infectadas. Note que o tratamento antirretroviral diminui, mas não elimina toda a degeneração somática que o HIV proporciona nas pessoas. É provável também que uma intervenção que leve a cura seja custo efetiva. Hoje somente 30% das pessoas que precisariam de tratamento antirretroviral no mundo o recebem. Se tivéssemos que tratar hoje todos os que necessitam de tratamento hoje, provavelmente não haveria dinheiro suficiente tal. Além disto, o desenvolvimento de uma vacina protetora contra novas infecções parece improvável.

Existe a definição de dois tipos de cura. Um dos tipos é a cura esterilizante, que ocorreria no modelo das doenças infecciosas. Este tipo de cura definitivamente erradica o patógeno. Este tipo de cura foi obtida uma única vez na história do HIV no caso de um paciente que desenvolveu uma leucemia mieloide aguda e recebeu um transplante de medula resistente a infecção pelo HIV.¹ Outro tipo de cura definido na literatura é a cura funcional, da forma que ocorre no modelo do câncer, onde na maior parte das vezes a remissão representa que as células cancerígenas ainda continuam no hospedeiro sem que propriamente haja evolução da doença. No modelo de cura funciona, já temos entre as pessoas infectadas pelo HIV os assim chamados “supressores de elite”, que constituem 1 a 3% das pessoas infectadas pelo HIV, tratando-se de hospedeiros que não apresentam viremia nem queda dos níveis dos linfócitos T CD4+. Qualquer um destes dois modelos de cura constituiria em um avanço grande.

Passou a se acreditar que a cura poderia ser atingida no momento que se percebeu que nenhuma célula definitiva é infectada pelo HIV (neurônios, enterócitos etc). Existem sim obstáculos para a erradicação do vírus, como replicação viral a partir de locais onde os medicamentos se distribuem pobremente (santuários) e a latência de uma parcela de células infectadas. Possivelmente a cura acontecerá quando combinações de estratégias de intervenção forem instituídas em uma mesma pessoa, como (a) diminuição da replicação viral residual através de intensificação do tratamento, (b) eliminação das células latentes, (c) reforço do sistema imune através do uso de vacinas terapêuticas e manipulação genética das células do hospedeiro no intuito de transforma-las em células resistentes ao HIV. Tudo isto já tem sido feito de forma individual. Provavelmente a cura, se obtida, não será factível para todos os pacientes. É possível que em um momento inicial se obtenha a cura somente para as pessoas cujo tratamento antirretroviral foi iniciado muito precocemente, sedo que um contingente grande células latentes ainda não foi estabelecido nestas pessoas. Importante é se ter em mente que a janela de oportunidade ainda não está totalmente fechada.

Ricardo Sobhie Diaz
CRM 57803

REFERÊNCIA

1. Hütter G, Nowak D, Mossner M, Ganepola S, Müssig A, Allers K, Schneider T, Hofmann J, Kücherer C, Blau O, Blau IW, Hofmann WK, Thiel E. Long-term control of HIV by CCR5 Delta32/Delta32 stem-cell transplantation. *N Engl J Med.* 2009 Feb 12;360(7):692-8.

PRECISAMOS NOS PREOCUPAR COM O ABACAVIR E O RISCO DE INFARTO DO MIOCÁRDIO?

DO WE HAVE TO BE CONCERNED WITH ABACAVIR AND THE RISK OF MYOCARDIAL INFARCTION?

Gustavo Albino Pinto Magalhães¹

1- Infectologista - Residência Médica de Infectologia na UERJ. Mestre e Doutor em Medicina Tropical pela Fiocruz. Professor Adjunto da Disciplina de Doenças Infecciosas e Parasitárias da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ) Membro do Comitê Técnico da Rede Nacional de Genotipagens (RENAGENO).

Endereço para Correspondência: Rua Siqueira Campos 59/307 Copacabana Rio de Janeiro-RJ CEP: 22031-070 – email: gapmagalhaes@yahoo.com.br

RESUMO

A contribuição relativa do HIV e terapia antirretroviral para a doença cardiovascular (DCV) são atualmente objeto de intensa investigação. Alguns estudos sugerem que o risco de infarto do miocárdio pode também estar aumentado com o uso do abacavir, enquanto que outros estudos não confirmam esses dados. Este artigo resume os principais estudos que devem ser interpretados com cautela, pois os dados observacionais que encontraram um significado para o abacavir estão sujeitos a vieses e fatores de confusão. Recentemente, o FDA publicou os resultados de uma meta-análise e concluíram que não houve diferença significativa na frequência de infarto do miocárdio entre pacientes que receberam e aqueles que não receberam o abacavir.

Descritores: abacavir, doença cardiovascular, antirretrovirais, HIV.

ABSTRACT

The relative contribution of HIV and antiretroviral therapy for cardiovascular disease (CVD) are currently the subject of intense investigation. Some studies suggest that the risk of myocardial infarction may also be increased with the use of abacavir, while other studies have not confirmed these data. This article summarizes the major studies that should be interpreted with caution, because observational data have found a meaning for the abacavir are subject to bias and confounding. The FDA recently published the results of a meta-analysis and concluded that there was no significant difference in the frequency of myocardial infarction among patients receiving and those not receiving abacavir.

Keywords: abacavir, cardiovascular disease, antiretroviral drugs, HIV.

INTRODUÇÃO

O abacavir foi aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) dos Estados Unidos da América (EUA) em 1998 e é indicado em combinação com outros agentes antirretrovirais (ARV) para o tratamento da infecção pelo HIV, como resultado do estudo CNA30024, em que demonstrou a não inferioridade do abacavir mais lamivudina e efavirenz, ao ser comparado com a lamivudina / zidovudina e efavirenz. Pode ser administrado a pacientes virgens e experimentados de tratamento¹.

O abacavir é geralmente bem tolerado, mas pode ocorrer uma reação de hipersensibilidade durante as primeiras seis semanas da terapêutica. Indivíduos com estes sintomas devem interromper o uso do abacavir, assim que uma reação de hipersensibilidade for considerada. Uma menor parte dos pacientes pode carregar o alelo HLA-B * 5701 e por isso, tem maior risco de experimentar uma reação de hipersensibilidade ao abacavir. Por isso, antes de iniciar o tratamento

com o abacavir, um teste sanguíneo para o HLA-B * 5701 é recomendado. Esta abordagem pode diminuir o risco de reação de hipersensibilidade, que é diagnosticada com base em critérios clínicos, em 5% a 8% dos indivíduos rastreados². Houve considerável atenção na possível relação entre o uso do abacavir e aumento do risco de infarto do miocárdio³. Um grande estudo de coorte prospectivo encontrou uma associação entre o uso recente do abacavir (e também da didanosina) e infarto³. A reavaliação do conjunto de dados demonstrou que o uso cumulativo do abacavir também foi associado com infarto agudo do miocárdio. Esta associação também foi observada em outros três estudos observacionais complementares^{4,5}, mas não tem sido observada em vários outros estudos, incluindo várias populações de diferentes ensaios clínicos^{6,7,8,9,10,11}, sendo este assunto muito discutido e pouco esclarecido.

O Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos [DHHS 2011] classificou a lamivudina / abacavir,

como parte do esquema alternativo e aceitável ao invés de um componente de esquemas preferenciais de primeira linha, com base nos relatórios da associação do abacavir com o infarto do miocárdio e o resultado dos estudos ACTG 5202, que descreveu um menor tempo até a falha virológica com abacavir, comparado ao tenofovir, nos esquemas de primeira linha, em pacientes com mais de 100.000 cópias HIV-1 RNA/mL¹², apesar de não ter tido diferença estatística no tempo até a falha virológica entre os dois braços do estudo em pacientes com HIV-1 RNA <100.000 cópias / mL¹³.

Em revisão mais recente, o *International AIDS Society* (IAS) também listou em suas recomendações a lamivudina com o abacavir, como uma combinação de análogos de nucleosídeos, uma alternativa para a primeira linha terapêutica¹⁴. Já o *guideline* da *European AIDS Clinical Society* listou a lamivudina com o abacavir, como uma combinação recomendada para a terapia de primeira linha¹⁵.

As principais mutações na transcriptase reversa, que conferem resistência ao abacavir são K65R, L74V, Y115F, e M184V¹⁶. A mutação M184V emerge rapidamente quando um regime contendo emtricitabina ou lamivudina não é totalmente supressivo. Por si só, M184V parece não conferir resistência ao abacavir em pacientes^{17,18}, mas pode adicionar à resistência quando o vírus também leva duas ou mais mutações associadas aos timidínicos – TAMs (M41L, D67N, K70R, L210W, T215Y / F, K219Q / E)¹⁸.

A contribuição relativa do HIV e terapia antirretroviral para a doença cardiovascular (DCV) são atualmente objeto de intensa investigação. Até a presente data, a maioria dos dados observacionais e retrospectivos em pacientes tratados não suporta a proposição de que a infecção pelo HIV é associada com um aumento de eventos cardiovasculares,^{19,20,21,22} mas os estudos ainda não foram capazes de definir a extensão desse relacionamento, e os mecanismos são ainda imperceptíveis. Os dados disponíveis indicam que a taxa de infarto do miocárdio é maior nas pessoas infectadas pelo HIV do que em pessoas não infectadas pelo HIV e aumenta em 32% para cada 5 anos de idade adicional³.

A prova de que esta associação é em grande parte por causa dos efeitos da própria infecção pelo HIV, é fornecido pelo SMART, um estudo prospectivo, randomizado, que demonstrou aumento das taxas de doenças cardiovasculares após a interrupção da terapia antirretroviral³². Além disso, outro grande estudo retrospectivo demonstrou que houve uma diminuição substancial nas taxas de doenças cardiovasculares no período pós-terapia antirretroviral em comparação com a era pré-terapia antirretroviral²⁴.

Os dados observacionais do D:A:D e FHDH sugerem que entre os pacientes infectados pelo HIV que recebem terapia antirretroviral, com o uso de esquemas contendo inibidores da protease, em particular aqueles que incluem o indinavir, amprenavir, fosamprenavir, ou lopinavir / ritonavir, pode estar associado a um aumento do risco de infarto do miocárdio^{3,6}. Dados do D:A:D e do SMART também sugerem que o risco de infarto do miocárdio pode também estar aumentado com o uso do abacavir³.

No estudo FHDH, uma maior taxa de infarto do miocárdio

também foi observada em pacientes que estavam recebendo abacavir para um período menor que um ano⁶; porém, a interpretação destes dados é dificultada pela falta de associação entre o uso do abacavir e o infarto do miocárdio entre pessoas que receberam o abacavir por mais de um ano, pelo uso cumulativo do abacavir, ou quando os pacientes tinham histórico de uso de drogas injetáveis ou cocaína, por terem sido excluídos da análise⁶.

Com mais de 30.000 pacientes, o D:A:D é um dos maiores estudos observacionais de coleta de dados prospectivos sobre HIV e doenças cardiovasculares e inclui a participação de 21 países na Europa, nos Estados Unidos e Austrália.

O D:A:D relatou aumento de 26% relativo na taxa de infarto agudo do miocárdio (IAM) por ano de exposição antirretroviral (95% intervalo de confiança: 1,12-1,41), durante os primeiros 4 a 6 anos de tratamento, com história de DCV, ex-fumantes, do sexo masculino como preditores significativos de risco de infarto do miocárdio²⁶. Com até sete anos de seguimento neste estudo, houve um aumento progressivo por ano, no risco de infarto, embora o risco absoluto permanecesse baixo, especialmente em comparação com os benefícios clínicos significativos da eficácia da terapia antirretroviral (TARV)²⁶.

Os primeiros relatos do D:A:D identificaram uma associação entre alguns inibidores da protease (IP), mas não ao uso de inibidores da transcriptase reversa não análogos de nucleosídeos (ITRNN) com o risco cardiovascular (risco relativo por ano: 1,16; intervalo de confiança 95%: 1,10-1,23). O risco foi reduzido, mas permaneceu significativo após ajuste para lipídios, sugerindo que o aumento do risco não é explicado unicamente pelos efeitos desses agentes em lipídios (risco relativo: 1,10, intervalo de confiança de 95%: 1,04-1,18)²⁶. Foi constatado que a exposição cumulativa aos IPs específicos, ou seja, indinavir e lopinavir/ritonavir, foi associado com um risco aumentado de infarto do miocárdio, após ajuste para lipídios e outros parâmetros metabólicos (risco relativo: 1,08, intervalo de confiança de 95%: 1,02- 1,14 e risco relativo: 1,09; intervalo de confiança de 95% :1,01-1 0,18, respectivamente)³. Essas associações não foram encontradas para o nelfinavir ou saquinavir com ou sem ritonavir.

As análises do D:A:D também têm sugerido uma associação entre o abacavir e didanosina com o risco de DCV²⁷. O uso recente do abacavir foi associado com um risco aumentado de infarto do miocárdio (risco relativo. 1,90, intervalo de confiança de 95%: 1,47 2,45), embora esse risco não pareceu aumentar com o tempo e foi reduzido após a interrupção do abacavir. Dados da didanosina foram semelhantes, embora com um menor risco relativo (risco relativo: 1,49, intervalo de confiança de 95%: 1,14-1,95).

O excesso de risco associado com o uso recente do abacavir ou o uso da didanosina não poderia ser explicado, principalmente pela presença de outros fatores de risco cardiovasculares em pacientes que tiveram prescrição desses medicamentos nesta análise. O risco atribuível a estes agentes antirretrovirais foi mais acentuada em 6% dos participantes do estudo D:A:D com risco de doença cardíaca coronária (risco em 10 anos maior que 20%).

Informações adicionais sobre o risco do IAM e o uso do

abacavir foi posteriormente relatada, incluindo estudos que não encontraram nenhuma associação significativa entre eles^{6, 7, 8, 10,11}, bem como estudos que suportam a observações do D:A:D^{3,7,28,29,30}.

Os estudos devem ser interpretados com cautela, pois os dados observacionais que encontraram um significado para o abacavir estão sujeitos a vieses e fatores de confusão. Por outro lado, os estudos que não encontraram nenhuma associação entre o uso de abacavir e o risco para DCV, não foram especificamente desenhados para analisar estes resultados, não têm o prazo de acompanhamento definido para isto, e foram realizados em populações de baixo risco, potencialmente, obscurecendo a capacidade de detectar uma associação.

Recentemente, pesquisadores procuraram avaliar a associação entre o abacavir e infarto agudo do miocárdio ou doença cerebrovascular, avaliando especificamente a doença renal crônica (taxa de filtração glomerular <60 pelo método MDRD) como um fator de confusão ainda inexplorado¹¹.

Pacientes com doença renal crônica são mais propensos a receber o abacavir, e na análise não ajustada, a doença renal crônica ($P < 0,0001$), e não o abacavir ($P = 0,081$) foi significativamente associado com infarto do miocárdio e doença cerebrovascular.

Após o ajuste para a doença renal crônica, o risco de abacavir associado ao IAM permaneceu (índice de risco: 1,16; intervalo de confiança 95%: 0,97-1,38, $P = 0,098$) não significativo. Em um modelo que considera importantes e tradicionais fatores de risco cardíaco, a associação do abacavir com o IAM foi ainda mais reduzida (risco relativo: 1,15, intervalo de confiança de 95%: 0,97-1,37, $P = 0,103$).

Um estudo recente de 61 pacientes tratados com antirretrovirais e apresentando níveis indetectáveis do HIV-1 RNA, mostraram que o uso atual do abacavir foi independentemente associado com a deficiência da função endotelial medida pela dilatação fluxo-mediada²⁸. Nesta coorte, as taxas de disfunção renal (avaliada pela depuração da creatinina) não foram significativamente diferentes nos pacientes em regimes

contendo abacavir com aqueles de outros regimes.

Um estudo retrospectivo de pacientes no sistema de Harvard Partners HealthCare mostrou uma associação com abacavir e infarto agudo do miocárdio que foi atenuada quando os pacientes com doença renal crônica foram excluídos⁹.

Recentemente, o FDA publicou os resultados de uma meta-análise de estudos randomizados de abacavir e sua relação com o IAM³¹. Vários ensaios clínicos randomizados, controlados foram incluídos, Favor Rever. Vinte e seis estudos foram identificados, incluindo um total de 9874 participantes, dos quais 5.032 receberam esquemas contendo abacavir e 4842 pacientes não usaram abacavir. O seguimento médio foi de 719 testes em pessoas-anos (intervalo: 42,2-1.257,3), e seguimento médio por participante foi de 1,62 pessoas / ano (variação: 0,49-4,72).

A conclusão que ficou a partir desta análise é que não houve diferença significativa na frequência de infarto do miocárdio entre pacientes que receberam e aqueles que não receberam o abacavir. Além disso, modelos de simulação indicaram que a probabilidade da análise ter perdido qualquer risco clinicamente significativo associado ao uso de abacavir foi baixa³¹. Uma nota de precaução é que as populações do estudo eram adultos virgens de tratamento, a maioria do sexo masculino (66% a 83%), com média de idade de 36-42 anos. Em geral, esta população de pacientes não estaria em risco elevado de IAM. Diferente, por exemplo, de uma população de pacientes com mais de 60 anos de idade e tabagistas. Por essa razão, não podemos excluir totalmente qualquer risco de IAM associado ao abacavir em nenhum paciente. Porém, esta análise representa alguma garantia de que, para a média dos pacientes virgens de tratamento, o risco de infarto não é uma questão importante, quando se considera o abacavir, sendo o seu uso realmente seguro.

Vale lembrar que alguns estudos na análise do FDA tiveram grupos controle em que não usavam abacavir, mas que estavam em uso de pelo menos um IP, que são geralmente considerados de risco aumentado de IAM.

REFERÊNCIAS

1. DeJesus E, Herrera G, Teofilo E, Gerstoff J, Buendia CB, Brand JD, Brothers CH, Hernandez J, Castillo SA, Bonny T, Lanier ER, Scott TR. Clin Infect Dis. 2004 Oct 1;39(7):1038-46. Epub 2004 Sep 10.
2. MALLAL, S. et. al. Association between presence of HLA-B*5701, HLA-DR7, and HLA-DQ3 and hypersensitivity to HIV-1 reverse-transcriptase inhibitor abacavir. Lancet. 2002 Mar 2; 359(9308):727-32.
3. WORM, SW. et. al. Risk of myocardial infarction in patients with HIV infection exposed to specific individual antiretroviral drugs from the 3 major drug classes: the data collection on adverse events of anti-HIV drugs (D:A:D) study. J. Infect. Dis, 2010 Feb 1; 201(3):318-30.
4. MARTIN, A. et. al. Simplification of antiretroviral therapy with tenofovir-emtricitabine or abacavir-Lamivudine: a randomized, 96-week trial. Clin. Infect. Dis. 2009 Nov 15; 49(10): 1591-601.
5. DURAND, M. et. al. Relation between use of nucleosidic reverse transcriptase inhibitors (NRTI) and risk of myocardial infarction (MI): a nested case control study using Quebec's public health insurance database (QPHID). Program and abstracts of the 5th International AIDS Society Conference on HIV Pathogenesis, Treatment and Prevention; July 19-22, 2009; Cape Town, South Africa. Abstract TUPEB175.
6. LANG, S. et. al. Impact of individual antiretroviral drugs on the risk of myocardial infarction in human immunodeficiency virus-infected patients: a case-control study nested within the French Hospital Database on HIV ANRS cohort CO4. Arch Intern Med, 2010 Jul 26; 170(14): 1228-38.
7. CURTEL, A. et. al. Abacavir and the potential risk of myocardial infarction. Lancet. 2008 Apr 26; 371(9622):1413. Epub 2008 Apr 2.
8. BENSON, C. et. al. No association of abacavir use with risk of myocardial infarction or severe cardiovascular disease events: results from ACTG A5001 Program and abstracts of the 16th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections; February 8-11, 2009; Montréal, Canada. Abstract 721.
9. TRIANT, V. et. al. Increased acute myocardial infarction rates and cardiovascular risk factors among patients with HIV disease. - Program and abstracts of the XVIII International AIDS Conference; July 18-23, 2010; Vienna, Austria. Abstract WEPE0130.
10. CRUCIANI, M. et. al. Abacavir use and cardiovascular disease events: a meta-analysis of published and unpublished data. Program and abstracts of the XVIII International AIDS Conference; July 18-23, 2010; Vienna, Austria. Abstract WEPE0121.
11. BEDIMO, R. et. al. Abacavir use and risk of acute myocardial infarction and cerebrovascular disease in the HAART. Program and abstracts of the 5th International AIDS Society Conference on HIV Pathogenesis, Treatment and Prevention; July 19-22, 2009; Cape Town, South Africa. Abstract MOAB202.
12. SAX, PE. et. al. Abacavir-lamivudine versus tenofovir-emtricitabine for initial HIV-1 therapy. - N Engl J Med. 2009, Dec 3; 361(23):2230-40. Epub 2009, Dec. 1.
13. US Department of Health and Human Services. Guidelines for the use of antiretroviral agents in HIV-1-infected adults and adolescents. January 10, 2011. Disponível

- em: <http://www.aidsinfo.nih.gov/ContentFiles/AdultandAdolescentGL.pdf>. Accessed February 2, 2011.
14. THOMPSON, MA et. al. Antiretroviral treatment of adult HIV infection: 2010 recommendations of the International AIDS Society-USA panel. *JAMA*, 2010, Jul 21; 304(3): 321-33.
 15. European AIDS Clinical Society. Clinical management and treatment of HIV-infected patients in Europe. Disponivel em: <http://www.europeanaidscinicalsociety.org/guidelines.asp>. Accessed March 1, 2011.
 16. JOHNSON, VA. et. al. Update of the drug resistance mutations in HIV-1: December 2009. - *Top HIV Med.* 2009, Dec; 17(5):138-45.
 17. HARRIGAN, PR. et. al. Resistance profile of the human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase inhibitor abacavir (1592U89) after immunotherapy and combination therapy. CNA2001 Investigative Group. *J Infect Dis.* 2000, Mar; 181(3):912-20.
 18. LANIER, ER. et. al. Antiviral efficacy of abacavir in antiretroviral therapy-experienced adults harbouring HIV-1 with specific patterns of resistance to nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Antivir Ther.* 2004, Feb; 9(1):37-45.
 19. HOLMBERG, SD. et. al. Protease inhibitors and cardiovascular outcomes in patients with HIV-1. *Lancet.* 2002, Nov 30; 360(9347): 1747-8.
 20. TRIANT, VA. et. al. Increased acute myocardial infarction rates and cardiovascular risk factors among patients with human immunodeficiency virus disease. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007, Jul; 92(7):2506-12. Epub 2007 Apr 24.
 21. MARY KRAUSE, M. et. al. Increased risk of myocardial infarction with duration of protease inhibitor therapy in HIV-infected men. *AIDS* 2003, Nov 21; 17(17):2479-86.
 22. CURRIER, J. et. al. Coronary heart disease in HIV-infected individuals. - *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2003, Aug 1; 33(4):506-12.
 23. Strategies for Management of Anti-Retroviral Therapy/INSIGHT; DAD Study Groups. Use of nucleoside reverse transcriptase inhibitors and risk of myocardial infarction in HIV-infected patients. *AIDS.* 2008;22:F17-F24.
 24. BOZZETTE, SA. et. al. Cardiovascular and cerebrovascular events in patients treated for human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med.* 2003, Feb 20; 348(8):702-10.
 25. BROTHERS, CH. et. al. Risk of myocardial infarction and abacavir therapy: no increased risk across 52 GlaxoSmithKline-sponsored clinical trials in adult subjects. *J. Acquir Immune Defic. Syndr.* 2009, May 1; 51(1):20-8.
 26. FRIIS MOLLER, N. et. al. Class of antiretroviral drugs and the risk of myocardial infarction. *N Engl J Med.* 2007, Apr 26; 356(17):1723-35.
 27. SABIN, CA. et. al. Use of nucleoside reverse transcriptase inhibitors and risk of myocardial infarction in HIV-infected patients enrolled in the D: A: D study: a multi-cohort collaboration. Monforte A, Friis-Moller N, Kirk O, Pradier C, Weller I, Phillips AN, Lundgren JD.2008.
 28. HSUE, PY. et. al. Association of abacavir and impaired endothelial function in treated and suppressed HIV-infected patients. *AIDS.* 2009, Sep 24; 23(15):2021-7.
 29. SATCHELL, CS. et. al. Platelet function and HIV: a case-control study. *AIDS* 2010, Mar 13; 24(5):649-57.
 30. MARTIN, A. et. al. Simplification of antiretroviral therapy with tenofovir-emtricitabine or abacavir-Lamivudine: a randomized, 96-week trial. *Clin Infect Dis.* 2009, Nov 15; 49(10):1591-601.
 31. Ding X, Andraca-Carrera E, Cooper C, et al. No association of myocardial infarction with ABC use: an FDA meta-analysis. Program and abstracts of the 18th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections; February 27 - March 2, 2011; Boston, Massachusetts. Abstract 808.
 32. Major clinical outcomes in antiretroviral therapy (ART)-naive participants and in those not receiving ART at baseline in the SMART study. Emery S, Neuhaus JA, Phillips AN, Babiker A, Cohen CJ, Gatell JM, Girard PM, Grund B, Law M, Losso MH, Palfreeman A, Wood R. *J Infect Dis.* 2008 Apr 15;197(8):1133-44.

RELÓGIO MOLECULAR E TAXAS EVOLUTIVAS DO HIV-1 ATRAVÉS DA ANÁLISE DE COALESCÊNCIA DE SEQUÊNCIAS DA INTEGRASE E ENV (V2V3) OBTIDAS DO HIV DATABASE

HIV-1 MOLECULAR CLOCK AND EVOLUTIONARY RATES THROUGH COALESCENCE ANALYSIS OF INTEGRASE AND ENV (V2V3) SEQUENCES OBTAINED FROM HIV DATABASE

Jean Paulo Lopes Zukurov¹, Luiz Mário Ramos Janini^{1,2}

1 - Departamento de Medicina, Disciplina de Infectologia, Escola Paulista de Medicina/Universidade Federal de São Paulo.

2 - Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Escola Paulista de Medicina/Universidade Federal de São Paulo.

Endereço Laboratório de Retrovirologia, Universidade Federal de São Paulo Rua Pedro de Toledo, 781, 16º andar, Vila Clementino 04039032 - São Paulo – SP. Brasil. jpaulo_001@yahoo.com

RESUMO

A idéia de que as espécies são historicamente relacionadas através de descendentes comuns e que e que estes divergem ao decorrer do tempo é uma das previsões de Darwin. A Inferência Bayesiana é uma metodologia relativamente recente para a inferência de árvores filogenéticas e se baseia na probabilidade posterior de distribuição de árvores. Neste trabalho foi realizada a comparação entre o gene da *integrase* e porção V2V3 do gene *env* do HIV-1, para verificar o tempo de coalescência e taxas evolutivas. Foram coletadas 136 sequências da região da *integrase* no gene *pol* e 168 sequências da região compreendida entre V2V3 no gene *env*, do HIV-1 grupo M dos subtipos A; B; C; D e F, com distribuição mundial abrangendo todos os continentes e a Austrália no período de 1981 até 2006. As sequências foram coletadas do "HIV database". Os resultados obtidos demonstram que o período de maior crescimento demográfico do HIV-1 grupo M se iniciou entre 1955 e 1966, respectivamente para V2V3 e *integrase*, com HPD 95% variando entre 1945 e 1970, sendo que se estabilizou apresentando um platô no final dos anos 70 e início dos anos 80.

Descritores: HIV-1, Relógio Molecular, Inferência Bayesiana e Coalescência.

ABSTRACT

The idea that species are historically related through common descendents and they diverge over time is one of the predictions of Darwin. The Bayesian inference is a relatively new methodology for the inference of phylogenetic trees and is based on the posterior probability of a distribution of trees. In our study a comparison between the *Integrase gene* and the V2V3 portion of *env* was used to infer the time of coalescence and evolutionary rates. We collected 136 sequences of the *integrase* gene and 168 sequences of V2V3 from HIV-1 group M subtypes A, B, C, D and F. Sequences were selected from a worldwide distribution spanning all continents and Australia from 1981 to 2006. These sequences were collected from the HIV database. The results show that the period of greatest population growth of HIV-1 group M started between 1955 and 1966, respectively when V2V3 and *integrase* we analyzed, with 95% HPD range between 1945 and 1970, and stabilized by presenting a plateau at the end of '70s and early '80s.

Keywords: HIV-1, molecular clock, Bayesian Inference and Coalescence.

HISTÓRICO

A origem do HIV ainda tem sido tema de intensos debates na comunidade científica nos dias de hoje devido ao grande e repentino impacto que a pandemia causou na sociedade humana desde seu surgimento em meados da década de 1980^{1,2}. O súbito aparecimento de pacientes infectados por

um novo vírus, aliado ao fato da doença suscitada pelo mesmo ser de difícil caracterização e tratamento, fomentaram inúmeras teorias acerca de como e quando o HIV surgiu em nosso meio; para tanto, a compreensão da origem de vírus correlatos ao HIV, isto é, demais retrovírus, é de grande valia ao estudo específico da origem deste vírus peculiar³. Existem inúmeras especulações acerca da origem dos retro-

vírus, entrelaçando-se não somente com a origem de demais vírus animais e vegetais como também com a origem da vida no planeta, de forma que a natureza evolutiva dos retrovírus exemplifica bem a capacidade adaptativa dos vírus ao longo da história natural da Terra^{4,5}. Como exemplo dessa natureza evolutiva em constante modificação, estudos demonstraram que células de linhagem germinativa de *lêmures-pigmeus* cinzentos de Madagascar (*Microcebus murinus*), isolados de demais primatas autóctones do continente africano há mais de 14 milhões de anos atrás, são infectadas por um lentivírus endógeno que consiste em uma possível forma viral de transição cuja organização genômica é intermediária entre os lentivírus que não infectam primatas e os infectantes, indicando que os retrovírus encontram-se em franca evolução e podem ser mais antigos e mais amplamente distribuídos do que se imaginava até pouco tempo atrás⁶.

A maioria dos retrovírus caracterizados como emergentes infecta diferentes seres vivos a partir de transmissão zoonótica através de um gradual processo de cruzamento da barreira inter-espécies após múltiplos eventos independentes de transmissão associados a mecanismos geradores de diversidade genética/instabilidade genômica típicos de vírus de genoma de RNA, tais como mutações e recombinações, bem como à adaptação viral ao hospedeiro⁷⁻⁸. Além disso, inúmeros autores têm destacado a existência tanto de mecanismos intracelulares de restrição à transmissão retroviral inter-espécies bem como de facilitadores da mesma transmissão que podem exercer influência na adaptação viral aos novos hospedeiros recém-infectados⁹⁻¹².

Semelhantemente ao exposto acima, a maioria dos pesquisadores atribui ao HIV-1 uma origem zoonótica, sendo este derivado da adaptação ao hospedeiro humano de um retrovírus infectante do primata *Pan troglodytes*, o vírus da imunodeficiência símia de chimpanzés (SIVcpz), ao passo que o HIV-2 é derivado do retrovírus SIVsm, que infecta primatas africanos *Cercocebus atys* (mangabei da nuca branca); contudo, essa hipótese de origem zoonótica não é consenso entre todos os pesquisadores, pois há questionamentos sobre a transposição da barreira inter-espécies e a divergência genética existente entre os dois tipos de HIV, 1 e 2, cada um derivado de um SIV distinto^{13,14-15}.

Uma vez determinado o reservatório primário do ancestral do HIV-1 na natureza, questionou-se em qual região específica do continente africano o SIVcpz transpôs a barreira específica chimpanzé-homem, e quais circunstâncias levaram a essa transposição¹⁶. Atualmente, a teoria mais aceita para essa transposição e estabelecimento inicial da doença na África é a “teoria do caçador” (do inglês hunter theory), segundo a qual o SIVcpz foi sendo gradualmente transferido à humanos que caçavam chimpanzés para fins alimentares através do contato de fluidos biológicos dos primatas com cortes ou feridas nos seres humanos em associação à práticas coloniais comuns na África Equatorial Francesa (região de ampla distribuição do símio *Pan troglodytes troglodytes*) do final do século XIX e início do século XX, tais como disseminação de campos de trabalho forçados e campanhas de vacinação com agulhas reutilizáveis¹⁷⁻¹⁸. Não obstante, estudos descreveram como esses eventos de transferência de retrovírus originalmente símios ocorrem ainda hoje na África através do consumo e retalhamento de carne de primatas por humanos, corroborando a hipótese de adaptação gradual do

SIVcpz ao hospedeiro humano e levando, à longo prazo, à geração de um retrovírus totalmente adaptado tal como o HIV-1¹⁹. Em detrimento da “teoria do caçador”, também existem inúmeras outras hipóteses bem estabelecidas, em alguns casos, acerca dessa transposição, variando desde transmissão iatrogênica (i.e., via medicamentos contaminados) e transmissão via uso de vacinas contra poliomielite produzidas em tecidos de macacos infectados por SIVcpz até teorias puramente colonialistas que suscitam discussões acirradas no meio acadêmico^{20,21,22-23}.

A amostra mais antiga de paciente comprovadamente infectado pelo HIV-1 anterior aos casos registrados no início da década de 1980 é proveniente de Kinshasa, República Democrática do Congo, e data de 1959²⁴. De maneira semelhante estudos concluíram que o aumento do número de aplicações de injeções não-estéreis na África entre as décadas de 1950 e 1970 pode ter fornecido a via ideal de transmissão do SIVcpz aos humanos, possibilitando a emergência do HIV-1 durante esse período de tempo de 20 anos consistente com a data da amostra do paciente congolês²⁵. Contudo, trabalhos recentes demonstraram que já no início da década de 1960 o HIV-1 exibia uma considerável diversidade genética populacional na África centro-ocidental e que a transição chimpanzé-homem provavelmente ocorreu em meados de 1908²⁶.

REVISÃO DOS MÉTODOS

O método de Inferência Bayesiana na análise filogenética gera uma distribuição a posteriori de parâmetros estimados, sendo composto por uma árvore filogenética e um modelo de evolução. A abordagem bayesiana tem se tornado mais popular, nos últimos anos, devido aos avanços dos algoritmos computacionais, especialmente, da Cadeia de Markov com algoritmos de Monte Carlo (MCMC)²⁷.

A principal diferença da inferência bayesiana em relação a outros métodos estatísticos, como a verossimilhança, por exemplo, é que é possível incluir informações prévias (prior information) relacionadas à filogenia ou modelos através de uma distribuição a priori das árvores ou modelos a priori. Quando estas informações estão disponíveis, da maneira correta, espera-se que os parâmetros estimados em análises separadas terminem por convergir em uma região específica do espaço²⁸. A probabilidade posterior de um evento randômico qualquer é a probabilidade condicional, que é determinada após evidências relevantes. Para calcular probabilidade posterior de uma variável randômica é utilizado o teorema de Bayes. Abaixo a fórmula geral do teorema de Bayes derivada da formulação da probabilidade condicional.

$$\Pr(T, \theta / X) = \frac{\Pr(T / \theta, X) \cdot \Pr(T, \theta)}{\Pr(X)}$$

(X): consiste no dado do próprio alinhamento. Os parâmetros a serem estimados são: Árvore (T) e Parâmetros dos modelos de substituição (θ). (Pr) probabilidade.

A equação acima mostra que para calcular a probabilidade posterior é necessário calcular todas as combinações possíveis de árvores, ou seja, todas as topologias possíveis²⁹. Entretanto o exemplo acima só pode ser aplicado para pou-

cas sequências e estas não podem ser muito longas. Para a solução deste problema a probabilidade posterior é usualmente aproximada utilizando o algoritmo de MCMC, também conhecido como Gibbs Sampling³⁰⁻³¹. A simulação MCMC começa a análise através de parâmetros randômicos e sucessivamente sugerem novos parâmetros a partir dos atuais, na tentativa de obter uma ampla amostragem de topologias possíveis. Este processo de geração de parâmetros, e sua suposta aceitação ou rejeição, é repetido milhões de vezes na tentativa de percorrer o espaço paramétrico e gerar uma distribuição posterior³².

As aplicações dos métodos de análise filogenéticas são bastante variadas e distintas. Estas aplicações compreendem desde o entendimento da organização genômica até mesmo da epidemiologia. Atualmente qualquer estudo de seqüências de DNA de diferentes espécies ou a partir de indivíduos de uma população, tem como base a inferência e análise filogenética. Esta análise é importante para que possamos compreender melhor o desenvolvimento do vírus ao longo do tempo e estabelecer taxas evolutivas. Este trabalho tem como objetivo realizar uma comparação entre o gene da *Integrase* (*pol*) e a região V2V3 de *env* para verificar o tempo de coalescência e suas taxas evolutivas.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram adquiridas 136 sequências do gene da *Integrase* e 168 sequências da região compreendida entre V2V3 no gene *env*, do HIV-1 grupo M dos subtipos A; B; C; D e F, com distribuição mundial abrangendo todos os continentes e a Austrália no período de 1981 até 2006. As sequências referidas foram coletadas do "HIV database" (<http://www.hiv.lanl.gov>). As sequências de DNA foram alinhadas com o programa T-Coffe - Multiple Sequence Alignment Tools (Center for Genomic Regulation - CGR, Pompeu Fabra University, ES)³³, em PC Linux. Foi utilizado o software ModelTest v3.7 em conjunto com o software Paup 4.0b, para realizar os testes estatísticos hLRT (hierarchical Likelihood Ratio Tests) e AIC (Akaike Information Criterion), para a escolha do melhor modelo de substituição dentre os 56 existentes (Department of Zoology, Brigham Young University, USA)³⁴.

Antes do início das análises foi realizada a relação entre transições e transversões, utilizando o software Dambe - Data Analysis and Molecular Biology and Evolution v5.0.32 (CAREG Laboratories, University of Ottawa, USA)³⁵, em PC Windows, para verificar o sinal filogenético das sequências coletadas. O programa BEAST foi utilizado para realizar a estimativa da data de coalescência e taxa de substituição de nucleotídeos por sítio por ano. Neste trabalho assumimos o relógio relaxado não correlacionado e testamos os modelos demográficos: *constant population size*, *exponential growth* e *logistic growth*³⁶. Foram realizadas corridas com 2×10^7 gerações e *burn-in* de 25%. As árvores foram analisadas com o programa FigTree e os parâmetros de convergências sumarizados com o programa Tracer v1.4., ambos pertencentes ao pacote do BEAST (Department of Zoology, Oxford University (<http://evolve.zoo.ox.ac.uk/software>)).

RESULTADOS

A escolha do melhor modelo de substituição de nucleotídeos, dentre os 56 existentes, foi realizada utilizando o software

Modeltest 3.7 em conjunto com o software Paup 4.0b. Ambos os testes estatísticos usados para calcular o melhor modelo, hLRT (Hierarchical Likelihood Ratio Tests) e AIC (Akaike Information Criterion), apresentaram melhor resultado para o modelo de substituição GTR + I + Γ (GTR: General Time reverse, I: sítios invariantes e Γ : distribuição gamma), tanto do gene da *Integrase* como para a região compreendida entre V2V3. A verificação da saturação do número de transições versus transversões apresentou resultado bastante satisfatório, indicando a presença de sinal filogenético forte tanto para o gene da *integrase* quanto para a região V2V3 do gene *env*. A data de coalescência para o gene da *integrase*, assumindo relógio relaxado não correlacionado com modelo demográfico: *constant population size*, foi estimada em 1915, com HPD (Highest Posterior Density) 95% variando entre 1893 e 1937. O Bayesian Skyline Plot mostrou que o período de grande crescimento demográfico do HIV-1 grupo M ocorreu em 1966, com HPD 95% variando entre 1958 e 1970, sendo que estabilizou apresentando um platô no final dos anos 70 e início dos anos 80.

A data de coalescência para a região compreendida entre V2V3, assumindo relógio relaxado não correlacionado com modelo demográfico: *constant population size*, foi estimada em 1922, com HPD 95% variando entre 1912 e 1932. O Bayesian Skyline Plot mostrou que o período de grande crescimento demográfico do HIV-1 grupo M ocorreu em 1955, com HPD 95% variando entre 1945 e 1962, sendo que estabilizou apresentando um platô no final dos anos 70 e início dos anos 80.

Na figura 1 podemos ver histogramas da *integrase* e V2V3. A taxa de substituições/sítio/ano da *integrase* foi estimada como $1,38 \times 10^{-3}$, com Intervalo HPD 95% estimado entre $1,04 \times 10^{-3}$ e $1,68 \times 10^{-3}$. A taxa de Substituições/sítio/ano do gene *env*, região V2V3, foi estimada como $3,66 \times 10^{-3}$, com Intervalo HPD 95% flutuando entre $2,92 \times 10^{-3}$ e $4,40 \times 10^{-3}$.

A taxa de Substituições/sítio/ano da *integrase* foi estimada em $1,38 \times 10^{-3}$ e da região V2V3 estimada em $3,66 \times 10^{-3}$, ou seja, região V2V3 apresenta uma taxa de substituição/sítio/ano quase três vezes maior que a região da *integrase*. Entretanto essa diferença já era esperada, pois a região da *integrase* é mais conservada que a região compreendida entre V2V3 do gene *env*, que codifica proteínas do envelope do vírus HIV-1. Isso pode ser explicado pela resposta imunológica do hospedeiro a agentes infecciosos que exercem fortes pressões seletivas favorecendo o aparecimento de mutações de escape para prevenir a resposta imunológica³⁷⁻³⁸.

Apesar desta diferença nas taxas de substituições/sítio/ano entre V2V3 e *integrase* variando na ordem de aproximadamente três vezes, a data de coalescência para ambas as sequências foram bastante próximas variando apenas sete anos na média da HPD 95%. Estatisticamente levando-se em consideração a flutuação dos intervalos HPD 95% de ambas as amostragens, praticamente não existe diferença na data de coalescência, ou seja, as datas são estaticamente equivalentes.

Os resultados presentes neste estudo tanto para *integrase* quanto V2V3 são condizentes com os resultados encontrados por outros estudos³⁹⁻⁴⁰, que demonstraram datas de coalescência e taxas de substituições/sítio/anos muito próximas as encontradas em nosso trabalho. Outro estudo utilizando uma amostra, recuperada, de 1959 (ZR59) e outra de 1960 (DRC60), ambas da África, sendo que esta de 1959 é a mais antiga conhecida para o HIV-1 grupo M, mostrou que a en-

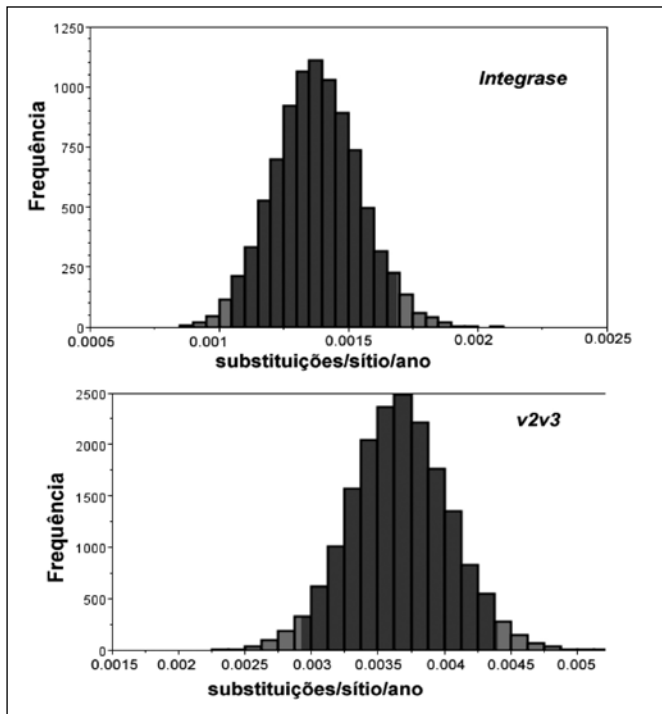


Figura 1: histograma taxa de substituição/sítio/ano. No eixo Y temos a frequência de visitas através de processo randômico para determinada taxa de substituição no eixo X. A parte azul corresponde ao HPD (Highest Posterior Density) sendo um conjunto que contém 95% dos valores amostrados. A parte vermelha do gráfico representa os 5% restantes que não fazem parte do HPD. Apenas a parte azul do histograma, ou seja, o HPD é levado em consideração para estimar a média final da taxa de substituições/sítio/ano.

trada ou transição do HIV-1 ou seu ancestral de símios para humanos ocorreu por volta de 1908²⁶. Estas duas amostras permitiram uma melhor eficiência na calibração da regressão linear na estimativa da data de coalescência. Esta data estimada em 1908, com HPD 95%, apresentou intervalos entre 1984 e 1924. Na figura 2 pose-se observar a inferência filogenética para a *integrase*.

O *Bayesian Skyline Plot* mostrou que o período de grande crescimento demográfico do HIV-1 grupo M se iniciou entre 1955 e 1966, respectivamente para *V2V3* e *integrase* com HPD 95% variando entre 1945 e 1970, sendo que estabilizou apresentando um platô no final dos anos 70 e início dos anos 80. Estes resultados são interessantes, pois indicam que nos anos 70 o crescimento demográfico do HIV-1 grupo M foi intenso, estando de acordo com publicações prévias, pois acredita-se que a entrada do vírus HIV-1 no Brasil ocorreu durante esta década⁴¹.

No final dos anos 50 e início dos anos 60 estava ocorrendo uma revolução, busca por liberdade de expressão e liberdade sexual. O surgimento da pílula anticoncepcional, no início da década, foi responsável por um comportamento sexual feminino mais liberal, o movimento da liberação sexual também nos anos 60 foi importante⁴². Talvez estes fatos tenham ajudado e facilitado a propagação do vírus HIV-1 e esse grande crescimento demográfico que se acompanhou a partir desta década e se estabilizou somente nos final dos anos 70 e início dos anos 80. As figuras 3 e 4 representam o crescimento demográfico do HIV-1, *Bayesian Skyline Plot*, realizado para a região da *integrase* e *V2V3*.

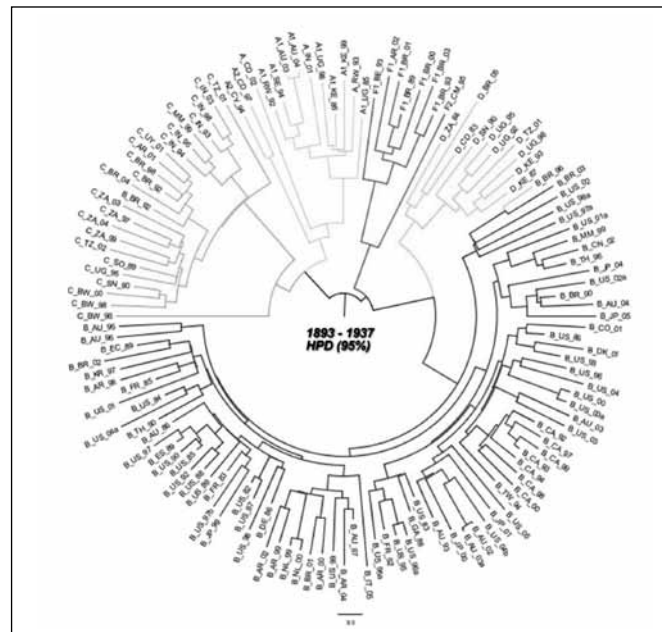


Figura 2: inferência filogenética da *integrase*. Árvore gerada assumindo relógio relaxado não correlacionado com modelo demográfico: constant population size, pode-se observar o intervalo HPD 95% e a data estimada de Coalescência para o vírus HIV-1 grupo M. A cores são representativas dos subtipo do HIV-1, sendo azul – subtipo B, vermelho – subtipo F, verde água – subtipo C, verde – subtipo D e amarelo – subtipo A.

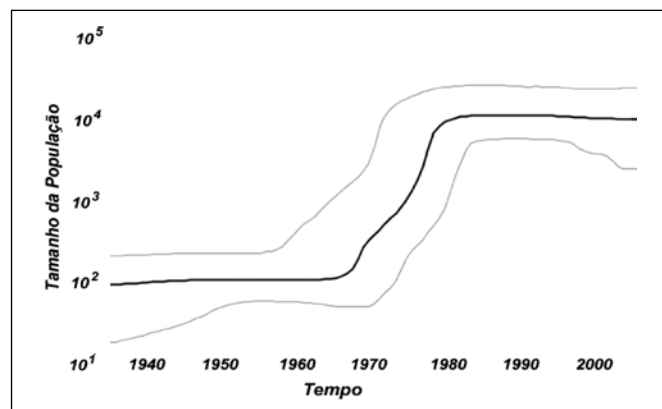


Figura 3: *integrase* - bayesian skyline plot. Grande crescimento do vírus HIV-1 a partir dos anos 60. Linhas azuis representam o intervalo HPD 95% e linha preta a média baseada neste intervalo de confiança.

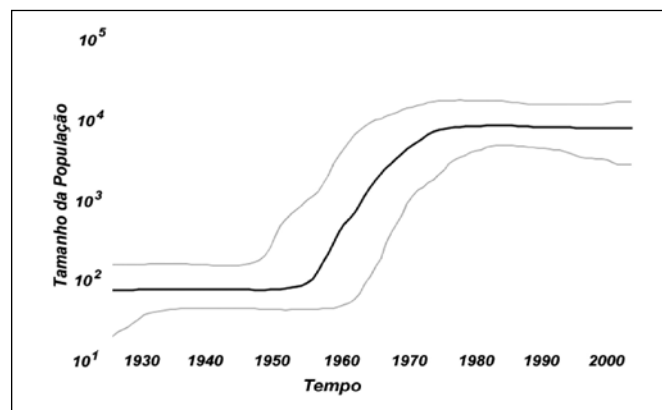


Figura 4: *V2V3* - BAYESIAN SKYLINE PLOT. Grande crescimento do vírus HIV-1 grupo M a partir de meados dos anos 50. Linhas azuis representam o intervalo HPD 95% e linha preta a média baseada neste intervalo de confiança.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A Região V2V3 apresenta taxa de substituições/sítio/ano na ordem de 2,65 vezes a mais que a região da *Integrase* ao longo do tempo. Este resultado corrobora com o esperado, pois região V2V3 é mais polimórfica que a região da *integrase*. Apesar da diferença na taxa de substituições/sítio/ano a data de coalescência foi estatisticamente equivalente para V2V3 e *integrase*. Relógio relaxado não correlacionado com

modelo demográfico: *constant population size*, parece ser o modelo ideal para estas amostras. A data de coalescência do HIV-1 grupo M, baseada nas estimativas da *integrase* e V2V3, foi estimada no intervalo HPD 95% 1893 - 1932. O *Bayesian Skyline Plot* sugere que o aumento da liberdade sexual nos anos 60, uso de drogas e compartilhamento e pílulas anticoncepcionais possam ter participação no crescimento demográfico observado a partir desta década.

REFERÊNCIAS

- Hahn BH, Shaw GM. AIDS as a zoonosis: scientific and public health implications. *Science* 2000; 287(1): 607-614.
- Martin B. The burden of proof and the origin of acquired immune deficiency syndrome. *Phil Trans R Soc Lond B* 2001; 356(1): 939-944.
- Pedersen AB, Davies TJ. Cross-species pathogen transmission and disease emergence in primates. *EcoHealth* 2010; 06(04): 496-508.
- Holland J, Domingo E. Origin and evolution of viruses. *Virus Genes* 1998; 16(1): 13-21.
- Wayengera M. On the general theory of the origins of retroviruses. *Theor Biol Med Model* 2010; 7(5): 1-13.
- Gifford RJ, Katzourakis A. A transitional endogenous lentivirus from the genome of a basal primate and implications for lentivirus evolution. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105(51): 20362-20367.
- Marx PA, Apetrei C. AIDS as a zoonosis? Confusion over the origin of the virus and the origin of the epidemics. *J Med Primatol* 2004; 33(1): 220-226.
- Heeney JL, Dalgleish AG. Origins of HIV and the evolution of resistance to AIDS. *Science* 2006; 313(1): 462-466.
- Han Y, Wang X. APOBEC3G and APOBEC3F require an endogenous cofactor to block HIV-1 replication. *PLoS Pathogens* 2008; 4(7): 1-11.
- Romani B, Engelbrecht S. Antiviral roles of APOBEC proteins against HIV-1 and suppression by Vif. *Arch Virol* 2009; 154(1): 1579-1588.
- Douglas JL, Gustin JK. The great escape: viral strategies to counter BST-2/tetherin. *PLoS Pathogens* 2010; 6(5): 1-12.
- Vandewoude S, Troyer J. Restrictions to cross-species transmission of lentiviral infection gleaned from studies of FIV. *Vet Immunol Immunopath* 2010; 134(1): 25-32.
- Gao F, Bailes E. Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes troglodytes*. *Nature* 1999; 397(1): 436-441.
- Holmes EC. On the origin and evolution of the human immunodeficiency virus. *Biol Rev* 2001; 76(1): 239-254.
- Gardner MB. Simian AIDS: an historical perspective. *J Med Primatol* 2003; 32(1): 180-186.
- Telenti A. Adaptation, co-evolution, and human susceptibility to HIV-1 infection. *Infect Gen Evol* 2005; 5(1): 327-334.
- Chitnis A, Rawls D. Origin of HIV type 1 in colonial French Equatorial Africa? *AIDS Res Hum Retroviruses* 2000; 16(1): 5-8.
- Van Heuverswyn F. Genetic diversity and phylogeographic clustering of SIVcpzPtt in wild chimpanzees in Cameroon. *Virology* 2007; 368(1): 155-171.
- Wolfe ND. Naturally acquired simian retrovirus infections in central African hunters. *Lancet* 2004; 363(9413):932-7.
- Dickson D. Tests fail to support claims for origin of AIDS in polio vaccine. *Nature* 2000; 407(6801): 117.
- Goldberg B, Stricker RS. Bridging the gap: human diploid cell strains and the origins of AIDS. *J Theor Biol* 2000; 204(1): 497-503.
- Beale J, Horaud F. Polio vaccine and retroviruses. *Phil Trans R Soc Lond B* 2001; 356(1): 841-843.
- Barnett OE, Worobey M, Holmes EC, Cooper A. Detection of TT virus among chimpanzees in the wild using a noninvasive technique. *J Wildl Dis* 2004; pr,40(2):230-7
- Zhu T. An African HIV-1 sequence from 1959 and implications for the origin of the epidemic. *Nature* 1998; 391(6667): 594-597.
- Marx PA. Serial human passage of simian immunodeficiency virus by unsterile injections and the emergence of epidemic human immunodeficiency virus in Africa. *Phil Trans R Soc Lond B* 2001; 356(1): 911-920.
- Worobey M, Gemmel M, Teuwen DE, Haselkorn T, Kunstman K, Bunce M, Muyembe JJ, Kabongo JM, Gilbert MT, Wolinsky SM. Direct evidence of extensive diversity of HIV-1 in Kinshasa by 1960. *Nature* 2008; 455(7213):661-4.
- MAU W, BORNMANN M, WEBER H, WEIDEMANN HF. Deficiencies in rehabilitation measures in the course of early chronic polyarthritis. *Z Rheumatol* 1996; 55(4):223-9.
- Huelsensbeck JP, Larget B, Miller RE, Ronquist F. Potential applications and pitfalls of Bayesian inference of phylogeny. *Systematic Biology* 2001; 51:673-688.
- Huelsensbeck JP, Ronquist F. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 2002; 17(8):754-755.
- Mau B, MA, Newton, and B. Larget. Bayesian phylogenetic inference via Markov chain Monte Carlo methods. *Biometrics* 1999; 5:1-12.
- Yang Z, B Rannala. Bayesian phylogenetic inference using DNA sequences: a Markov chain Monte Carlo method. *Molecular Biology and Evolution* 1997; 14:717-724.
- HUELSENBECK JP, LARGET B, RONQUIST F. Efficiency of markov chain monte carlo tree proposals in bayesian phylogenetics. *Syst. Biol* 2008; 57(1):86-103.
- Notredame C, Higgins DG, Heringa J. T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *J Mol Biol* 2000; 302(1):205-17.
- Posada D, Crandall KA. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 1998;(9):817-818.
- Xia X, Xie Z. DAMBE: software package for data analysis in molecular biology and evolution. *J Hered* 2001; 92(4): 371-3.
- Drummond AJ, Rambaut A. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evol Biol* 2007; 7: 214.
- Delport W, Scheffler, K., Seoighe, C. Frequent Toggling between Alternative Amino Acids Is Driven by Selection in HIV-1. *PLoS Pathog* 2008.
- Pinter A. Roles of HIV-1 Env variable regions in viral neutralization and vaccine development. *Curr HIV Res* 2007; (5)6:542-53.
- Vandamme AM. The molecular population genetics of HIV-1 group O. *Genetics* 2004; 167(3):1059-68.
- Bhattacharya T. Timing the ancestor of the HIV-1 pandemic strains. *Science* 2000; 288(5472):1789-96.
- Bello G, Eyer-Silva WA, Couto-Fernandez, J. C., Guimaraes, M. L., Chequer-Fernandez, S. L., Teixeira, S. L. e Morgado, M. G. Demographic history of HIV-1 subtypes B and F in Brazil. *Infect Genet Evol* 2007; (7)2:263-70.
- ADELMAN, M. Paradoxos da identidade: a política de orientação sexual no século XX. *Rev Sociol Polit* 2000; n14.

SEGUE O SECO

GET THE HIV-1 DRIED

Michelle Zanoni

Laboratório de Retrovirologia – Disciplina de Infectologia – UNIFESP

Endereço para correspondência: Rua Pedro de Toledo, 781 - 16º andar, CEP 04039-032 - SP – Brasil,

michellezanoni@gmail.com

RESUMO

Mais de 97 % das novas infecções diárias por HIV-1 no mundo ocorrem em países com rendas per capita baixas e médias, onde a escassez de recursos impede o tratamento e o monitoramento das infecções. Embora a terapia antirretroviral combinada (HAART) aliada aos diagnósticos de carga viral, contagem das células T CD4+ e genotipagem do HIV-1 tenham garantido um monitoramento eficaz da utilização da terapia e proporcionado um aumento dramático na expectativa de vida dos pacientes esta não é a realidade nos locais com recursos limitados. A pesquisa no desenvolvimento de metodologias que melhorem o acesso desses pacientes aos tratamentos e diagnósticos do HIV-1 é uma prioridade que deve ser considerada e implementada. Uma das alternativas promissoras que vêm sendo empregadas para diminuir os custos atrelados ao transporte e armazenamento de amostras biológicas para monitoramento da carga viral e também da genotipagem do HIV-1 é o uso de sangue ou plasma em estado seco em metodologias usando o *dried blood spot* (DBS) ou o ViveST, os quais não requerem o congelamento das amostras e portanto podem ser transportados pelo correio e armazenados à temperatura ambiente.

Descritores: diagnóstico, acesso ao tratamento, genotipagem do HIV, ViveST.

ABSTRACT

Throughout the world, over 97% of new HIV-1 infections a day are in low and middle income countries, whose limited resources hampers the treatment and monitoring of infections. Although highly active antiretroviral therapy (HAART) together with diagnostics in viral load, CD4+ T cell counting and HIV-1 genotyping have provided a successful therapy monitoring and a dramatic increase in life expectancy among HIV-1 infected patients, these are not the circumstances of patients living in resource-poor settings. The development of methodologies that improve the access of patients to HIV-1 treatments and diagnosis must be considered a priority to be employed. The usage of whole blood or plasma in a dried state is a potential cost-effective alternative to the conventional shipping of frozen samples. With regard to viral load monitoring and HIV-1 genotyping, dried blood spot (DBS) and ViveST have been successfully applied.

Keywords: diagnosis, treatment access, HIV genotyping, ViveST.

INTRODUÇÃO

Segundo o último painel epidemiológico publicado pela UNAIDS em 2010, 33.3 milhões de pessoas estavam vivendo com HIV-1 no mundo, das quais 2.6 milhões foram infectadas em 2009, o que representou um total de 7000 novas infecções/ dia neste mesmo ano⁽¹⁾.

O mais preocupante, entretanto, é que 97 % destas novas infecções diárias ocorreram em países cuja população é caracterizada por rendas per capita baixas e médias⁽¹⁾, os quais apresentam recursos limitados tanto no tratamento quanto no monitoramento das infecções por HIV-1.

Sabe-se que a introdução da terapia antirretroviral combinada durante a segunda metade da década de 90, aliada ao uso da carga viral do RNA do HIV-1 e contagem de células T

CD4+ como marcadores de eficácia das drogas e também da progressão da doença trouxe um aumento dramático na expectativa de vida entre os pacientes infectados pelo HIV-1⁽²⁾, o que, porém, não corresponde à realidade atual da maioria dos países com recursos limitados onde o acesso às terapias e ao monitoramento é escasso.

Uma das alternativas que vêm sendo empregadas para diminuir os custos atrelados ao transporte e armazenamento de amostras biológicas para monitoramento da carga viral e também da genotipagem do HIV-1 é o uso de sangue ou plasma em estado seco em metodologias usando o *dried blood spot* (DBS) ou usando o ViveST, os quais não requerem o congelamento das amostras e portanto podem ser transportados pelo correio e armazenados à temperatura ambiente.

AMOSTRAS EM PAPEL FILTRO: HISTÓRICO E UTILIZAÇÃO NO DIAGNÓSTICO DE ANTICORPOS ANTI- HIV-1

A utilização de amostras biológicas em estado seco para a coleta e análises moleculares iniciou-se na década de 60 quando o escocês Dr Robert Guthrie punçou o dedo de neonatos e gotejou o sangue sobre papel filtro para a dosagem da fenilalanina e detecção de finilcetonúria (PKU) ⁽³⁾. Desde então, a triagem neonatal foi implementada globalmente, utilizando-se a técnica de Guthrie.

O papel filtro utilizado com maior frequência para armazenar e transportar amostras biológicas, é o 903 Schleicher & Scheull (S&S 903, Whatman 903 ou 903[®]) manufaturado com 100% de fibras puras de algodão e classificado pelo FDA como um dispositivo médico de classe II. *Dry blood spot* (DBS) é a denominação deste papel filtro quando impregnado com sangue total.

Atualmente, mais de 95% dos recém-nascidos são triados para erros inatos do metabolismo usando DBS nos EUA ^(4, 5) e a aplicação do *dried blood spot* (DBS) tem se estendido para muitas outras áreas, incluindo monitoramento de drogas terapêuticas ⁽⁶⁾, toxicocinética ⁽⁷⁾ e farmacocinética ⁽⁸⁾ onde a utilização de animais de experimentação deve cumprir protocolos éticos de refinamento e redução, os quais também podem ser garantidos pelo uso do DBS.

No Brasil, o Programa Nacional de Triagem Neonatal prevê o assim chamado “teste do pezinho” para todas as crianças nascidas em território brasileiro no diagnóstico de quatro doenças: Hipotireoidismo Congênito, Fenilcetonúria, Hemoglobinopatias e Fibrose Cística a partir da punção do calcanhar do neonato entre 3 e 7 dias do nascimento, com lanceta estéril e gotejamento do sangue do “pezinho” em papel filtro ⁽⁹⁾.

Por oferecer algumas vantagens sobre a coleta de amostras convencionais, tais como ser menos invasivo (punção do dedo com lanceta em vez de cânula venosa convencional) requerendo treinamento mínimo para a coleta; poder ser armazenado e transportado sem necessitar o uso de freezers ou gelo seco através dos correios (evitando custos desnecessários) ^(10, 11) e reduzir o risco de infecções por patógenos infecciosos a níveis mínimos ⁽¹²⁾; o DBS representa um importante aliado no diagnóstico do HIV-1 em locais com recursos limitados (Figuras 1 e 2).

Portanto, o uso de gelo seco desnecessário e a segurança biológica da amostra que quando seca torna-se não-infectante para o HIV-1, implicam em manipulação facilitada, menos burocracia e embalagens menores e mais leves. Dependendo do peso, distância e condições locais do envio, a economia do envio do DBS comparado ao envio de plasma pode ser de € 200 por envio ⁽¹³⁾.

Além do uso de DBS para a carga viral e genotipagem do HIV-1, a detecção de anticorpos anti-HIV-1 ⁽¹⁴⁾ e contagem de CD4+ ⁽¹⁵⁾ também tem sido validados no DBS. Porém, o advento de testes rápidos para detecção de anticorpos e a baixa tecnologia associada à contagem de CD4+ levam a aplicação do DBS nestas análises para segundo plano ⁽¹⁶⁾.



Figura 1 - Testagem de HIV-1 na zona rural da Tanzânia em local com poucos recursos. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* (2009)

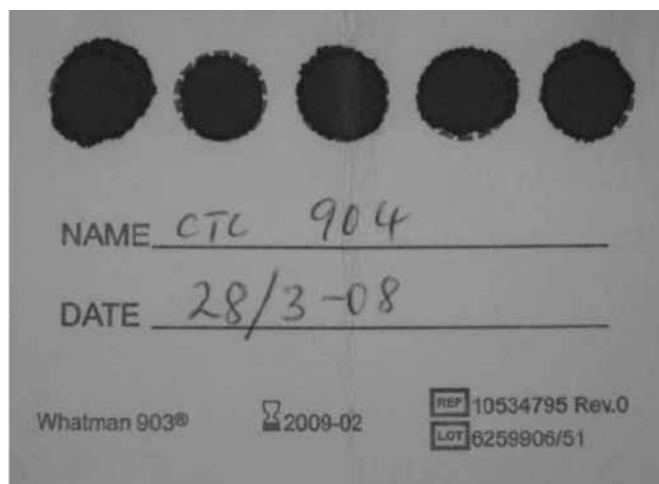


Figura 2 - DBS: cada “spot” é preenchido com 50 μ L de sangue total (papel filtro de papel Whatman 903). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* (2009).

Considerando o teste de anticorpos em amostras secas, num estudo brasileiro de 2008 que utilizou 457 amostras em DBS para a detecção de anticorpos anti-HIV-1 e HIV-2, utilizando o kit Q-Preven HIV 1+2, foi observada uma sensibilidade de 100%, especificidade de 99.6%, valor preditivo positivo de 99.5% e valor preditivo negativo de 100%, quando comparados ao padrão ouro (amostras de soro), o que demonstrou a aplicabilidade do papel filtro na detecção dos anticorpos ⁽¹⁷⁾.

A estabilidade dos anticorpos em DBS é, porém, dependente das condições de armazenamento, demonstrando que por até 6 semanas de armazenamento sob temperaturas tropicais, amostras com altos e baixos títulos de anticorpos permanecem positivas tanto para ELISA quanto para *Western blotting* ⁽¹⁴⁾.

VIVEST: UM NOVO DISPOSITIVO PARA TRANSPORTE E ARMAZENAMENTO DE AMOSTRAS SECAS À TEMPERATURA AMBIENTE

O ViveST (Figura 3), antigo Sample Tanker, desenvolvido por Robert M. Lloyd é uma nova e atraente abordagem para o transporte e armazenamento de sangue ou plasma seco para realização de carga viral e genotipagem do HIV-1 que vem sendo avaliada desde 2004 por alguns pesquisadores internacionais e brasileiros.



Figura 3 - ViveST

Até 1 mL amostra pode ser aplicada à matriz absorvente acoplada à parte interna da tampa do ViveST (Figura 4). A secagem da amostra na matriz pode ser realizada por 12 horas em cabine de fluxo laminar ou equipamento de secagem driDOC. Após completa secagem, a tampa é rosqueada ao tubo do dispositivo, onde acompanha um dessecante que muda sua cor de acordo com umidade presente no interior do tubo. A mudança na coloração funciona como um indicativo de degradação do RNA/DNA. Na bula do kit recomenda-se que o laboratório responsável pela execução da carga viral ou genotipagem do HIV-1 não aceite amostras com colorações do dessecante diferentes do azul. A reidratação das amostras secas é realizada com auxílio de uma seringa onde se pipeta o tampão de eluição (Figura 5). Com a capacidade do ViveST de armazenar até 1 mL de



Figura 4 - Aplicação de até 1 mL de amostra dispositivo.



Figura 5 - reidratação das amostras secas.

amostra, 20 vezes superior ao DBS, aliado a um sistema totalmente vedado à passagem de umidade e acoplado a um dessecante indicativo de umidade que altera sua coloração, este novo dispositivo tem demonstrado uma estabilidade do material genético e sensibilidade aumentada na carga viral do HIV-1 e também na genotipagem.

Assim como o DBS, transportar amostras secas em ViveST não recai sob a regulamentação de produtos perigosos de classe 9 e portanto pode ser transportado pelo correio, diminuindo-se os custos⁽¹⁸⁾.

Diagnóstico do HIV-1 com biologia molecular: RNA e DNA em DBS e ViveST são factíveis?

Muitos estudos têm avaliado o uso de DBS e ViveST para a quantificação do RNA/DNA do HIV-1 comparando-se ao método convencional de plasma congelado.

Numa revisão muito bem elaborada e publicada por Johannessen em 2010 foram levantadas 22 publicações utilizando DBS para carga viral do HIV-1 e 13 que utilizaram DBS para genotipagem do HIV-1⁽¹⁶⁾.

De forma geral, nos trabalhos foram utilizados 50 ou 100 μ L de amostra por *spot* e os DBS foram secos por 30 minutos ou até 24 horas. Todos os estudos utilizaram papel filtro 903 (Whatman, Maidstone, UK; previously Schleicher & Schuell, Keene, NH, USA) e um estudo utilizou o papel filtro Iso Code (Schleicher & Schuell).

Tanto para a carga viral do HIV-1 quanto para a genotipagem, as extrações de RNA mais sensíveis foram aquelas que utilizaram o kit de isolamento NucliSENS® (BioMérieux, Inc., Marcy l'Etoile, France), ou qualquer um dos seus precursores⁽¹⁶⁾, todos baseados no uso de partículas de sílica, como descrito por Boom⁽¹⁹⁾ e colaboradores.

Na maioria dos estudos, DBS apresentou um limite de detecção mínimo de 3 \log_{10} cópias/mL, variando de 2.13⁽²⁰⁾ a 3.72 \log_{10} cópias/mL⁽²¹⁾, o que é determinado pelo pequeno volume de sangue ou plasma acondicionado por *spot*. No que se refere ao método de detecção, para as cargas virais, não foram observadas diferenças conclusivas entre os ensaios comercialmente disponíveis já que não se sabe se tais diferenças poderiam ser atribuídas ao método de extração ou ao método de detecção, ou a ambos⁽¹⁶⁾.

Entretanto para a genotipagem, foi observado que ensaios de RT-nested PCR de desenvolvimento próprio (*in-house*) pareceram mais eficientes do que os kits comerciais quando o DBS era utilizado em vez de plasma⁽¹⁶⁾, onde as taxas de sucesso na amplificação dos ensaios *in-house* variaram de 83–100%, comparado com 38.6–83.3% para ViroSeq HIV-1 (Abbott Molecular, IL, USA) e, 78.8% para o TruGene® HIV-1 (Siemens Healthcare Diagnostics, IL, USA).

Uma particularidade observada em amostras de DBS e intrínseca aos ensaios de carga viral baseados em RT-PCR foi a detecção superestimada da carga viral do HIV-1 em pacientes com baixos níveis de viremia⁽¹⁶⁾, provavelmente devido a contribuição do DNA proviral encontrado nas células mononucleares do sangue periférico (PBMC). Entretanto a presença de DNA do HIV-1 em um paciente não implica em falha do tratamento, e a amplificação conço-

mitante de RNA e DNA poderia levar a sérios problemas na interpretação de um resultado positivo.

Mais uma vez, a utilização do método NucliSENS que utiliza a técnica de (NASBA) pela amplificação isotérmica à 41°C desenhada para amplificar RNA de fita simples pelo uso da RNA polimerase T7 não superestima a carga viral do HIV-1, pois na ausência de denaturação por aquecimento, as duplas fitas de DNA não podem participar do processo de amplificação^(22,23).

Levando-se em conta a genotipagem do HIV-1, embora os estudos tenham mostrado uma elevada concordância entre as sequências derivadas de DBS comparadas ao plasma, a interferência do DNA pode variar de acordo com o status do tratamento e nível da carga viral, o que ainda permanece sob investigação dos pesquisadores.

É muito discutido também que o sucesso na utilização de amostras secas está vinculado às condições de armazenamento, no que se refere à temperatura e umidade do ambiente. Sobre esse aspecto, os estudos indicam que o RNA do HIV-1 no DBS é relativamente estável durante o armazenamento, desde que condições ambientais severas sejam evitadas tais como 37°C e/ou elevada umidade.

Portanto, a Organização Mundial da Saúde recomenda que o armazenamento do DBS à temperatura ambiente seja de no máximo 2 semanas antes do transporte para o laboratório referência. Se o armazenamento por longo prazo é requerido, por exemplo para propósitos de pesquisa, as amostras de DBS devem ser armazenadas à -20°C ou temperaturas menores, nos envelopes *ziplock* fechados contendo dessecante.

Por se tratar de um dispositivo de armazenamento e transporte de amostras secas recentemente desenvolvido, o ViveST ainda não apresenta tantas publicações como o DBS, porém os estudos vêm demonstrando um desempenho promissor na carga viral e na genotipagem do HIV-1. Em recente publicação no *Journal of Clinical Microbiology*, Lloyd e colaboradores apresentaram um estudo que demonstrou que a estabilidade do RNA do HIV-1 de plasma seco em ViveST, para realização da carga viral é de até 8 semanas quando o ViveST é armazenado à temperatura ambiente (23°C) e de 3 semanas e meia quando este dispositivo fica armazenado à 37°C⁽²⁴⁾. Também foi demonstrado, que é possível realizar o ensaio de três diferentes testes moleculares a partir de amostra de plasma seco, proveniente de um único dispositivo ViveST de amostra biológica coinfectada com HIV-1 e hepatite C (HCV). O teste de múltiplos analitos só é factível porque ViveST tem a capacidade de armazenar o volume de 1 mL de material biológico, 20 vezes superior a qualquer meio de transporte de amostra a seco,

como o papel filtro, ou *dry blood spot*⁽²⁴⁾. Neste mesmo trabalho de 2009, a avaliação das sequências genotipadas pela plataforma TruGene® HIV-1 resistance genotyping kit (Siemens, Tarrytown, NY) obteve acurácia média de 99.9% para as mutações associadas à resistência aos antirretrovirais, independentemente do período de armazenamento (1 ou 7 dias), comparando-se o ViveST às amostras pareadas de plasma congeladas.

Em um outro estudo, apresentado na 11th European AIDS Conference em 2007, os pesquisadores avaliaram amostras de plasma seco em ViveST, as quais variavam entre <50 cópias/mL e 750.000 cópias/mL para a determinação de resistência aos antirretrovirais e tropismo viral pelos métodos Phenosense GT™ e Trofile™. Dentre os resultados mais interessantes, o sucesso de amplificação no gene *env* do HIV-1 foi de 87% para as amostras congeladas (*Frozen Plasma*) e 91% para as mesmas amostras em ViveST (*Dried plasma*). Ainda com relação ao gene *env* do HIV-1, a determinação do tropismo viral demonstrou uma concordância de 100% entre as amostras congeladas (*Frozen Plasma*) e as amostras em ViveST (*Dried plasma*)⁽²⁵⁾.

Mais recentemente, numa tentativa de avaliar o desempenho do ViveST utilizando o método de Carga Viral por bDNA (VERSANT® HIV-1 RNA 3.0 Assay, Siemens, Deerfield, IL) que é o método atualmente utilizado no Brasil para o monitoramento de pacientes em tratamento na rede pública, mais de 300 amostras de plasma seco em ViveST foram quantificadas, uma vez que o limite de detecção de 50 cópias/mL deste ensaio requer o volume de 1 mL de plasma, impossibilitando o uso do DBS⁽²⁶⁾. Sendo assim, dentre as 200 amostras de plasma positivas, foi observada uma detecção mínima de 50 cópias/mL no ViveST, comparável à sensibilidade de amostras transportadas do modo convencional, ou seja, congeladas. Além disso, houve uma correlação de 0.97 entre as amostras congeladas e em ViveST o que demonstrou a aplicabilidade deste novo dispositivo para a determinação da carga viral de HIV-1 utilizando o bDNA⁽²⁶⁾. Portanto, podemos inequivocadamente considerar que o armazenamento e transporte de amostras secas tanto em DBS quanto em ViveST à temperatura ambiente é factível em locais com recursos limitados, onde o entrave para o monitoramento e tratamento de pacientes com HIV-1 ainda está atrelado aos altos custos do transporte de amostras. Dessa forma o futuro desse campo de pesquisa tem que ser considerado prioridade, porque visa implementar novas tecnologias que aumentem a acessibilidade aos testes e tratamentos para todos os pacientes, principalmente àqueles 97% infectados diariamente em locais onde há poucos recursos.

REFERÊNCIAS

1. UNAIDS Aids Epidemic Update, 2010. <http://www.unaids.org/en/dataanalysis>
2. Hogg R, Lima V, Sterne JA, Grabar S, Bategay M, Bonarek M, et al. The Antiretroviral-Therapy-Cohort-Collaboration. Life expectancy of individuals on combination antiretroviral therapy in high-income countries: a collaborative analysis of 14 cohort studies. *Lancet* 2008; 372, 293–299.
3. Guthrie R and Suzi A. A Simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants. *Pediatrics* 1963; 32: 338–343.
4. Chace DH, Kalas TA and Naylor EW. The application of tandem mass spectrometry to neonatal screening for inherited disorders of intermediary metabolism. *Annual Review of Genomics and Human Genetics* 2002; 3: 17–45.

5. Wilcken B and Wiley V. Newborn screening. *Pathology*, 2008; 40(2): 104–105.
6. Edelbroek PM, van der Heijden J and Stolk LM. Dried blood spot methods in therapeutic drug monitoring: methods, assays, and pitfalls. *Therapeutic Drug Monitoring* 2009; 31(3): 327–336.
7. Barfi eld M, Spooner N, Lad R, Parry S and Fowles S. Application of dried blood spots combined with HPLC-MS/MS for the quantification of acetaminophen in toxicokinetic studies. *Journal of Chromatography B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 2008; 870(1): 32–37.
8. Spooner N, Lad R and Barfi eld M. Dried blood spots as a sample collection technique for the determination of pharmacokinetics in clinical studies: considerations for the validation of a quantitative bioanalytical method. *Analytical Chemistry* 2009; 81(4): 1557–1563.
9. Moreira M.E.L. "Teste do Pezinho" completa 10 anos no Brasil. *Ciênc. saúde coletiva* 2011; vol.16 supl.1.
10. Garcia Boy R, Henseler J, Mattern R and Skopp G. Determination of morphine and 6 acetylmorphine in blood with use of dried blood spots. *Therapeutic Drug Monitoring* 2008; 30(6): 733–739.
11. la Marca G, Malvagia S, Filippi L, Luceri F, Moneti G and Guerrini R. A new rapid micromethod for the assay of phenobarbital from dried blood spots by LC-tandem mass spectrometry. *Epilepsia* 2009 (on-line).
12. Parker SP and Cubit WD. The use of the dried blood spot samples in epidemiological studies. *Journal of Clinical Pathology* 1999; 52: 633–639.
13. The application of DBS sampling in global clinical trials. *Bioanalysis* 2010; 2(11): 1783–1786.
14. Behets F, Kashamuka M, Pappaioanou M et al. Stability of human immunodeficiency virus type 1 antibodies in whole-blood dried on filter paper and stored under various tropical conditions in Kinshasa, Zaire. *J. Clin. Microbiol.* 1992; 30(5): 1179–1182.
15. Mwaba P, Cassol S, Pilon R et al. Use of dried whole-blood spots to measure CD4+ lymphocyte counts in HIV-1-infected patients. *Lancet* 2003; 362 (9394): 1459–1460.
16. Johannessen A. Dried blood spots in HIV monitoring: applications in resource-limited settings. *Bioanalysis* 2010; 2 (11):1893-1908.
17. Castro A.C. et al. Evaluation of the human immunodeficiency virus type 1 and 2 antibodies detection in dried whole blood spots (DBS) samples. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo* 2008; 50(3):151-156.
18. IATA. (Dangerous goods regulations. www.iata.org/ps/publications/dgr/Pages/index.aspx).
19. Boom R, Sol CJ, Salimans MM, Jansen CL, Wertheim-van Dillen PM, van der Noordaa J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J. Clin. Microbiol.* 1990; 28(3): 495–503.
20. Mehta N, Trzmielina S, Nonyane BA et al. Low-cost HIV-1 diagnosis and quantification in dried-blood spots by real time PCR. *PLoS One* 2009; 4(6):5819.
21. Garrido C, Zahoner N, Corral A, Arredondo M, Soriano V, de Mendoza C. Correlation between human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) RNA measurements obtained with dried-blood spots and those obtained with plasma by use of Nuclisens® EasyQ HIV-1 and Abbott RealTime HIV load tests. *J. Clin. Microbiol.* 2009; 47(4): 1031–1036.
22. Bruisten S, van Gemen B, Koppelman M et al. Detection of HIV-1 distribution in different blood fractions by two nucleic acid amplification assays. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 1993; 9(3): 259–265.
23. Van Gemen B, Wiel P, van Beuningen R et al. The one-tube quantitative HIV-1 RNA NASBA: precision, accuracy and application. *PCR Methods Appl.* 1995; 4(4): S177–S184.
24. Lloyd RD, Burns A, Huong JT, Mathis RL, Winters MA, Tanner M, et al. Dried-Plasma Transport Using a Novel Matrix and Collection System for Human Immunodeficiency Virus and Hepatitis C Virus Virologic Testing. *J. Clin. Microbiol.* 2009; 47 (5): 1491-1496.
25. Schweighardt B, Maroldo M, Parkin N, Petropoulos CJ, Wrin T. Phenotypic and Genotypic HIV-1 Drug Resistance and Tropism Testing Performed on Plasma Samples Stored in a Dried State. 11th European AIDS Conference; 2007 Oct 24-27; Madrid, Spain.
26. Zanon M, Cortes R, Diaz RS, Sucupira MC, Ferreira D, Inocencio LA, Vilhena C, Loveday C, Lloyd RMJ, Holodniy M. Comparative effectiveness of dried plasma HIV-1 viral load testing in Brazil using ViveST for sample collection. *Journal of Clinical Virology* 2010; 49: 245–248.

SEPSE NO PACIENTE HIV UM RELATO DE CASO

SEPSIS IN A HIV PATIENT – A CASE STUDY

Tatiana Mohovic^{1,2}, Eliana Nogueira³

1 - Hospital Israelita Albert Einstein

2 - Hospital São Luiz

3 - Universidade Federal de São Paulo

Endereço para correspondência: Tatiana Mohovic, Rua Luz, 340, Parque Ideal, Carapicuíba, São Paulo, SP. Brasil.

e-mail: tatimohovic@hotmail.com

RESUMO

A sepse é uma das principais causas de admissões em UTI de pacientes com HIV e é um dos principais fatores de risco para a mortalidade hospitalar em pacientes críticos HIV/AIDS. Os antirretrovirais proporcionaram um aumento da expectativa de vida de pacientes infectados com o vírus e reduziram a incidência de complicações da AIDS, porém seu uso na UTI é controverso. Apesar de mais eficientes, as novas medicações ainda apresentam efeitos colaterais consideráveis, pois podem resultar em efeitos tóxicos do tratamento como reações de hipersensibilidade, síndrome de Stevens-Johnson, necrose hepática, pancreatite, acidose láctica ou a síndrome da reconstituição imune que se manifesta com uma piora paradoxal na doença pulmonar de base. Neste artigo relatamos o caso de um paciente com diagnóstico recente de HIV/AIDS que foi internado na UTI com Sepse de foco pulmonar e colocamos em discussão o uso ou não de antirretrovirais na UTI.

Descritores: HIV, AIDS, Sepse, antirretrovirais.

ABSTRACT

Sepsis is one of the major causes of HIV patient's admissions in ICU and is one of the major risk factors of mortality in critical HIV/AIDS patients. The life expectancy of HIV infected patients has been improved by antiretroviral drugs and the incidence of AIDS complications has been reduced, however, its use is controversial in ICU. The new drugs are better, but the collateral effects are still important because can result in toxic effects like hypersensitivity reactions, Stevens-Johnson syndrome, hepatic necrosis, pancreatitis, lactic acidosis or the immune reconstitution syndrome. In this article we related the case of a patient with the recent diagnosis of HIV/AIDS that was interned in ICU with sepsis of pulmonary focus and we argue the use or not of antiretroviral in ICU.

Keywords: HIV, AIDS, Sepsis, antiretroviral drugs.

INTRODUÇÃO

Atualmente milhões de pessoas vivem com o HIV. Em Dezembro de 2008 estimava-se que 33,4 milhões de pessoas viviam com o vírus (UNAIDS/WHO)¹. Várias infecções tratáveis e complicações tóxicas nestes pacientes ainda são freqüentes, porém a prevalência de infecções oportunistas e as taxas de mortalidade têm caído desde o início da epidemia do HIV². A melhora no manejo da AIDS/HIV tem levado a mudanças nas manifestações clínicas observadas e no desfecho de pacientes em unidades de terapia intensiva com uma diminuição nas admissões por infecções oportunistas e uma tendência de aumento por outras infecções e doenças metabólicas¹. O número de pacientes infectados pelo HIV admitidos em UTI cresceu e as taxas de sobrevivência também desde a década de 80². Os antirretrovirais têm proporcionado um aumento da

expectativa de vida de pacientes infectados com o vírus e tem reduzido a incidência de complicações da AIDS.

A sepse é uma das principais causas de admissões em UTI de pacientes com HIV graves e sua incidência vem aumentando, sendo que uma fração de 1 a 10 % dos pacientes sépticos são compostos por indivíduos com HIV/AIDS. Pacientes sépticos com HIV tem menores taxas de admissão em UTI comparados com pacientes não HIV.

A sepse grave é um dos principais fatores de risco para a mortalidade hospitalar em pacientes críticos HIV/AIDS¹.

As infecções nosocomiais parecem ser mais comuns em pacientes com AIDS comparados com aqueles não infectados pelo HIV e tem sido associadas com o grau de imunossupressão, uso prévio de antibióticos e exposição a mecanismos invasivos, como cateteres intravenosos. Recentemente foi demonstrado que a sepse é o principal fator de risco para a

mortalidade em pacientes HIV/AIDS admitidos em UTI e que a sepse grave é o principal fator de risco para a mortalidade hospitalar em um estudo de coorte¹.

RELATO DE CASO

Paciente de 37 anos, oriental, masculino, com antecedente patológico de Doença de *Chron*, Hipertensão arterial sistêmica, alergia a iodo, e diagnóstico recente de Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA - AIDS), em uso de antirretrovirais (ART) há 10 dias, HAART (AZT/3TC/EFZ), e tuberculose pleural em uso de Esquema tríplice há 20 dias; admitido no Pronto Socorro no dia 14/08/2008 com quadro de febre, adinamia, calafrios, e náuseas há uma semana com piora no dia do atendimento.

O exame físico inicial demonstrou Pressão Arterial (PA): 130x90 mmHg, Frequência cardíaca (FC): 140 batimentos por minuto (bpm), temperatura de 38 graus *Celsius*, Frequência respiratória (FR): 28 incursões por minuto (ipm), Saturação de 95%, toxemiado, desidratado, febril, com *rash* máculo papular em tronco, adenomegalias cervicais, monilíase oral, hepatoesplenomegalia, dispnéico, murmúrios vesiculares (MV) abolidos em hemitórax direito.

Os exames colhidos demonstravam leucograma com 29000 leucócitos, 15% de bastões, hemoglobina: 12, plaquetas: 283000, PCR: 24,98, pH 7,39, bicarbonato: 19, lactato: 30, creatinina : 1,4, Uréia: 57.

A radiografia de tórax demonstrava derrame pleural à direita. O diagnóstico feito foi de Sepse grave de foco pulmonar e foi iniciada hidratação, antibioticoterapia, e realizada a passagem de um cateter venoso central.

O paciente foi encaminhado a UTI para acompanhamento. No primeiro dia de UTI foi optado por ampliar o esquema de antibióticos, e foram suspensos o esquema tríplice e os antirretrovirais. Uma drenagem pleural do tórax direito foi realizada tendo sido retirado um total de 1850 mL de líquido seroso.

Dia 16/12/2008 o paciente apresentou distensão abdominal e diarreia, e foi realizada uma tomografia de abdômen sem sinais de abscesso ou perfuração. Ainda no mesmo dia foi colhida pesquisa para toxina de *Clostridium difficile* e iniciado metronidazol empiricamente.

No dia 18/12/2008 o paciente ainda apresentava febre e diarreia, passando a apresentar no dia seguinte enterorragia e hematocúria.

A pesquisa para toxina de *Clostridium difficile* foi negativa. O paciente foi submetido a uma Endoscopia digestiva alta que demonstrou uma gastrite leve de antro, e uma colonoscopia que apresentava mucosa de todo o segmento do cólon e reto com erosões com fibrina e halo de hiperemia, com áreas focais de mucosa petequial.

O anátomo patológico demonstrou colite erosiva, erosões recentes com padrão isquêmico e endotelialites com microtrombos de fibrina em capilares de lâmina própria, infiltrado inflamatório com linfócitos, histiócitos e polimorfonucleares. Alterações citopáticas em células endoteliais sugestivas de etiologia viral de padrão citomegálico (CMV). Cólon esquerdo – colite erosiva, infiltrado inflamatório e endotelialites. Reto: Edema e congestão vascular em lâmina própria Micro trombos de fibrina em capilares com alterações citopáticas sugestivas de etiologia viral – CMV

Imunohistoquímica: Cólon D- CMV positivo nas células de interesse, herpes vírus negativo. Após a notificação deste resultado iniciou-se tratamento para o Citomegalovírus com ganciclovir.

No dia 20/12 o paciente recebeu alta da UTI para uma unidade semi-intensiva.

Foram realizadas as dosagens de CD4 de 68, CD8 de 181, e carga viral de 3086

Em 25/12/2008, cinco dias após a alta da UTI, o paciente voltou a apresentar dispnéia, febre e astenia. No dia 26/12 foi realizada nova drenagem de tórax com saída de 1300mL de líquido pleural seroso e associado levofloxacino ao esquema antibiótico

No dia 28/12 como o paciente mantivesse febre foi retirado o cateter venoso central, enviado a ponta para cultura e puncionado um novo cateter

No dia 30/12/2008 o paciente começou a apresentar movimentos involuntários de pequena e média amplitude que se intensificavam com a movimentação sem espasticidade, sem perda de força ou sensibilidade. Foi feita a hipótese diagnóstica de toxicidade a drogas.

No dia 06/01 foi colhida uma hemocultura do cateter venoso central com crescimento de *cândida albicans* e foi iniciado anfotericina B.

Em 10/01 a dosagem de CD4 foi de 135.

No dia 20/01 o paciente voltou a apresentar insuficiência respiratória, hipotensão, taquicardia e febre com diagnóstico de novo choque séptico de foco pulmonar tendo sido novamente internado na UTI.

Devido a insuficiência respiratória o paciente foi submetido à intubação orotraqueal e iniciado o uso de noradrenalina para o controle da PA adequado. O diagnóstico caracterizado foi de empiema pleural com derrame loculado.

O paciente foi submetido à decorticação pulmonar, pleurectomia, toracoscopia, e toracotomia com drenagem pleural fechada. A videotoracoscopia caracterizou coleções pleurais, espessamento pleural parietal e visceral e encarceramento do lobo pulmonar inferior direito e médio. No dia 23/01 pela piora hemodinâmica foi necessário associar vasopressina e novamente ampliar o espectro antibiótico.

No dia 25/01 houve redução dos picos febris, diminuição das drogas vasoativas.

Porém evolução para insuficiência renal aguda sendo necessária hemodiálise

Alguns dias depois houve melhora do quadro séptico, suspensão das drogas vasoativas e o paciente foi desentubado.

Após ser desentubado o paciente apresentava sintoma de disartria e foi submetido a uma ressonância magnética de crânio que demonstrou lesões nodulares características de neuro-toxoplasmose tendo sido iniciado então tratamento para tal.

Após melhora significativa do quadro paciente recebeu alta para a semi-intensiva e posteriormente para o quarto, e em 05/02/2009 foram iniciados os antirretrovirais efavirenz e biovir quando o quadro clínico do paciente estava mais estável.

Em 27/02/2009 o paciente recebeu alta para o domicílio com *home care* em uso de sulfadiazina, fluconazol, biovir, efavirenz, rifampicina, isoniazida, pirimetamina.

DISCUSSÃO

A insuficiência respiratória é a causa mais comum de admissão na UTI entre pacientes com HIV. Dentre as causas de insuficiência respiratória neste grupo estão pneumonia por pneumocystis, pneumonia bacteriana e tuberculose³. A pneumonia bacteriana é a principal causa, seguida pela pneumonia por pneumocystis⁴. A insuficiência respiratória também pode ter como causa a síndrome da reconstituição imune após a introdução da terapia antirretroviral e se manifesta com uma piora paradoxal na doença pulmonar de base. A síndrome pode ocorrer dias ou semanas após o início da terapia antirretroviral e é causada por uma exuberante resposta inflamatória a antígenos das micobactérias e dos pneumocystis³.

O uso de antirretrovirais na UTI é controverso. Apesar das novas medicações serem melhores do que as mais antigas, os efeitos colaterais ainda são consideráveis. Os antirretrovirais diminuem a incidência de doenças relacionadas à AIDS, porém podem também resultar em efeitos tóxicos do tratamento como reações de hipersensibilidade, síndrome de Stevens-Johnson, necrose hepática, pancreatite e acidose láctica³.

Muitos estudos recentes não encontraram melhora na sobrevida hospitalar e de curto prazo para pacientes que recebem ou não antirretrovirais no momento de admissão na UTI⁴.

Apesar de não haver diferença na sobrevida para pacientes usando ou não antirretrovirais na UTI a sobrevida de forma geral desses pacientes tem aumentado. Uma explicação possível para esse aumento é o uso de antirretrovirais previamente a admissão na UTI, e também a diminuição de pacientes com pneumonia por *pneumocystis* admitidos na UTI⁴. Isso ocorre provavelmente porque os pacientes estão apresentando menor incidência desse tipo de pneumonia também pelo uso dos antirretrovirais.

A terapia com antirretrovirais melhora a função imune, porém o efeito a curto prazo da contagem de células CD4 e carga viral não é clara.

Por outro lado para pacientes que já estão em uso dos antirretrovirais há mais tempo, a descontinuação pode resultar em seleção de vírus resistentes a droga.

Na UTI a introdução dos antirretrovirais pode levar a síndrome de reconstituição imune e conseqüentemente piorar o estado clínico do paciente.

Nosso relato de caso exemplifica o que discutimos até agora. É um caso de um paciente com diagnóstico recente de HIV/

AIDS que chega ao hospital com quadro de Sepsis grave de foco pulmonar em uso muito recente dos antirretrovirais e estes são suspensos no momento da admissão. O quadro clínico pode estar exacerbado pela síndrome de reconstituição imune. As infecções pulmonares são as principais causas de admissão na UTI e neste caso a infecção pulmonar é provavelmente bacteriana.

Notamos também que o paciente apresenta uma segunda vez durante a sua internação no hospital um novo quadro de sepsis, sendo novamente tratado baseado nas diretrizes da *Surviving Sepsis Campaign* e apresentando um desfecho favorável. Ainda notamos que associado a este quadro o paciente apresentou doenças oportunistas que contribuíram para o longo tempo de permanência do paciente no hospital. Porém, apesar de todas as doenças associadas deste caso o desfecho deste paciente foi favorável o que mostra que os cuidados intensivos, o diagnóstico correto das patologias e a introdução do tratamento adequado foi fundamental para a melhora do paciente.

Os avanços nestes últimos anos dos cuidados em UTI (tecnológicos e de medicina baseada em evidências como o uso de ventilação com volume corrente baixo, insulino terapia, *early goal therapy* e *surviving sepsis campaign*) têm contribuído para o aumento da sobrevida dos pacientes em geral e conseqüentemente os pacientes com HIV também estão sendo beneficiados.

Outro exemplo de avanço na terapia intensiva é o uso da ventilação não invasiva na UTI que ajudou a diminuir a necessidade de intubação orotraqueal e ventilação mecânica em pacientes HIV com insuficiência respiratória internados em UTI⁴. Ainda, a Ventilação não invasiva atua como um adjuvante na reabilitação respiratória do paciente após a sua desentubação.

A introdução de antirretrovirais na UTI ainda é controversa, porém acredito que deva ser considerada quando o paciente já faz uso prolongado da medicação. No entanto, quando o paciente teve seu tratamento iniciado recentemente ou não faz tratamento a introdução de antirretrovirais pode ser deletéria, pois, pode piorar o quadro inflamatório, por exemplo, se o paciente desenvolver síndrome da reconstituição imune ou pode apresentar efeitos tóxicos contribuindo para uma piora do paciente.

A medicina intensiva tem avançado muito nos últimos anos, conseqüentemente a sobrevida dos pacientes graves tem aumentado e entre eles os pacientes com HIV/AIDS.

REFERÊNCIAS

1. Japiassu AM, Amancio RT, Mesquita EC, Medeiros DM, Bernal HB, Nunes EP, et al. Sepsis is a major determinant of outcome in critically ill HIV/AIDS patients. *Crit Care*. 2010;14(4):R152.
2. Coquet I, Pavie J, Palmer P, Barbier F, Legriel S, Mayaux J, et al. Survival trends in critically ill HIV-infected patients in the highly active antiretroviral therapy era. *Crit Care*. 2010;14(3):R107.
3. Huang L, Quartin A, Jones D, Havlir DV. Intensive care of patients with HIV infection. *N Engl J Med*. 2006 Jul 13;355(2):173-81.
4. Powell K, Huang L. The ART of caring for patients with HIV infection in the ICU. *Intensive Care Med*. 2009 Oct;35(10):1659-61.

INFLUÊNCIA DOS POLIMORFISMOS DE NUCLEOTÍDEO ÚNICO (SNPS) DA APOBEC3G NA DINÂMICA POPULACIONAL DA INFECÇÃO PELO HIV-1

Aluno (a): Maria Clara Bizinito

Orietador (a): Luis Mário Ramos Janini

Instituição: Universidade Federal de São Paulo

A APOBEC3G (A3G) tem sido descrita como um fator celular que inibe a replicação do HIV-1. Durante a transcrição reversa, a A3G promove a desaminação de citidinas para uracilas nas fitas negativas de DNA viral, induzindo hipermutação de guaninas para adeninas nas fitas positivas. O HIV-1 contra-ataca esse efeito pela atividade da proteína viral Vif, que neutraliza complexos A3G através de um mecanismo de degradação proteossômica. Apesar de alguns polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) terem sido descritos ocorrendo ao longo do gene A3G, seus efeitos sobre a progressão da infecção pelo HIV-1 não são claros. Este estudo tentou estabelecer, na população brasileira, a frequência de 7 SNPs descritos anteriormente e seu impacto na carga viral e contagem de células T CD4+, em associação com a presença de hipermutação no gene da integrase. Além disso, foi analisada a diversidade genética do gene *vif* a fim de estabelecer sua associação com o estado clínico e os polimorfismos da A3G. Foram analisadas 400 amostras provenientes de indivíduos infectados pelo HIV-1 que não foram submetidos a tratamento antiretroviral. Os SNPs na A3G foram detectados por resequenciamento. Com o auxílio de ferramentas de bioinformática, foram utilizados modelos baseados em códons para estudar o processo evolutivo do gene *vif*, a partir de 156 sequências

do subtipo B do HIV-1. A hipermutação foi investigada utilizando o corante bisbenzamida-PEG durante a eletroforese em gel de agarose. Os géis foram analisados utilizando o *software Image J* e de acordo com a posição das bandas, quando comparados aos controles, as amostras foram categorizadas. Foi verificado que brasileiros e europeus têm frequências genotípicas similares no gene A3G. A análise também revelou que os polimorfismos na maioria dos loci da A3G não tiveram qualquer influência na carga viral e contagem de células T CD4+. A análise das amostras em gel de agarose com *HA-Yellow* encontrou 36% de hipermutação. Notavelmente, códons sob o efeito de epistasia no gene *vif* foram associados com os níveis de células T CD4+. As análises baseadas em filogenia revelaram que os polimorfismos na A3G e a hipermutação tiveram um impacto insignificante na taxa de mutação neutra no gene *vif*. No entanto, códons sob seleção positiva foram detectados no gene *vif* entre as regiões MKSLVK e YRHHY, e nas regiões de interação com a BC-Box e Cullin5-Box. Estas regiões são envolvidas na degradação de Vif induzida por complexos A3G. Em conclusão, foi observado que a evolução do *vif* é parcialmente explicada pela resposta adaptativa otimizada para neutralizar a atividade da A3G, o que demonstra a plasticidade evolutiva do HIV-1 para se adaptar aos genes com função antiviral do hospedeiro.

Apoio: Jovem Pesquisador FAPESP

2007/50650-0 e bolsa CNPQ 134571/2008-8.

DESTAQUES DA “6TH IAS CONFERENCE ON HIV PATHOGENESIS, TREATMENT NA PREVENTION” ROMA DE 17 A 20 DE JULHO DE 2011

Ricardo Sobhie Diaz

LERSIVIRINA VS EFAVIRENZ EM PACIENTES VIRGENS DE TRATAMENTO

Um estudo clínico avaliou um novo inibidor da transcriptase reversa não análogo aos nucleosídeos denominado lersivirina [Vernazza P, et al. IAS 2011. Abstract TUAB0101] Este estudo recrutou pacientes virgens de tratamento e randomizou estes pacientes para receberem tratamento com lersivirina ou efavirenz apresentando a análise de 48 semanas de um estudo programado para durar 96 semanas. Os pacientes recrutados deveriam apresentar carga viral superior a 1000 cópias/mL, CD4 superior a 200 células e não apresentarem mutações de resistência transmitida na transcriptase reversa. Foram instituídos 3 braços na randomização 1:1:1 onde em um braço os pacientes receberiam dose única de 500 mg de lersivirina, em outro 750 mg e no terceiro efavirenz, todos com tenofovir/FTC. Ao final de 48 semanas 79% dos pacientes apresentaram carga viral indetectável em ambos os braços da lersivirina comparado a 86% no braço do efavirenz, não havendo diferença significativa entre os dois medicamentos com relação a carga viral superior ou inferior a 100000 cópias/mL. A diferença mais significativa ocorreu com relação aos efeitos adversos onde eventos de grau 3 e 5 ocorreram mais frequentemente no braço do efavirenz. De forma diferencial, foi detectada mais náusea e cefaleia nos braços da lersivirina e mais neutotoxicidade no braço do efavirenz. Talvez a maior vocação da lersivirina não tenha sido a explorada neste estudo, que é o resgate de tratamentos contendo ITRNN. Lersivirina proporciona queda de carga viral em monoterapia que varia entre 1,6 a 1,8 log₁₀ após 7 dias entre pacientes virgens.¹ Estudos *in vitro* demonstram ser uma boa opção para resistência a ITRNN de primeira geração, sendo ativa em 11 de 19 cepas virais e

mesmo atividade em cepas com resistência a etravirina, sendo também ativa em 5 de 10 cepas. Este medicamento mantém atividade inclusive contra variantes albergando a mutação Y181C.

ELVITEGRAVIR VS RALTEGRAVIR EM PACIENTES EXPERIENTES

Um estudo envolvendo 702 pacientes em falha virológica e com resistência ou exposição a duas ou mais classes de medicamentos foi randomizada para resgate com esquema contendo IP-r e pelo menos mais um terceiro antirretroviral ativo usando elvitegravir 150 mg 1 vez ao dia versus raltegravir 400 mg duas vezes ao dia, ambos os braços controlados com placebo (Molina JM, et al. IAS 2011. Abstract WELBB05). Após 48 semanas, o desempenho foi considerado igual entre os dois braços de estudo na análise por intenção de tratamento, com carga viral inferior a 50 cópias/mL em 59% e 58% dos pacientes nos braços do elvitegravir e raltegravir respectivamente (75% e 73% na análise dos dados observados). A falha virológica ocorreu em 11% e 16% dos pacientes usando elvitegravir e raltegravir respectivamente. Não houve diferença na incidência de resistência a ITRN, IP ou integrase entre os braços. No braço do elvitegravir, 27% dos pacientes com falha virológica desenvolveram resistência a este medicamento comparado a 27% no braço do raltegravir. Houve mais diarreia no braço do elvitegravir e mais anormalidade nas enzimas hepáticas no braço do raltegravir.

DOLUTEGRAVIR VS EFAVIRENZ ENTRE PACIENTES VIRGENS DE TRATAMENTO

O dolutegravir é um inibidor de integrase de 2^a geração com potencial de resgate em pacientes resistentes aos inibidores de integrase de primeira geração. Entretanto, este foi um estudo de fase IIb em pacientes virgens de tratamento avalian-

do aproximadamente 200 pacientes em 4 braços: dolutegravir 10, 25 ou 50 mg e efavirenz, todos uma vez ao dia (Van Lunzen J, et al. IAS 2011. Abstract TUAB0102). Todos os braços receberam 2 ITRN administrados uma vez ao dia. O tempo para a indetecção da carga viral foi significativamente inferior nos braços do dolutegravir e a porcentagem de carga viral inferior a 50 cópias na semana 48 foi de 82% no braço do efavirenz e entre 88 e 91% nos braços do dolutegravir. Não foi detectada resistência na integrase no braço do dolutegravir por ocasião da falha virológica. A maior incidência de efeitos adversos ocorreu no braço do efavirenz, porém houve maior incidência no incremento da creatinina nos braços do dolutegravir, sendo estes incrementos em baixos níveis e à custa de inibição do transporte da creatinina e não de nefrotoxicidade.

RILPIVIRINA VERSUS EFAVIRENZ ENTRE PACIENTES VIRGENS DE TRATAMENTO

A rilpivirina é um novo ITRNN que tem sido basicamente explorado como opção para o tratamento inicial em competição com outros ITRNN de primeira geração. Este medicamento, apesar de não inferior ao efavirenz, demonstrou pior desempenho quando a carga viral era superior a 100000 cópias/mL e maior incidência de resistência, com a vantagem de menor incidência de efeitos adversos em estudo de 48 semanas.² A mutação de resistência mais típica foi a E138K e 90% dos pacientes com desenvolvimento de resistência a rilpivirina apresentaram resistência cruzada a etravirina, enquanto que na falha ao efavirenz emergiu a mu-

tação K103N com manutenção da sensibilidade a etravirina. Na complementação deste estudo até a semana 96, 77,6% dos pacientes apresentaram carga viral inferior a 50 cópias/mL na análise por intenção de tratamento (Cohen C, et al. IAS 2011. Abstract TULBPE032). Houve aqui mais falha virológica no braço da rilpivirina (14% VS 7,6%), sendo que a descontinuação por reações adversas foi superior no braço do efavirenz (8,5% VS 4,1%).

MARAVIROQUE VERSUS TENOFOVIR/FTC, AMBOS COM ATAZANAVIR-R ENTRE PACIENTES VIRGENS DE TRATAMENTO

A peculiaridade deste estudo foi o uso de maraviroque uma vez ao dia (Portsmouth S, et al. IAS 2011. Abstract TUAB0103), enquanto a posologia habitual preconiza tratamento duas vezes ao dia. Talvez o desenho do estudo usando maraviroque uma vez ao dia esteja embasado nos resultados apresentados neste mesmo congresso demonstrando que no estudo MOTIVATE, a eficácia do uso de maraviroque uma ou duas vezes ao dia foi semelhante quanto IP-r fora utilizado no esquema de resgate (Taylor S, et al. IAS 2011. Abstract TUAB0106). Em tempo, MOTIVATE é o estudo de registro do maraviroque. No estudo comparando maraviroque e tenofovir/FTC revelou 74,6% versus 83,6% de cargas virais inferiores a 50 cópias/mL nos braços do maraviroque e TDF/3TC respectivamente e 86,9% vs 89,8% quando o corte de carga viral foi de 400 cópias/mL. A incidência de efeitos adversos foi similar nos dois braços e não houve detecção de resistência na viremia em ambos os braços.

1. Mori J, Westby M, Tawadrous M, van der Ryst E, Charles C. Efavirenz: a new NNRTI active across HIV-1 subtypes with a unique resistance profile. *10th International Congress on Drug Therapy in HIV Infection*. Glasgow 2010.
2. Cohen C, Molina JM, Cahn P, Clotet B, Fourie J, Grinsztejn

- B, et al. Pooled Week 48 efficacy and safety results from ECHO and THRIVE, two double-blind, randomised, Phase III trials comparing TMC278 versus efavirenz in treatment-naïve, HIV-1-infected patients *18th International AIDS Conference*. Vienna, Austria 2010.

TENDÊNCIAS EM HIV/AIDS

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

A revista Tendências em HIV/AIDS é uma publicação trimestral da Disciplina de Infectologia da Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP. O intuito dessa publicação é apresentar artigos de revisão preparados por especialistas da área que expressem o conhecimento e a experiência desses pesquisadores. Os artigos são todos escritos por líderes de opinião nesse campo do conhecimento com o intuito de conhecer como caminha a ciência na área, principalmente no que possa refletir a prática do dia-a-dia do clínico. Muitas das estratégias e opiniões aqui apresentadas são inovadoras e modernas. Portanto, os conceitos apresentados podem estar à frente de consensos e da prática corriqueira atual. Dessa forma, pretende-se manter a missão deste periódico, que é a de disseminar a informação de alta qualidade e com potencial inovador. O seletivo corpo editorial da revista é também responsável pela escolha dos temas de interesse e pela indicação de especialistas que se dedicam ao desenvolvimento desses temas. A aprovação dos artigos está sujeita à avaliação por uma comissão de revisores que recebem o texto de forma anônima e decidem por sua publicação, sugerem modificações, requisitam esclarecimentos aos autores e efetuam recomendações ao Editor Chefe que por fim as encaminha aos autores.

Categories:

O próprio autor deve indicar se o seu texto pertence à categoria:

- artigo de revisão
- artigo de atualização
- relato de caso

A Tendências em HIV/AIDS também publica resumos de teses sobre HIV/AIDS defendidas no trimestre anterior. Os resumos devem ser enviados para o mesmo endereço eletrônico e estão sujeitos à avaliação pelo Corpo Editorial. Os resumos podem ser submetidos no formato em que foram publicados na referida Dissertação ou Tese. Em uma seção denominada “Destaques”, a Tendências em HIV/AIDS, por meio de especialistas convidados, apresenta os temas de maior relevância abordados em congressos da área ou mesmo temas escolhidos pelo Corpo Editorial da Revista. Dessa forma, artigos que não pertençam às categorias a, b e c, acima citadas, não devem ser encaminhados à Tendências em HIV/AIDS sem que tenham sido solicitados formalmente pelo Corpo Editorial, por meio de convite oficial enviado via e-mail

Artigos de revisão e atualização:

Devem ser apresentados de forma didática e conter: resumo, palavras chave, abstract, Keywords, texto e referências bibliográficas. Tabelas e figuras também podem ser apresentadas, se necessário. Caso as figuras não sejam originais, o autor deverá providenciar a permissão para reprodução. Figuras não originais desacompanhadas de permissão de reprodução serão automaticamente excluídas do artigo, sem consulta prévia ao autor. O mesmo critério de originalidade se aplica às tabelas e quadros.

Relatos de Caso:

Deverão conter: resumo, palavras-chave, abstract, Keywords, introdução, descrição do caso, discussão.

Destaques: Nessa seção são aceitos apenas os trabalhos escritos por autores convidados pelo Corpo Editorial da Tendências em HIV/AIDS.

Normas para preparação dos artigos

Os artigos devem ser redigidos em língua portuguesa. É obrigatória a apresentação de um resumo em português e um em inglês. Os artigos devem ser digitados no MS Word, formato txt e encaminhados por e-mail, no endereço eletrônico: giovana.lotici@unifesp.br

Em caso de aceite, o autor será comunicado e o artigo será publicado mediante apresentação de carta de autorização de publicação assinada pelos autores. Os autores devem certificar-se de que o manuscrito está de acordo com as “instruções aos autores”.

O protocolo estabelece que:

- Os conceitos emitidos nos artigos são de total responsabilidade dos autores;
- Os artigos devem ser inéditos, ou seja, não devem ter sido publicados anteriormente, nem devem ter sido disponibilizados na Internet, com exceção das teses, dissertações e dos trabalhos apresentados em congressos;
- Caso sugestões ou mudanças sejam sugeridas aos autores como condição para publicação na Tendências em HIV/AIDS, os autores devem responder se aceitam ou não essas sugestões dentro de um prazo de 48 horas. Os casos omissos serão resolvidos pela Diretoria da *Tendências em HIV/AIDS*. Os artigos enviados passarão a ser propriedade da *Tendências em HIV/AIDS*.
- Uma vez aceito para publicação, o artigo torna-se propriedade Tendências em HIV/AIDS e somente a revista poderá autorizar a reprodução dos artigos nela contidos.
- A publicação do artigo, quando aceita, obedecerá à programação editorial.

Página de rosto

A página de rosto deve conter:

- o título do artigo, na língua portuguesa e em inglês;
- Categoria a que pertence o trabalho;
- nome completo dos autores e afiliação institucional;
- nome endereço, telefone e e-mail do autor responsável para correspondência.

Segunda página

- Resumo, sem exceder 200 palavras;
- Abstract: versão fidedigna do resumo;
- 3 a 6 palavras-chave extraídas do vocabulário DeCS - Descritores de Ciências da Saúde (<http://decs.bvs.br/>);
- 3 a 6 keywords, baseadas no MeSH - Medical Subject Headings sss(http://www.nlm.nih.gov/cgi/mesh/2006/MB_cgi). Caso não sejam encontrados descritores apropriados para cobrirem o assunto do trabalho, poderão ser indicados termos ou expressões de uso conhecido.

Referências Bibliográficas

As referências devem ser numeradas de forma consecutiva, de acordo com a ordem em que forem mencionadas pela primeira vez no texto, utilizando-se numerais arábicos sobrescritos e sem parênteses ou colchetes. As referências devem seguir o estilo Vancouver, como exemplificado:

Revistas Científicas

Linnen J, Wages J, Jr., Zhang-Keck ZY, Fry KE, Krawczynski KZ, Alter H, et al. Molecular cloning and disease association of hepatitis G virus: a transfusion-transmissible agent. *Science* 1996;271(5248):505-8.

Livros

Ringsven MK, Bond D. *Gerontology and leadership skills*. 2nd ed. Albany(NY): Delmar Publisher; 1996.

Capítulos de Livro

Phillips SJ, Whisnant JP. Hypertension and stroke. In: Laragh JH, Brenner BM, editors. *Hypertension: pathophysiology, diagnosis and management*. 2nd ed. New York: Raven Press; 1995. P. 465-78.

Anais de Congressos

Kimura J, Shibusaki H. Recent advances in clinical neurophysiology. *Proceedings of the 10th International Congress of EMG and Clinical Neurophysiology*; 1995 Oct 15-19; Kyoto, Japan. Amsterdam: Elsevier; 1996.

Dissertações e Teses

Kaplan SJ. *Post-hospital home health care: the elderly's access and utilization [dissertation]*. St. Louis(MO): Washington Univ.; 1995.

Tabelas e Ilustrações

- todas as partes do artigo devem ser incluídas em um único arquivo, sendo que as tabelas e as ilustrações devem ser apresentadas ao final do corpo do texto, após as referências bibliográficas;
- as tabelas deverão ser numeradas seqüencialmente através de algarismos arábicos e identificadas na parte superior pelo termo “Tabela” seguido do número, dois pontos, espaço e seu título;
- as ilustrações deverão ser numeradas seqüencialmente por meio de algarismos arábicos e identificadas na parte inferior pelo termo “Figura” seguido do número, dois pontos, espaço e seu título;
- os títulos das tabelas devem ser suficientemente explicativos.

Conflito de Interesses

Conforme exigências do Comitê Internacional de Editores de Diários Médicos (ICMJE), grupo Vancouver e resolução do Conselho Federal de Medicina nº 1595/2000 os autores têm a responsabilidade de reconhecer e declarar conflitos de interesse financeiros e outros (comercial, pessoal, político, etc.) envolvidos no desenvolvimento do trabalho apresentado para publicação.

Reprodução

Somente a Tendências em HIV/AIDS poderá autorizar a reprodução dos artigos nelas contidos.

Estamos acessíveis a críticas e sugestões e poderemos ser contactados pelos endereços eletrônicos: rsdiaz@usp.br e giovana.lotici@unifesp.br

Dúvidas e sugestões também podem ser resolvidas através da editora:

Atha Comunicação e Editora

A/C: Fernanda Colmatti/ Arthur T. Assis

Rua: Machado Bittencourt,190, cj.410 - Vila Mariana - São Paulo - Capital - CEP 04044-000 - 1atha@uol.com.br