

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas
Programa de Pós-graduação em Genética

Antonio Victor Campos Coelho

**POLIMORFISMOS EM GENES ENVOLVIDOS NA
FARMACOCINÉTICA DE ANTIRRETROVIRAIS E ASSOCIAÇÃO
COM FALHA VIROLÓGICA DA TERAPIA ANTI-HIV**

Recife
2013

Antonio Victor Campos Coelho

**POLIMORFISMOS EM GENES ENVOLVIDOS NA
FARMACOCINÉTICA DE ANTIRRETROVIRAIS E ASSOCIAÇÃO COM
FALHA VIROLÓGICA DA TERAPIA ANTI-HIV**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Genética da Universidade Federal de
Pernambuco como parte dos requisitos exigidos para
obtenção do título de Mestre em Genética.

Orientador: Prof. Dr. Sergio Crovella

**Recife
2013**

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

C672p Coelho, Antonio Victor Campos

Polimorfismos em genes envolvidos na farmacocinética de antirretrovirais e associação com falha virológica da terapia anti-HIV / Antonio Victor Campos Coelho. – Recife: O Autor, 2013.

69: f. : il., tab.

Orientador: Sergio Crovella

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Pós-graduação em Genética, 2013.

Inclui bibliografia, apêndices e anexos

1. Farmacologia 2. Farmacogenética 3. Farmacocinética 4. Polimorfismo (Genética) 5. HIV (Vírus) I. Crovella, Sergio (orientador) II. Título.

615

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2013-087

Antonio Victor Campos Coelho

**POLIMORFISMOS EM GENES ENVOLVIDOS NA
FARMACOCINÉTICA DE ANTIRRETROVIRAIS E ASSOCIAÇÃO
COM FALHA VIROLÓGICA DA TERAPIA ANTI-HIV**

Aprovado em ____/____/____

Banca Examinadora:

**Prof. Dr. Sergio Crovella
Universidade Federal de Pernambuco**

**Prof. Dr. Rafael Lima Guimarães
Universidade Federal de Pernambuco**

**Dr. Luiz Cláudio Arraes de Alencar
Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira**

**Prof. Dr. Paulo Roberto Eleutério de Souza
Universidade Federal Rural de Pernambuco**

**Recife
2013**

Aos portadores de HIV-1 que
participaram como voluntários do estudo,
Dedico este trabalho.

Agradecimentos

Agradeço a minha mãe, Wilma, por seu amor, esforço e dedicação, pois sem isso não seria possível a conclusão de mais essa etapa na vida acadêmica;

A minha avó Maria José e a minha tia Nilma, pelo grande incentivo;

A aos meus amigos e amigas, tanto os “antigos” da graduação, quanto os novos que conheci durante o mestrado as boas memórias, risadas, debates e companheirismo;

A prof. Sergio Crovella, por ter acreditado mais uma vez no meu potencial;

A minha amiga Priscila Serafim por ter me acompanhado durante esses dois anos de muito trabalho, aprendizado e amadurecimento; sem ela o trabalho seria muito mais difícil;

A equipe do IMIP pelo apoio durante as coletas, em especial Ana, Fábio e dra. Gerlane;

A professor Luiz Cláudio Arraes de Alencar, por toda a sua atenção e incentivo;

Aos professores Rafael Guimarães e Lucas Brandão pelos conselhos e supervisão;

A meu irmão, prof. Hemílio Fernandes, pela revisão dos conceitos estatísticos usados no estudo;

Aos setores do LIKA, bem como seus alunos e funcionários, por fornecerem toda a infraestrutura necessária para o desenvolvimento da presente pesquisa;

À FACEPE e CNPq pelo apoio financeiro.

“Zero novas infecções pelo HIV.
Zero discriminação.
Zero óbitos relacionados à AIDS.”
-Visão do UNAIDS

Resumo

A infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) pode promover a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS). Os antirretrovirais reduziram as mortes relacionadas a AIDS. Os antirretrovirais são absorvidos e metabolizados em diversas células. Existe variabilidade na resposta a esses medicamentos. Portanto, polimorfismos genéticos em vias farmacocinéticas podem afetar o resultado terapêutico. O objetivo do presente estudo foi avaliar se diferentes perfis genéticos estão relacionados com a falha virológica de antirretrovirais de primeira linha, definida como presença de carga viral detectável no sangue apesar de um ano de terapia. Foram recrutados 187 pacientes em tratamento na região metropolitana de Recife – PE para um estudo de caso controle (160 sucessos e 27 falhas). Foram analisadas variáveis clínicas e epidemiológicas, como sexo, idade e massa corporal, medicamentos prescritos, carga viral e contagem de células T CD4+. Sete polimorfismos em cinco genes (*ABCB1*, *ABCC1*, *CYP2B6*, *SLC22A1* e *SLCO3A1*) foram genotipados. Não foram observadas associações entre os polimorfismos dos genes *CYP2B6*, *SLC22A1* e *SLCO3A1* com a falha virológica. Análises por regressão logística indicaram que polimorfismos nos genes *ABCB1* (rs1045642) e *ABCC1* (rs212091) estiveram significativamente associados com a ocorrência de falha de esquemas contendo inibidores de protease (OR=5,01, p=0,045 e OR=6,50, p=0,02, respectivamente). Os resultados poderão contribuir para o entendimento da variabilidade na resposta ao tratamento anti-HIV e ajudar a identificar pacientes em risco de falha, auxiliando na orientação da escolha do primeiro esquema terapêutico.

Palavras-chave: farmacogenética; terapia antirretroviral; falha terapêutica; HIV-1.

Abstract

Human immunodeficiency virus (HIV) infection may promote the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). Antiretroviral drugs help prevent more AIDS related deaths. These drugs are absorbed and metabolized on several cells. There is interindividual variability of treatment outcome of antiretroviral treatment. Thus, genetic polymorphisms on pharmacokinetic pathways could influence therapy result. The present study aimed to assess if different genetic backgrounds are related to virologic failure of first line antiretroviral drugs regimens, which was defined as the presence of viral load despite one year of therapy. One-hundred eighty seven patients of metropolitan region of Recife – PE were recruited for a case-control study (160 successes and 27 failures). Clinical and epidemiologic data were analyzed, such as sex, age and body mass, prescribed drugs and pre-treatment viral load and CD4+ T cell count. Seven polymorphisms in five genes (*ABCB1*, *ABCC1*, *CYP2B6*, *SLC22A1* and *SLCO3A1*) were genotyped. We did not find association between *CYP2B6*, *SLC22A1* and *SLCO3A1* polymorphisms and virologic failure. Logistic regression analysis showed a statistically significant association between polymorphisms on *ABCB1* (rs1045642) and *ABCC1* (rs212091) with virological failure of regimens containing protease inhibitors (OR=5.01, p=0.045 e OR=6.50, p=0.02, respectively). Our results could contribute to understand the causes of interindividual variability on treatment response and identify patients with risk of virological failure, thus help the choice of the first drug regimen prescription for the patient.

Keywords: pharmacogenetics; antiretroviral therapy; therapy failure, HIV-1.

Lista de Ilustrações

Figura 1. Prevalência mundial do HIV-1. Atualmente 33 milhões de pessoas vivem com o HIV-1. A prevalência varia entre os países, atingindo níveis tão altos quanto 28% da população em alguns países africanos. Adaptado de UNAIDS (2010). 5

Figura 2. Esquema do genoma do HIV-1, onde são representados os genes que codificam as 14 proteínas virais, algumas estruturais (p17, p24, p7, p6, gp120 e gp41), outras envolvidas na replicação viral (protease ou P, transcriptase reversa ou TR, integrase) e acessórias envolvidas na patogênese (vif, vpr, tat, rev, nef e vpu). Flanqueando esses genes, existem repetições terminais longas (LTR), envolvidas na regulação do genoma. Figura modificada a partir de Watts *et al.* (2009). 7

Figura 3. Ciclo de vida do HIV-1. O vírus usa receptores presentes na membrana celular para entrar na célula, onde o capsídeo é desmontado, expondo o material genético do vírus, o qual é integrado no genoma celular, de onde comanda a síntese de material viral. Novos vírus são montados, brotam da célula e sofrem maturação para um novo ciclo infeccioso. Adaptado de Votteler e Schubert (2008). 8

Figura 4. História natural da infecção pelo HIV-1. A infecção primária é marcada por uma alta viremia (linha pontilhada) que acompanha na queda do número de linfócitos CD4+ (linha sólida). Quando a resposta imune adaptativa ao HIV-1 é estabelecida, há uma queda na produção viral e uma leve recuperação das células CD4+. Geralmente após anos de infecção crônica, o sistema imune falha gradualmente, permitindo a replicação descontrolada do HIV-1, com consequente destruição de células CD4+, estabelecendo a imunodeficiência (fase de AIDS) e aumentando o risco de infecções oportunistas e doenças constitucionais. Sem tratamento, a infecção pelo HIV-1 invariavelmente leva a óbito. Adaptado a partir de Fanales-Belasio *et al.* (2010). 10

Figura 5. Desenho esquemático da reação em cadeia da polimerase (PCR). (A) Uma região de interesse no genoma é delimitada por oligonucleotídeos (*primers*, denominados *Forward* e *Reverse* acima), é copiada pela DNA polimerase, dobrando seu número a cada ciclo (o número final de produtos é igual a 2^N , em que N é a quantidade de ciclos). (B) Um exemplo de protocolo de PCR com três ciclos: desnaturação, anelamento e extensão. (C) Tecnologia *TaqMan*. As sondas são oligonucleotídeos com duas moléculas ligadas a eles, a reporter (R), que emite fluorescência, e a quencher (Q), que absorve fluorescência. Após a hidrólise da sonda pela DNA polimerase (*Taq*), há a emissão de fluorescência. Duas ou mais sondas, cada uma com uma molécula reporter alelo-específica são usadas em genotipagens de polimorfismos. Figuras (A) e (C) modificadas a partir de Valasek e Repa (2005). 23

Lista de Tabelas

- Tabela 1. Os 19 antirretrovirais distribuídos universal e gratuitamente no Brasil, suas apresentações e respectivas dosagens. 14
- Tabela 2. Proteínas de vias farmacocinéticas dos antirretrovirais mais prescritos em esquemas iniciais da terapia anti-HIV-1, bem como seus locais de expressão e referências da literatura. 19
- Tabela 3. Testes de associação (variáveis clínicas), medidas de associação e p-valores resultantes (Teste T de Welch). 29
- Tabela 4. Testes de associação (variáveis epidemiológicas), estratificações por esquema terapêutico recebido, medidas de associação e p-valores resultantes (Teste Exato de Fisher). 30
- Tabela 5. Frequências alélicas e genotípicas do gene *ABCB1*, testes de associação (teste exato de Fisher) com a ocorrência de falha virológica após estratificação por esquema terapêutico contendo IPs. 32
- Tabela 6. Frequências alélicas e genotípicas do gene *ABCC1*, testes de associação (teste exato de Fisher) com a ocorrência de falha virológica após estratificação por esquema terapêutico contendo IPs. 33
- Tabela 7. Frequência alélica e genotípica do gene *CYP2B6*, testes de associação (teste exato de Fisher) com a ocorrência de falha virológica após estratificação por esquema terapêutico contendo INNTRs. 34
- Tabela 8. Frequência alélica e genotípica do gene *SLC22A1*, testes de associação (teste exato de Fisher) com a ocorrência de falha virológica. 34
- Tabela 9. Frequência alélica e genotípica do gene *SLCO3A1*, testes de associação (teste exato de Fisher) com a ocorrência de falha virológica após estratificação por esquema terapêutico contendo INNTRs. 35
- Tabela 10. Coeficientes estimados, razão de chances (*odds ratio*) relacionadas, intervalos de 95% de confiança e p-valores do modelo com melhor aderência para explicar a ocorrência de falha virológica de esquema antirretrovirais de primeira linha contendo inibidores de protease (n=87). 37

Lista de Abreviaturas

Item	Definição
3TC	Lamivudina
ABC	<i>ATP-binding cassette</i> , cassete ligante de ATP
ABCB1	Polipeptídeo membro 1 da família B da superfamília ABC
ABCC1	Polipeptídeo membro 1 da família C da superfamília ABC
ADME	Absorção, distribuição, metabolização e excreção
AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
ATP	Trifosfato de adenosina
ATV	Atazanavir
AZT	Azidotimidina ou zidovudina
CDC	<i>Center for Disease Control</i>
CYP	Citocromos P450
CYP2B6	Polipetídeo membro 6 da subfamília B da família 2 da superfamília CYP
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EFZ	Efavirenz
EUA	Estados Unidos da América
HAART	<i>Highly active antiretroviral therapy</i> , terapia antirretroviral de alta atividade
HIV-1	Vírus da imunodeficiência humana tipo 1
INNTR	Inibidor não-análogo a nucleosídeos da transcriptase reversa
INTR	Inibidor análogo a nucleosídeos da transcriptase reversa
IP	Inibidor de protease do HIV-1

Item	Definição
LPV/r	Combinação de lopinavir com ritonavir
LTR	<i>Long terminal repeats</i> , repetições terminais longas
mg	Miligrama(s)
mL	Mililitro(s)
MRP1	Polipeptídeo de múltipla resistência a drogas tipo 1 (sinônimo de ABCC1)
NVP	Nevirapina
P	Protease do HIV-1
PCR	Reação em cadeia da DNA polimerase
p-gp	Glicoproteína de permeabilidade (sinônimo de ABCB1)
RNA	Ácido ribonucleico
RTV	Ritonavir
SLC	<i>Solute carrier</i> , carreadores de solutos
SLC22A1	Polipeptídeo membro 1 da subfamília A da família 22 (transportadores de cátions orgânicos) da superfamília SLC
SLCO3A1	Polipeptídeo membro 1 da subfamília A da família 3 (transportadores de ânions orgânicos) da superfamília SLC
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i> , polimorfismo de único nucleotídeo
TR	Transcriptase reversa
UNAIDS	Programa Conjunto das Nações Unidas sobre HIV/AIDS

Sumário

Resumo	vi
Abstract	vii
Lista de Ilustrações	viii
Lista de Tabelas	ix
Lista de Abreviaturas.....	x
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1 O VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA TIPO UM (HIV-1)	3
2.1.1 Histórico	3
2.1.2 Epidemiologia.....	5
2.1.3 Estrutura genética do HIV-1	6
2.1.4 Infecção, dinâmica viral e patogênese	7
2.2 A TERAPIA ANTI-HIV	11
2.2.1 Antirretrovirais	11
2.2.2 Farmacocinética dos antirretrovirais.....	15
2.3 FARMACOGENÉTICA	20
2.3.1 Histórico	20
2.3.2 Farmacogenética e falha da terapia Anti-HIV	21
2.4 GENOTIPAGEM DE POLIMORFISMOS DE INTERESSE	22
2.4.1 Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real	22
2.4.2 Tecnologia <i>TaqMan</i>	23
3. OBJETIVOS	24
3.1 Objetivo geral	24
3.2 Objetivos específicos	24

4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
4.1 Desenho do estudo e aspectos éticos.....	25
4.2 População de estudo.....	26
4.3 Extração de DNA.....	26
4.4 Variáveis Estudadas.....	26
4.4.1 Variáveis clínicas e epidemiológicas	26
4.4.2 Polimorfismos em genes candidatos.....	26
4.5 Genotipagem.....	27
4.6 Análises estatísticas.....	27
5. RESULTADOS	29
5.1 Análises das variáveis epidemiológicas e clínicas	29
5.2 Frequências alélicas e genotípicas do gene <i>ABCB1</i>	31
5.3 Frequências alélicas e genotípicas do gene <i>ABCC1</i>	32
5.4 Frequências alélicas e genotípicas do gene <i>CYP2B6</i>	33
5.5 Frequências alélicas e genotípicas do gene <i>SLC22A1</i>	34
5.6 Frequências alélicas e genotípicas do gene <i>SLCO3A1</i>	35
5.7 Regressão logística.....	35
6. DISCUSSÃO	38
7. CONCLUSÃO.....	42
REFERÊNCIAS.....	43
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	55
APÊNDICE B – QUESTIONÁRIO CLÍNICO.....	57
APÊNDICE C – CONCEITOS DE REGRESSÃO LOGÍSTICA.....	61
ANEXO A – PARECER DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA.....	66
<i>CURRICULUM VITAE</i>	67

1. INTRODUÇÃO

A conclusão do Projeto Genoma Humano em 2003 forneceu à comunidade científica uma vasta quantidade de informação sobre os fundamentos da hereditariedade humana, evidenciando a presença de variação genética entre os indivíduos.

Boa parte dessa variação consiste em polimorfismos de único nucleotídeo (SNPs), diferenças pontuais entre duas ou mais sequências de nucleotídeos em comparação. Os SNPs podem resultar em consequências funcionais importantes para a atividade gênica, alterando níveis de expressão ou modificando aminoácidos na sequência proteica.

Devido a essa importância funcional, os SNPs vêm sendo alvo de investigação para saber seus efeitos sobre o desenvolvimento de doenças autoimunes, câncer, imunidade contra doenças infecciosas e na resposta a tratamentos terapêuticos. A área de estudo que investiga como a variabilidade genética do indivíduo influencia nas respostas medicamentosas é chamada de farmacogenética, a qual procura compreender as bases genéticas das diferenças interpessoais em relação à eficácia e toxicidade dos diversos tratamentos terapêuticos contra as mais diversas patologias.

Atualmente, a farmacogenética é uma área em expansão, abrangendo estudos sobre a influência da variabilidade genética sobre o resultado de terapias contra, por exemplo, doenças infecciosas, como a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), causada pelo vírus da imunodeficiência humana tipo 1, o HIV-1. O presente estudo pretende investigar se o perfil genético do indivíduo influencia no resultado final do tratamento terapêutico anti-HIV, estando relacionado à falha terapêutica de esquemas antirretrovirais.

Assim, o presente estudo pretende contribuir para o entendimento da variabilidade entre os indivíduos no que diz respeito ao sucesso do tratamento anti-HIV, o que no futuro permitirá a otimização e personalização da escolha do tratamento, melhorando a eficácia do tratamento e a qualidade de vida dos pacientes.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 O VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA TIPO UM (HIV-1)

2.1.1 Histórico

Em junho de 1981, o *Center for Disease Control* (CDC) publicou em seu semanário de informações epidemiológicas um relato de cinco homens jovens de Los Angeles (EUA) acometidos por uma doença incomum, a pneumonia causada por *Pneumocystis carinii*, o que indicava uma disfunção do sistema imune. Dois fatos chamaram a atenção dos clínicos envolvidos: os pacientes eram homossexuais e não havia registro anterior de imunodeficiência. Com isso, foi levantada a hipótese de que existia algum fator associado ao contato sexual que predisporia indivíduos a infecções oportunistas (Center for Disease Control, 1981).

Para investigar essa hipótese, o CDC comandou uma força tarefa de vigilância nacional para identificar os fatores de risco associados a essa nova doença, que foi nomeada de síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS, na sigla em inglês) (Center for Disease Control, 1982a).

Nos meses seguintes, o CDC publicou relatos de que usuários de drogas intravenosas e haitianos recém-chegados aos EUA sem histórico de sexo homossexual que apresentavam sinais similares aos dos cinco homens de Los Angeles. Em seguida, surgiram relatos de que hemofílicos que desenvolveram pneumonia pneumocística. Esses acontecimentos evidenciaram que o agente etiológico da AIDS era transmissível também por sexo heterossexual e por sangue ou hemoderivados contaminados por um agente até então desconhecido (Center for Disease Control, 1982b).

Em março de 1983, após o relato de mais de 1200 casos de AIDS, tanto nos EUA quanto em 15 outros países, o CDC publicava as primeiras conclusões de que a AIDS era de fato transmissível por um agente infeccioso (embora ainda desconhecido à época), o qual era capaz de ser transmitido em latência clínica, antes mesmo de causar AIDS. Além disso, foi reconhecido pela primeira vez o fato preocupante de que os casos reportados de AIDS subestimavam o número de pessoas infectadas. As recomendações incluíam que pessoas em risco de contrair o vírus (usuários de drogas ilícitas injetáveis ou pessoas com múltiplos parceiros sexuais) reduzissem o número parceiros sexuais e que não doassem sangue ou plasma (Center for Disease Control, 1983).

Com o progresso dos estudos, em 1983, dois grupos independentemente isolaram o retrovírus de células do sistema imune de pacientes com sintomas de AIDS que mais tarde iria ser conhecido como o vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1) (Barre-Sinoussi *et al.*, 1983; Gallo *et al.*, 1983).

Investigações retrospectivas evidenciaram que o HIV-1 surgiu na África. Determinou-se que um vírus que infectava chimpanzés passou a infectar humanos, provavelmente caçadores. Após um processo de adaptação ao hospedeiro humano, passou a ser transmissível entre pessoas. Fatores sociais como a exploração sexual e baixo índice de tratamento para doenças sexualmente transmissíveis ulcerativas (que facilitam a transmissão do HIV) no início do século XX na África Central contribuíram para a proliferação do HIV na África (De Cock *et al.*, 2011).

Com a intensificação da migração humana na segunda metade do século XX, o subtipo B do HIV-1 foi então introduzido no Haiti por volta da segunda metade da década de 1960. De lá, o vírus foi introduzido nos EUA e em outras partes do

mundo, onde permaneceu em circulação por mais de uma década até o surgimento dos primeiros casos de AIDS. Estima-se que milhares de americanos já haviam sido infectados no fim da década de 1970 (Gilbert *et al.*, 2007).

2.1.2 Epidemiologia

Em poucos anos, a infecção pelo HIV-1 ganhou o status de uma pandemia. Atualmente estima-se que existam cerca de 33 milhões de pessoas vivendo com o HIV ao redor do mundo, com prevalências características de cada país (Figura 1). Dessas, 1,4 milhão vivem nas Américas Central e do Sul. O Brasil abriga um terço desse montante, com prevalência estabilizada em cerca de 1% da população (UNAIDS, 2010).

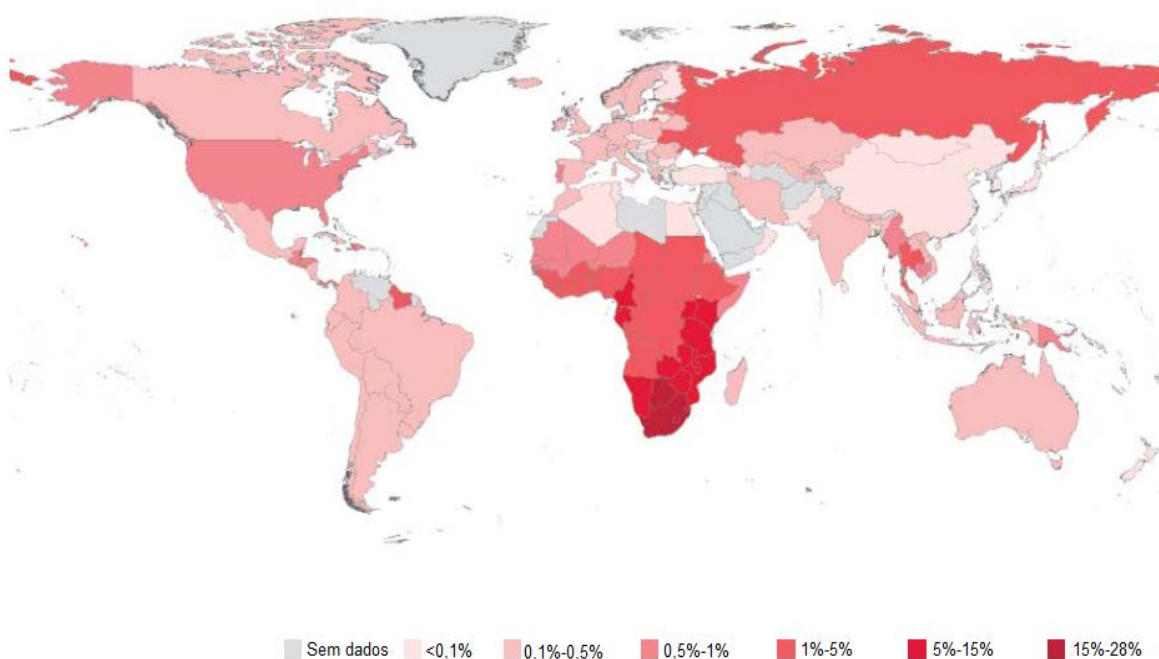


Figura 1. Prevalência mundial do HIV-1. Atualmente 33 milhões de pessoas vivem com o HIV-1. A prevalência varia entre os países, atingindo níveis tão altos quanto 28% da população em alguns países africanos. Adaptado de UNAIDS (2010).

Taxas de prevalência estão estáveis em 0,4% nas mulheres e 0,8% nos homens entre 15 a 49 anos desde 2004. Estudos conduzidos em capitais brasileiras

registram prevalência de 5,9% entre usuários de drogas injetáveis ilícitas, de 10,5% entre homens que fazem sexo com homens e 4,9% entre profissionais do sexo. Com isso, estima-se que exista 1,7 homens infectados com HIV-1 para cada mulher infectada (Ministério da Saúde, 2012).

Com relação à região Nordeste, registra-se a incidência de 6,9 casos de AIDS para cada 100.000 habitantes em 2010, correspondendo a 12,9% dos total de casos no Brasil. Pernambuco possui o segundo maior número de casos (18.215, correspondendo a 23,1% dos casos da região Nordeste), precedido pelo estado da Bahia (Ministério da Saúde, 2012).

2.1.3 Estrutura genética do HIV-1

O HIV-1 é um lentivírus envelopado com um genoma composto por duas moléculas de RNA de fita simples. Contém 9181 nucleotídeos, distribuídos em nove matrizes abertas de leitura (ORF) que codificam 14 proteínas características da família dos retrovírus (Figura 2). Algumas são proteínas estruturais, como a proteína de matriz (p17), do capsídeo (p24) e nucleocapsídeo (p7), e a proteína p6, codificadas pelo *gag*; e gp120 e gp41, envolvidas na formação do envelope viral lipoproteico e codificadas pelo *env* (Watts et al., 2009).

A ORF *gag-pol* gera um polipeptídeo que contém a transcriptase reversa (TR), a protease (P) e a integrase, envolvidas na replicação, maturação e capacidade infecciosa da partícula viral. Seis genes acessórios, envolvidos na infecção e patogênese (*vif*, *vpr*, *tat*, *rev*, *nef* e *vpu*) também são reconhecidos. Flanqueando esses genes, em ambas as extremidades 5' e 3' do genoma, existem repetições terminais longas (LTR), envolvidas na inserção do genoma viral no

hospedeiro, bem como na regulação da expressão de genes virais (Watts et al., 2009; HIV Sequence Compendium 2012, 2011).

2.1.4 Infecção, dinâmica viral e patogênese

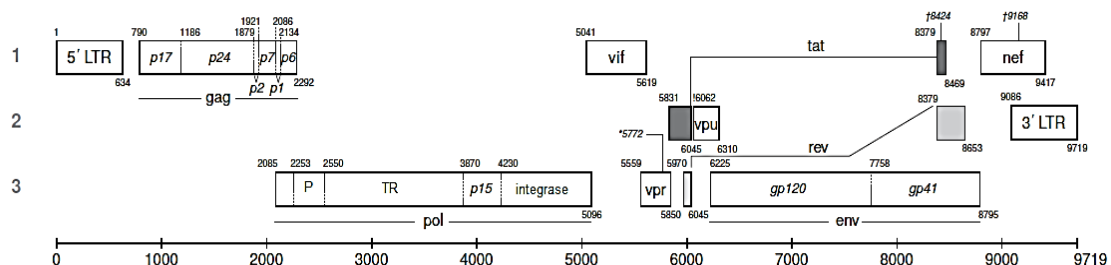


Figura 2. Esquema do genoma do HIV-1, onde são representados os genes que codificam as 14 proteínas virais, algumas estruturais (p17, p24, p7, p6, gp120 e gp41), outras envolvidas na replicação viral (protease ou P, transcriptase reversa ou TR, integrase) e acessórias envolvidas na patogênese (vif, vpr, tat, rev, nef e vpu). Flanqueando esses genes, existem repetições terminais longas (LTR), envolvidas na regulação do genoma. Figura modificada a partir de Watts *et al.* (2009).

O HIV-1 possui afinidade por células T CD4+ auxiliares, embora seja capaz de infectar outras células linfoides como linfócitos T CD8+, macrófagos e células dendríticas. As células infectadas liberam partículas virais maduras no meio extracelular/plasma sanguíneo e certas secreções corporais (sêmen, fluido vaginal, leite materno), que então são transmitidas para outro indivíduo, principalmente através do contato sexual desprotegido, amamentação ou uso de seringas contaminadas (Kilmarx, 2009).

O ciclo de vida do HIV-1 pode ser representado em seis etapas: ligação e entrada na célula, desnudamento, transcrição reversa, integração proviral, síntese de material viral e sua montagem e por fim, brotamento da célula e maturação (Fanales-Belasio et al., 2010).

As proteínas gp120 e gp41 do envelope viral são reconhecidas pelas proteínas CD4 e receptores de quimiocinas presentes nas células linfoides, fazendo

com que ocorra a fusão da membrana do envelope viral com a da célula e a penetração do capsídeo no meio intracelular (Fanales-Belasio et al., 2010).

Em seguida, o capsídeo viral é desmontado (desnudamento), liberando o genoma de RNA viral, o qual é convertido em DNA de fita dupla (genoma proviral) através da TR. Com o auxílio da integrase viral, o genoma proviral é inserido no genoma celular, de onde comanda a síntese de material viral, ou seja, RNA genômico e proteínas virais, que são montados em novas partículas virais, que então brotam da célula, levando consigo porções da membrana celular para constituir um novo envelope.

Já no meio extracelular, a P viral cliva polipeptídeos gag-pol, maturando o vírus para um novo ciclo infeccioso (Votteler J e Schubert U, 2008). A Figura 3 esquematiza o ciclo de vida viral.

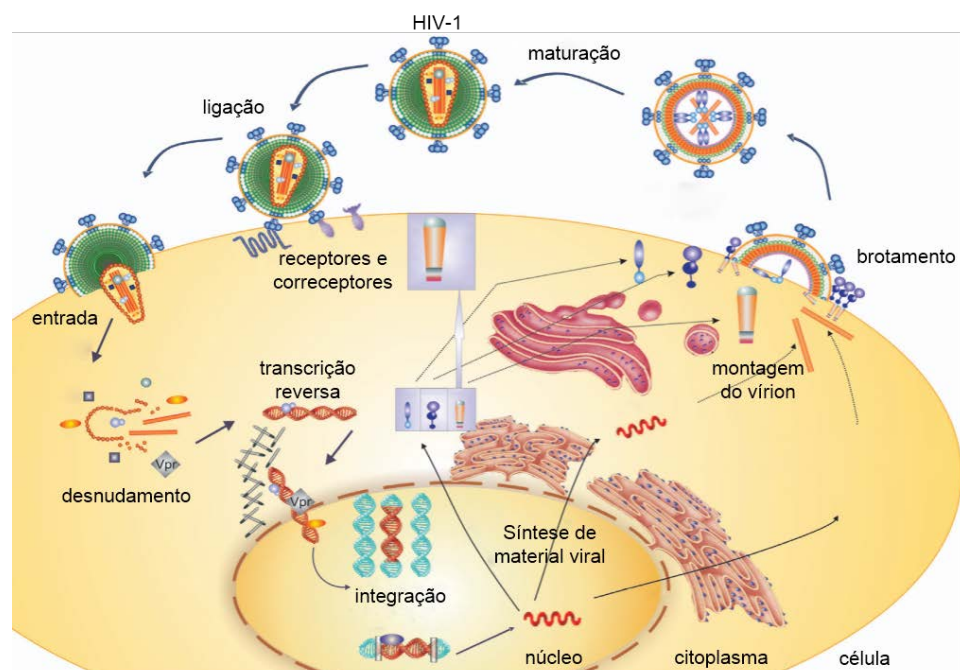


Figura 3. Ciclo de vida do HIV-1. O vírus usa receptores presentes na membrana celular para entrar na célula, onde o capsídeo é desmontado, expondo o material genético do vírus, o qual é integrado no genoma celular, de onde comanda a síntese de material viral. Novos vírus são montados, brotam da célula e sofrem maturação para um novo ciclo infeccioso. Adaptado de Votteler e Schubert (2008).

Durante os dias iniciais do contato com o vírus, as células infectadas (principalmente macrófagos distribuídos nas mucosas) migram para tecidos linfoides, onde o contato direto intercelular favorece a disseminação viral. O HIV-1 subverte a resposta imune local, favorecendo sua replicação, o que leva a uma fase aguda, caracterizada por uma grande quantidade de vírus circulando no plasma sanguíneo, frequentemente em titulações superiores a 10^6 cópias/mL de plasma, pois a resposta imune adaptativa ainda não foi desenvolvida, aumentando o potencial infeccioso do indivíduo. Apenas um terço dos adultos infectados apresentam sintomas (febre, mal-estar ou até mesmo encefalite) nos primeiros seis meses após a exposição ao vírus (Sleasman e Goodenow, 2003).

Após a fase aguda da infecção, o sistema imune do hospedeiro começa a criar a resposta imune contra a presença do vírus, fazendo com que a viremia diminua em magnitude e seja estabilizada. No entanto, o HIV-1 apresenta vários mecanismos de escape da resposta imune, entrando em latência nas células infectadas, formando “reservatórios” virais. Transientemente, ocorrem picos de replicação virais, causando doença crônica e assintomática nos tecidos linfoides (Fanales-Belasio et al., 2010).

Dessa forma, a história natural da infecção pelo HIV-1 pode ser entendida como um mecanismo de “*tap and drain*” (algo como “torneira e ralo” no português). O componente *tap* equivaleria à capacidade do timo do hospedeiro em repor células CD4+, enquanto o *drain* equivaleria ao ritmo em que as células CD4+ são destruídas pelo vírus e pela resposta imune citotóxica. Ao longo dos anos de doença crônica pelo HIV-1, a capacidade de restauração do sistema imune vai sendo exaurida e não mais consegue equilibrar as perdas causadas pelo HIV-1, resultando num crescente déficit de células T CD4+ (Sleasman e Goodenow, 2003).

Com isso, 10 anos após à exposição ao HIV-1 (em média), níveis de CD4+ atingem valores abaixo de 200 células/ μ L de sangue, o que caracteriza o estágio clínico de AIDS, visto que nesse momento, o indivíduo passa a estar em grande risco de desenvolver doença constitucional (sinais e sintomas com duração maior que um mês; febre, diarreia e perda de massa corporal) e cânceres, bem com contrair infecções oportunistas (Hutchinson, 2001).

Portanto, a infecção por HIV-1 é uma doença crônica com estágios geralmente distintos (Figura 4) e é invariavelmente fatal se não tratada com antirretrovirais usados na prática clínica (ver item 2.2 a seguir).

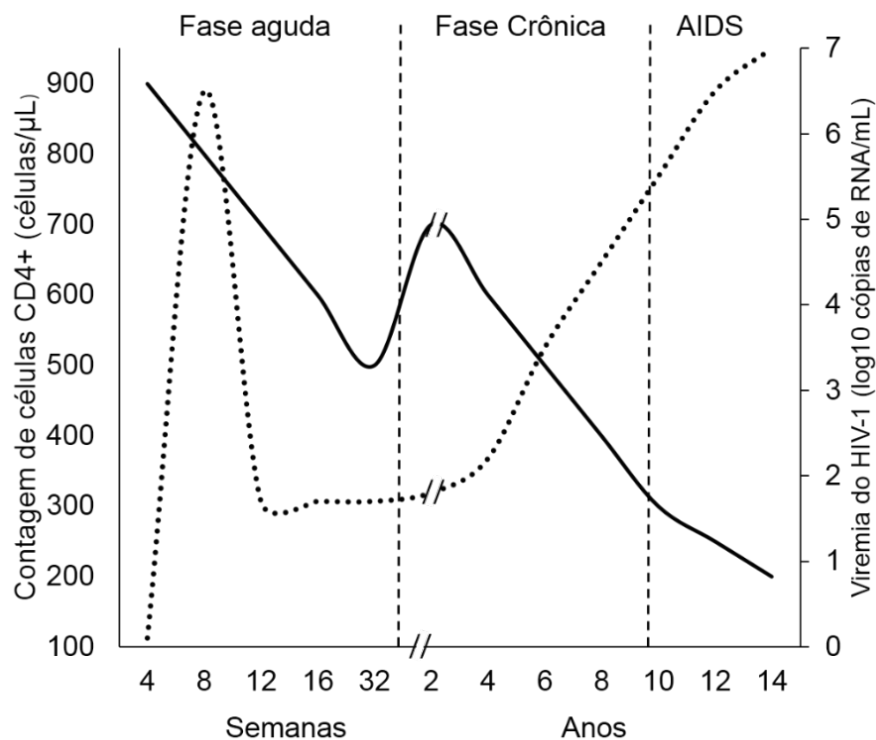


Figura 4. História natural da infecção pelo HIV-1. A infecção primária é marcada por uma alta viremia (linha pontilhada) que acompanha na queda do número de linfócitos CD4+ (linha sólida). Quando a resposta imune adaptativa ao HIV-1 é estabelecida, há uma queda na produção viral e uma leve recuperação das células CD4+. Geralmente após anos de infecção crônica, o sistema imune falha gradualmente, permitindo a replicação descontrolada do HIV-1, com consequente destruição de células CD4+, estabelecendo a imunodeficiência (fase de AIDS) e aumentando o risco de infecções oportunistas e doenças constitucionais. Sem tratamento, a infecção pelo HIV-1 invariavelmente leva a óbito. Adaptado a partir de Fanales-Belasio *et al.* (2010).

2.2 A TERAPIA ANTI-HIV

2.2.1 Antirretrovirais

Os anos seguintes à descoberta do HIV-1 foram marcados por intensa pesquisa da comunidade científica mundial e resultou no desenvolvimento dos primeiros medicamentos anti-HIV. Em 1987, foi lançada a azidotimidina (AZT), também conhecida como zidovudina (ZDV), o primeiro antirretroviral. Ensaios clínicos demonstraram que a ZDV aumentava a sobrevida dos pacientes, embora não prolongadamente. Com isso, houve a necessidade da busca de novos remédios para combater o HIV-1 (Vella *et al.*, 2012).

O uso de apenas um antirretroviral logo se demonstrou ineficaz para obter a supressão da replicação viral. Isso ocorre devido à intrínseca alta taxa de mutações no genoma do HIV-1, ocasionado pela TR, a qual é sujeita a erros e não possui atividade revisora (inserindo um erro a cada ciclo replicativo, em média). Como bilhões de vírus são produzidos diariamente nas células infectadas, se houver o surgimento de uma variante com uma mutação que confira resistência ao medicamento, ela será selecionada devido à pressão seletiva imposta pela presença do antirretroviral. Com isso, essa variante logo crescerá em frequência, tornando o tratamento ineficaz (Tang e Shafer, 2012).

Observações de ensaios clínicos evidenciaram que o tratamento anti-HIV poderia ter uma maior eficácia através da combinação de antirretrovirais quando comparada com a monoterapia (Hammer *et al.*, 1996).

Dessa forma, emergiu o conceito da terapia antirretroviral altamente efetiva (do inglês *highly active antiretroviral therapy*, HAART), a qual é caracterizada pela combinação de três drogas antirretrovirais, pois as chances do vírus se tornar resistente a três drogas simultaneamente são reduzidas, efetivamente melhorando

o prognóstico de pacientes, promovendo queda da carga viral e recuperação do sistema imune. As drogas atualmente presentes no mercado podem ser divididas em quatro classes de acordo com o seu modo de ação (Cressey e Lallemand, 2007):

- Inibidores Análogos a Nucleosídeos da Transcriptase Reversa (INTR): são análogos de nucleosídeos ou nucleotídeos que interrompem a síntese do material genético do vírus.
- Inibidores Não-Análogos a Nucleosídeos da Transcriptase Reversa (INNTR): impedem a síntese do material genético do vírus por se ligarem a sítios alostéricos da transcriptase reversa, inibindo sua atividade.
- Inibidores da Protease (IP): interagem com a protease viral, impedindo o processamento correto das proteínas, abolindo sua infectividade.
- Inibidores de Fusão: ligam-se a proteínas de membrana celulares que servem de receptores ou co-receptores para o vírus, impedindo a fusão do vírus na membrana da célula hospedeira.

Diretrizes atuais recomendam o uso de três drogas em combinação, sendo obrigatoriamente duas da classe dos INTR (o *backbone* do esquema) e a outra sendo uma da classe dos INNTR ou dos IP (Alves *et al.*, 2012).

O Brasil distribui universal e gratuitamente 19 formulações de antirretrovirais para os indivíduos HIV+ desde 1996 (Tabela 1); (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

Diretrizes nacionais recomendam que a primeira opção de esquema terapêutico inicial (ou de primeira linha) consista da combinação de INTRs AZT+3TC (300 mg + 150 mg, duas vezes ao dia) mais um INNTR, preferencialmente 600 mg de efavirenz (EFZ) uma vez ao dia ou, alternativamente, 200 mg de nevirapina (NVP), duas vezes ao dia. A segunda opção de esquema inicial é administrar AZT+3TC mais um IP, preferencialmente a combinação

lopinavir+ritonavir (LPV/r) 200 mg + 50 mg duas vezes ao dia, ou alternativamente, atazanavir 300 mg (ATV) mais ritonavir 100 mg (RTV) uma vez ao dia (Brasil. Ministério da Saúde. Secretária de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de DST e Aids, 2008).

Os demais antirretrovirais geralmente são usados após uma eventual falha do esquema inicial, pois são considerados mais tóxicos do que os de primeira opção, podendo causar mais efeitos adversos. A falha terapêutica pode ocorrer devido à adesão insatisfatória do paciente ao tratamento, mas também pode ser devido a fatores genéticos individuais (Brasil. Ministério da Saúde. Secretária de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de DST e Aids, 2008), que serão explorados nos tópicos a seguir.

Tabela 1. Os 19 antirretrovirais distribuídos universal e gratuitamente no Brasil, suas apresentações e respectivas dosagens.

Antirretroviral	Apresentação	Dosagem	Classe
Abacavir	comprimido	300 mg	INTR
	solução oral	20 mg/mL	
Atazanavir (ATV) ^e	cápsula	200 mg	IP
Darunavir	comprimido	75, 150 ou 300 mg	IP
	cápsula	250 ou 400 mg	
Didanosina	pó – solução oral	10 mg/mL	INTR
Efavirenz (EFZ) ^b	comprimido	400 ou 600 mg	INNTR
	solução oral	10 mg/mL	
	cápsula	30 mg	
Estavudina	pó – solução oral	1 mg/mL	INTR
Etravirina	comprimido	100 mg	INNTR
Fosamprenavir	comprimido	700 mg	IP
Indinavir	cápsula	400 mg	IP
	comprimido	150 mg	
Lamivudina (3TC) ^a	solução oral	10 mg/mL	INTR
	comprimido	200 mg	
Nevirapina (NVP) ^c	suspensão oral	10 mg/mL	INNTR
Raltegravir	comprimido	400 mg	IP
Ritonavir (RTV)	cápsula	100 mg	IP
Saquinavir	cápsula	200 mg	IP
Tenofovir	comprimido	300 mg	INNTR
Tipranavir	comprimido	250 mg	IP
	cápsula	100 mg	
Zidovudina (AZT) ^a	solução injetável	10 mg/mL	INTR
	solução oral	10 mg/mL	
Combinação AZT+3TC ^a	comprimido	300 mg + 150 mg	INTR
Combinação lopinavir+ritonavir (LPV/r) ^d	comprimido	200 + 50 mg	IP

(a) Antirretroviral obrigatório no esquema inicial. Letras b até e: indicam antirretrovirais para serem usados em combinação com os medicamentos marcados com a letra a, e refletem a ordem decrescente de recomendação (do mais recomendado ao menos recomendado para o esquema inicial).

Ex.: em um esquema contendo AZT+3TC (letra a), o efavirenz (b) é recomendado mais fortemente que a nevirapina (c) e os demais.

INTR – Inibidor análogo a nucleosídeos da transcriptase reversa

INNTR – Inibidor não-análogo a nucleosídeos da transcriptase reversa

IP – inibidor da protease

2.2.2 Farmacocinética dos antirretrovirais

Para que os antirretrovirais exerçam sua atividade, é necessário que sejam absorvidos e distribuídos para os tecidos. Ao mesmo tempo, os medicamentos são substâncias estranhas ao organismo, e são excretados dos tecidos, muitas vezes após sucessivas metabolizações. No contexto farmacológico, esse conjunto de vias metabólicas é denominado de vias de absorção, distribuição, metabolização e excreção (ADME), e também são denominadas como vias de farmacocinética (Telenti e Zanger, 2008).

Três importantes superfamílias gênicas que codificam proteínas importantes nas vias farmacocinéticas de antirretrovirais: a família caracterizada pelo cassete ligante de adenosina trifosfato (ATP), ou ABC (do inglês *ATP-binding cassette*), a de carreadores de solutos, SLC (do inglês *solute carrier*) e a dos citocromos P450, ou CYP, do inglês *cytochrome P450* (Ingelman-Sundberg *et al.*, 2007; Kis *et al.*, 2010).

Fisiologicamente, ou seja, na ausência de medicamentos, essas proteínas exercem funções celulares, como por exemplo, transporte de nutrientes e catabolismo de hormônios. Os antirretrovirais possuem semelhança molecular aos seus substratos fisiológicos e portanto essas proteínas acabam interagindo com os medicamentos e assim estabelecendo sua farmacocinética.

2.2.2.1 Superfamília ABC

Essa superfamília é composta por mais de 40 genes humanos que codificam para proteínas transmembrana, as quais possuem domínios na porção citoplasmática onde o ATP se liga, por isso a razão de seu nome (*ATP-binding cassette*). Essas proteínas usam a hidrólise de ATP para fornecer a energia necessária para transportar moléculas grandes e hidrofóbicas, normalmente para

fora das células (transporte ativo). A função dessas proteínas parece ser a de proteção contra substâncias estranhas e potencialmente tóxicas às células, medicamentos inclusive (Borst e Elferink, 2002).

No contexto da farmacocinética de antirretrovirais, proteínas das subfamílias B e C (ABCB e ABCC, respectivamente) são importantes constituintes de vias de farmacocinética de antirretrovirais. A glicoproteína de permeabilidade (p-gp ou ABCB1, codificada pelo gene *ABCB1*) e o membro 1 da subfamília de proteínas de múltipla resistência a drogas (MRP1 ou ABCC1, codificada pelo gene *ABCC1*) são envolvidas na expulsão de vários IP do ambiente celular e do INTR AZT (Hochman *et al.*, 2001; Colombo *et al.*, 2005; Shaik *et al.*, 2007; Fujimoto *et al.*, 2009; Janneh *et al.*, 2009; Giraud *et al.*, 2010; König *et al.*, 2010; Moss *et al.*, 2011).

O gene *ABCB1* é localizado no braço longo do cromossomo 7 (7q21), possui 28 éxons que codificam para uma proteína de 1280 aminoácidos, a qual se dimeriza para constituir a forma nativa de transporte transmembrana. O gene *ABCC1* é localizado no braço curto do cromossomo 16 (16p13.1), possui 31 éxons e codifica para uma proteína de 1531 aminoácidos (Loo e Clarke, 2008; Muller, 2012).

Ambos os genes são expressos em diversos tecidos de importância na farmacocinética dos antirretrovirais, tais como os intestinos, na barreira hemato-encefálica, fígado e nos rins, visto que a expressão nesses órgãos limitam a absorção, presença dos antirretrovirais em reservatórios do HIV-1 (sistema nervoso central, testículos) e contribuem para sua excreção na bile ou urina. Além disso, *ABCC1* é expresso também em linfócitos, contribuindo para a expulsão dos antirretrovirais das células alvo do vírus (Franke *et al.*, 2010; Kis *et al.*, 2010).

2.2.2.2 Superfamília SLC

A superfamília SLC é composta por mais de 300 proteínas estruturalmente diversas, sendo agrupadas com base em critérios funcionais, isto é, são proteínas de membrana que promovem o transporte facilitado ou passivo de nutrientes, neurotransmissores e medicamentos de acordo com seus gradientes de concentração (Urban *et al.*, 2006; Hoglund *et al.*, 2011).

Entre as diversas famílias de transportadores, as famílias de transportadores de cátions (SLC22) e ânions (SLCO) orgânicos participam do transporte facilitado de INTRs, principalmente AZT e lamivudina (3TC), para o interior das células, sendo SLC22A1 (membro 1 da subfamília A de transportadores de cátions orgânicos) e SLCO3A1 (membro 1 da subfamília A de transportadores de ânions orgânicos) alguns dos participantes em vias de farmacocinética desses antirretrovirais (Jung *et al.*, 2008; Janneh *et al.*, 2009; Minuesa *et al.*, 2009).

O gene *SLC22A1* está localizando no braço longo do cromossomo 6 (6q25.3), possui 11 éxons e codifica para a proteína transmembrana homônima, que contém 554 aminoácidos. Já o *SLCO3A1*, que está localizado no braço longo do cromossomo 15 (15q26) possui 10 éxons que codificam para uma proteína transmembrana de 710 aminácidos (Kent *et al.*, 2002).

Ambos os genes são expressos principalmente nos epitélios intestinais, fígado e rins, contribuindo para a distribuição do AZT e 3TC pelos fluidos corporais, bem como destinando-os para sua eliminação (Jonker e Schinkel, 2004; Kis *et al.*, 2010).

2.2.2.3 Superfamília CYP

Os citocromos P450 envolvem mais de 50 enzimas cujos sítios ativos contêm um grupamento prostético heme. Eles promovem reações de oxidação de vários

compostos endógenos, como ácidos graxos, esteroides e prostaglandinas e exógenos, como vários medicamentos usados na prática clínica. Essas reações fazem com que as drogas sejam biotransformadas em compostos oxidados mais solúveis em água e então passíveis de excreção na urina (Zanger *et al.*, 2008).

Os citocromos são genes muito polimórficos, cada um tendo várias isoformas. Entre elas, o citocromo P450 polipeptídeo 6 da subfamília B da família 2 (CYP2B6) é uma proteína que oxida os INNTR mais usados no tratamento anti-HIV, como por exemplo o efavirenz (EFZ) e a nevirapina (NVP), desativando-os e permitindo sua excreção do organismo (Ward *et al.*, 2003).

O gene *CYP2B6*, assim como todos os citocromos, são expressos principalmente no fígado. Ele apresenta nove éxons que codificam uma proteína de 491 aminoácidos e está localizado no braço longo do cromossomo 19 (19q13.2) (Kent *et al.*, 2002).

A Tabela 2 sumariza as informações acerca das proteínas envolvidas na farmacocinética dos principais antirretrovirais de esquemas iniciais da terapia anti-HIV-1, indicando sobre quais medicamentos elas atuam, bem como órgãos onde são expressos.

Tabela 2. Proteínas de vias farmacocinéticas dos antirretrovirais mais prescritos em esquemas iniciais da terapia anti-HIV-1, bem como seus locais de expressão e referências da literatura.

PROTEÍNAS	ANTIRRETROVIRAIS						LOCAIS DE EXPRESSÃO						REFERÊNCIAS
	AZT INTR	3TC INTR	EFZ INNTR	NVP INNTR	LPV IP	RTV IP	L	I	F	BHE	R	T	
ABCB1	X				X	X	X	X	X	X	X	X	Hochman <i>et al.</i> , 2001 Colombo <i>et al.</i> , 2005 Shaik <i>et al.</i> , 2007 Fujimoto <i>et al.</i> , 2009 Janneh <i>et al.</i> , 2009 Giraud <i>et al.</i> , 2010 König <i>et al.</i> , 2010 Moss <i>et al.</i> , 2011
ABCC1	X				X	X	X	X	X	X	X	X	Colombo <i>et al.</i> , 2005 Janneh <i>et al.</i> , 2009 Giraud <i>et al.</i> , 2010 König <i>et al.</i> , 2010
SLCO3A1			X				X						Janneh <i>et al.</i> , 2009
SLC22A1		X					X						Jung <i>et al.</i> , 2008 Minuesa <i>et al.</i> , 2009
CYP2B6			X	X					X				Ribaudo <i>et al.</i> , 2010
3TC – lamivudina	NVP - nevirapina	INTR – Inibidor análogo a nucleosídeos da transcriptase reversa								L – linfócitos		BHE – barreira hematoencefálica	
AZT – zidovudina	LPV – lopinavir	INNTR – Inibidor não-análogo a nucleosídeo da transcriptase reversa								I – intestinos		R – rins	
EFZ – efavirenz	RTV – ritonavir	IP – inibidor da protease								F – fígado		T – testículos	

2.3 FARMACOGENÉTICA

2.3.1 Histórico

Durante o século XX, vários medicamentos, como antibióticos, anti-hipertensivos, anestésicos chegaram ao mercado. Rapidamente se percebeu que pessoas diferentes recebendo o mesmo tratamento respondiam de formas diferentes. Enquanto para umas o tratamento era efetivo, para outras não havia benefício clínico (Mancinelli *et al.*, 2000).

A década de 1950 foi marcada pelo início de estudos evidenciando que essas diferenças possuíam explicação de acordo com as leis mendelianas de herança. Em 1954, foi descoberto que os efeitos adversos do tuberculostático isoniazida eram causados devido à deficiência em uma enzima n-acetiltransferase. Esse e outros estudos seminais estabeleceram a relação entre genética, bioquímica e farmacologia (Kalow, 2002).

Em 1959, Vogel cunhou a palavra “farmacogenética” para designar essa interação entre os três campos da ciência. Com isso, ela pode ser definida como o estudo da variabilidade genética do indivíduo influencia nas respostas medicamentosas (Mancinelli *et al.*, 2000).

Com o avanço da biologia molecular e sequenciamento do genoma humano, a farmacogenética mudou seu paradigma, passando de um conceito puramente mendeliano (um gene, uma mutação, uma consequência farmacológica) para um conceito mais amplo e multifatorial, com a busca por novos genes e novas variantes genéticas interagindo e influenciando o resultado final da terapia em conjunto. Dessa maneira, a Farmacogenômica possui um grande potencial para permitir a otimização do uso de drogas atualmente em uso, avaliar o uso clínico de fármacos

recém descobertos, bem como servir de diretriz para o desenvolvimento de novos medicamentos (Kalow, 2002; Shah, 2005).

Consequentemente, a farmacogenética é uma área em expansão, abrangendo estudos sobre a variabilidade da ação de drogas usadas para o tratamento de diversas doenças, incluindo, por exemplo, doenças cardiovasculares (Candore *et al.*, 2007), câncer (McWhinney e McLeod, 2009) e infecciosas, como a causada pelo HIV-1 (Mahungu *et al.*, 2009).

2.3.2 Farmacogenética e falha da terapia Anti-HIV

A prescrição dos medicamentos anti-HIV deve ser mantida durante toda a vida do paciente depois de indicada. Um eventual aconselhamento farmacogenético para essa prescrição possuiria uma grande vantagem em potencial de manejo do uso desses medicamentos, como por exemplo, ajustamento de doses, diminuindo a ocorrência ou severidade de efeitos colaterais e toxicidade ou na escolha de terapia inicial para diminuir a possibilidade de falha terapêutica (Telenti e Zanger, 2008).

A falha terapêutica do tratamento anti-HIV-1 não é facilmente definida. Basicamente existem três critérios: imunológico, clínico e virológico. O critério virológico é mais simples e considera que a terapia falhou se não houver supressão da replicação do vírus durante o tratamento, visto que seu objetivo principal é justamente impedir a multiplicação viral (Aldous e Haubrich, 2009). Um dos parâmetros usados para a definição de falha é a carga viral após um ano de tratamento: se não houver supressão (níveis indetectáveis de cópias no plasma sanguíneo, comumente abaixo 50 por mL), considera-se que o paciente está em falha virológica (Princeton, 2003).

Vários fatores podem ser responsáveis pela ocorrência da falha virológica, como a adesão insatisfatória do paciente ao tratamento ou resistência primária do HIV-1, ou seja, o paciente foi infectado com uma linhagem já resistente a drogas antirretrovirais (Brasil. Ministério da Saúde. Secretária de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de DST e Aids, 2008). Evidências apontam que o componente genético do indivíduo também é um forte fator que influencia na resposta ao tratamento antirretroviral e isso vem sendo alvo de investigação de cientistas ao redor do mundo (Telenti e Zanger, 2008)

Dessa forma, polimorfismos comuns de genes envolvidos em vias de farmacocinética de antirretrovirais poderiam estar presentes na população da região metropolitana de Recife e poderiam influenciar o resultado final da terapia anti-HIV, causando falha virológica.

2.4 GENOTIPAGEM DE POLIMORFISMOS DE INTERESSE

2.4.1 Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real

A reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real é uma variação da PCR convencional, na qual é acrescentada uma molécula que quando excitada por um comprimento de onda apropriado, é emite um sinal de fluorescência, que é captado em tempo real por um sistema óptico acoplado ao termociclador. A PCR em tempo real é usada para análises tanto qualitativas (detecção de polimorfismos ou material genético de patógenos em uma amostra, por exemplo) como quantitativas (quantificação de material genético), com a vantagem de não serem necessárias manipulações pós-PCR, evitando contaminações ou perda de amostras (Higuchi *et al.*, 1992).

2.4.2 Tecnologia *TaqMan*

Um dos métodos de detecção de polimorfismos mais usados é a tecnologia das sondas *TaqMan*. Consistem em um par de *primers* e pelo menos um par de sondas. Cada sonda possui duas moléculas acopladas nas regiões 5' e 3' respectivamente: uma fluorescente (*reporter*) e outra que absorve a fluorescência da primeira (*quencher*). Durante a PCR, a sonda hibrida na região do polimorfismo; em seguida, os *primers* se hibridam, flanqueando a sonda. A DNA polimerase *Taq* estende a cadeia a partir dos *primers*, vai de encontro à sonda e a hidrolisa. Assim, a molécula *reporter* fica livre da *quencher* e passa a emitir fluorescência específica para o alelo encontrado naquela região; se houver a emissão de dois tipos de fluorescência (duas sondas hibridaram), a amostra provém de um indivíduo heterozigoto para a região analisada (Holland *et al.*, 1991). A Figura 5 ilustra as propriedades das sondas *TaqMan*.

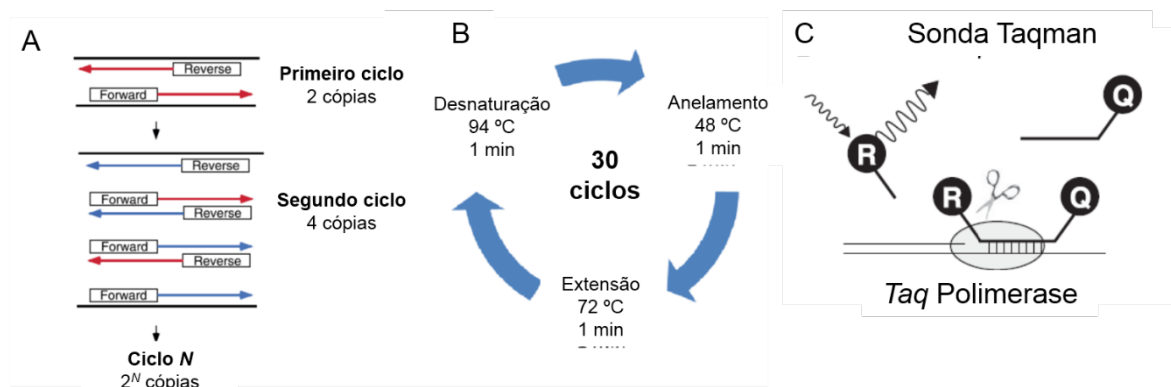


Figura 5. Desenho esquemático da reação em cadeia da polimerase (PCR). (A) Uma região de interesse no genoma é delimitada por oligonucleotídeos (*primers*, denominados *Forward* e *Reverse* acima), é copiada pela DNA polimerase, dobrando seu número a cada ciclo (o número final de produtos é igual a 2^N , em que N é a quantidade de ciclos). (B) Um exemplo de protocolo de PCR com três ciclos: desnaturação, anelamento e extensão. (C) Tecnologia *TaqMan*. As sondas são oligonucleotídeos com duas moléculas ligadas a eles, a reporter (R), que emite fluorescência, e a quencher (Q), que absorve fluorescência. Após a hidrólise da sonda pela DNA polimerase (*Taq*), há a emissão de fluorescência. Duas ou mais sondas, cada uma com uma molécula reporter alelo-específica são usadas em genotipagens de polimorfismos. Figuras (A) e (C) modificadas a partir de Valasek e Repa (2005).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Identificar polimorfismos em genes envolvidos em vias de farmacocinética de medicamentos antirretrovirais que estejam relacionados com a falha ao tratamento.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar se diferentes perfis genéticos estão mais relacionados a falha no tratamento;
- Elaborar um modelo de regressão logística que possa prever a probabilidade de ocorrência de falha na terapia de um paciente.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Desenho do estudo e aspectos éticos

O tipo de estudo escolhido foi o de caso-controle, que é um estudo epidemiológico observacional e retrospectivo, que procura identificar fatores de risco após o surgimento de um determinado resultado clínico, comparando-se duas amostras, uma cujos indivíduos apresentem o resultado clínico e outra cujos indivíduos não apresentem (Schulz e Grimes, 2002).

Os critérios gerais de inclusão para o estudo incluíram: idade entre 18 e 50 anos, tratamento antirretroviral por pelo menos um ano com o mesmo esquema, boa adesão ao tratamento (sem interrupções significativas do tratamento), não possuir histórico de uso de drogas injetáveis e não haver a presença de coinfeções ou doenças sistêmicas crônicas pré-existentes.

Para a inclusão no grupo de casos (falha virológica da terapia), era necessário que o indivíduo apresentasse medição de carga viral detectável (50 ou mais cópias por mL de plasma sanguíneo) após um ano de tratamento (Princeton, 2003).

Dessa forma, 187 pacientes portadores do HIV-1 em atendimento no Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira (IMIP) foram convidados para o estudo. Cada paciente contribuiu com uma amostra de sangue periférico, mediante autorização com um termo de consentimento acompanhado por um questionário de abordagem epidemiológica (Apêndices A e B). O delineamento metodológico do estudo recebeu aprovação prévia do comitê de ética em pesquisa do IMIP (Anexo A).

4.2 População de estudo

Dos 187 pacientes, 160 obtiveram sucesso na terapia, definida como a redução duradoura da carga viral do HIV no sangue para níveis indetectáveis, enquanto 27 se encontraram em falha terapêutica após um ano de terapia.

4.3 Extração de DNA

A extração do DNA genômico foi realizada utilizando-se o *Genomic Prep Blood DNA isolation kit* (método *salting out*), de acordo com as instruções do fabricante (*Promega*).

4.4 Variáveis Estudadas

4.4.1 Variáveis clínicas e epidemiológicas

As variáveis de contexto epidemiológico e clínico selecionadas para a análise incluem aquelas que são possivelmente influentes no resultado final de um tratamento terapêutico: sexo, idade, etnia, massa no início do tratamento, carga viral e contagem de células T CD4+ pré-tratamento.

4.4.2 Polimorfismos em genes candidatos

Os genes e polimorfismos candidatos foram selecionados através de busca na literatura e por critérios funcionais. Foram escolhidos sete polimorfismos em cinco genes que codificam para proteínas envolvidas na metabolização e transporte através da membrana dos medicamentos usados na primeira linha terapêutica anti-HIV: rs3842 (4036A>G; 3'-UTR) e rs1045642 (3435C>T, sinônima: Ile1145=) em *ABCB1*, rs212091 (T>C; 3'-UTR) em rs3743527 (C>T, 3'-UTR) em *ABCC1*, rs3745274 (516G>T, não-sinônimo: Gln172His) em *CYP2B6*, rs628031 (1222A>G, não-sinônimo: Met408Val) em *SLC22A1* e rs1517618 (882G>C, não-sinônimo: Glu294Asp) em *SLCO3A1*.

4.5 Genotipagem

Todos os SNPs foram genotipados com a tecnologia de sondas *TaqMan* na plataforma de PCR em tempo real ABI 7500 (*Applied Biosystems*), com o protocolo: desnaturação inicial a 95 °C por 10 min, seguida por 35 ciclos de amplificação (desnaturação a 95 °C por 15 s e anelamento/extensão a 60 °C por 1 min).

4.6 Análises estatísticas

O Teste t de Welch foi usado para avaliar se determinados valores as variáveis clínicas pré-tratamento (idade e massa corporal, carga viral e contagem de células T CD4+) estariam associados com a posterior falha terapêutica.

O Teste exato de Fisher e de Cochran-Armitage foram usados para testar a associação das variáveis genéticas com a ocorrência de falha virológica. Para esse teste, os pacientes foram estratificados de acordo com o esquema terapêutico recebido, ou seja, contendo um NNRTI ou contendo um IP em conjunto com os INTR *backbone*.

Pacientes recebendo esquemas com IP foram incluídos em testes de associação para os SNPs dos genes *ABCB1* e *ABCC1*, pois esses genes codificam proteínas que atuam sobre IPs, mas exercem pouca influência sobre os INNTR (Janneh et al., 2009). Da mesma forma, pacientes em tratamento com esquemas contendo INNTRs foram incluídos para análises de associação com os genes *CYP2B6* e *SLCO3A1*, já que as proteínas correspondentes não metabolizam ou transportam IPs (Ribaud et al., 2010).

Para as análises envolvendo o gene *SLC22A1* não foi necessária esse tipo de estratificação, visto que a proteína homônima transporta a 3TC, um INTR, que está presente em todos os esquemas dos pacientes da amostra.

As variáveis de importância clínica ou cujos testes tiveram um *p-value* menor do que 0,20 foram selecionadas para inclusão na análise de regressão logística. Todas as análises estatísticas foram realizadas com o programa R, versão 2.15.1 (R Development Core Team 2010, 2010). O modelo de regressão logística serviu para explicar o risco de falha virológica, baseando-se em fatores genéticos, quando controlados pelas variáveis clínicas expostas anteriormente (ver Apêndice C).

A aderência do modelo foi verificada com o teste de le Cessie-van Houwelingen-Copas-Hosmer.

5. RESULTADOS

5.1 Análises das variáveis epidemiológicas e clínicas

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas para as variáveis clínicas (idade e massa corporal no início do tratamento, carga viral e contagem de células T CD4+ pré-tratamento) quando comparou-se os dois grupos (Tabela 3), pois possuíam perfis clínicos pré-tratamento semelhantes.

Tabela 3. Testes de associação (variáveis clínicas), medidas de associação e p-valores resultantes (Teste T de Welch).

Variável	Média±DP		Teste t	p
	Falha n=27	Sucesso n=160		
Idade no Início do Tratamento (anos)*	31,8±9,3	30,9±6,8	-0,51	0,62*
Massa corporal no início do tratamento (kg)*	67,9±14,5	61,8±12,6	2,04	0,05*
Carga viral pré-tratamento (log10 cópias/mL de plasma)*	4,8±0,8	4,6±0,9	-1,41	0,17*
Contagem de Células CD4+ pré- tratamento (células/μL de sangue)*	260,5±154	235,5±118,4	-0,80	0,43*

*Variáveis incluídas na análise por regressão logística

Inicialmente, o sexo masculino esteve significativamente associado à ocorrência de falha terapêutica (OR=2,82, IC de 95%=1,13-7,10, p=0,02), mas a significância estatística foi perdida após a estratificação de acordo com os esquemas iniciais recebidos pelos pacientes. Igualmente, a etnia não se mostrou

associada com a ocorrência de falha virológica, mesmo após as estratificações (Tabela 4 a seguir).

Tabela 4. Testes de associação (variáveis epidemiológicas), estratificações por esquema terapêutico recebido, medidas de associação e p-valores resultantes (Teste Exato de Fisher).

Variável		Falha	Sucesso	Medida de Associação OR [IC de 95%]	p
Sexo*	Masculino	14 (51,9%)	44 (27,5%)	2,82 [1,13-7,10]	0,02
	Feminino	13 (48,1%)	116 (72,5%)		
	Total	27	160		
Sexo (INNTR)	Masculino	9 (69,2%)	57 (65,5%)	1,18 [0,30-5,70]	1,00
	Feminino	4 (30,8%)	30 (34,5%)		
	Total	13	87		
Sexo (IP)	Masculino	5 (35,7%)	14 (19,2%)	2,31 [0,53-9,25]	0,18
	Feminino	9 (64,3%)	59 (80,8%)		
	Total	14	73		
Etnia*	Branca	11 (40,7)	54 (33,8)	1,35 [0,52-3,34]	0,52
	Afrodescendente	16 (59,3)	106 (66,2)		
	Total	27	160		
Etnia (INNTR)	Branca	8 (61,5%)	50 (57,5%)	1,18 [0,31-4,98]	1,00
	Afrodescendente	5 (38,5%)	37 (42,5%)		
	Total	13	87		
Etnia (IP)	Branca	8 (57,1%)	56 (76,7%)	0,41 [0,11-1,64]	0,18
	Afrodescendente	6 (42,9%)	17 (23,3%)		
	Total	14	73		

*Variáveis pré-selecionadas para compor o modelo de regressão logística.

INNTR – Inibidor análogo a nucleosídeos da transcriptase reversa

INNTR – Inibidor não-análogo a nucleosídeos da transcriptase reversa

IP – inibidor da protease

OR - razão de chances

IC de 95% - intervalo de confiança de 95%

5.2 Frequências alélicas e genotípicas do gene *ABCB1*

As frequências observadas dos genótipos do *ABCB1* estiveram em conformidade com o Princípio de Hardy-Weinberg. Após as estratificações de acordo com o esquema terapêutico contendo IPs, o alelo G do polimorfismo 4036A>G (rs3842) não se apresentou associado com a presença de falha virológica, tendo frequência de 21,4% nos pacientes em falha, contra 14,4% nos controles saudáveis, diferença estatisticamente não significativa ($p=0,39$).

Já o alelo T do polimorfismo 3435C>T (rs1045642) esteve marginalmente associado com a falha virológica, apresentando frequência de 53,6% nos casos e 32,2% entre os controles (OR=2,42, IC de 95%=0.99-6.02; $p=0,05$).

Uma reanálise com o teste de Cochran-Armitage mostrou que o alelo T poderia exercer um efeito dominante para contribuir com o risco de falha virológica ($T=2,01$, $p=0,04$). Genótipos contendo esse alelo (C/T ou T/T) estiveram mais frequentes nos casos em comparação com os controles: 78,6% contra 49,3%, respectivamente.

As frequências alélicas e genotípicas para todos os loci, bem como as medidas de associação (OR, IC de 95%) e seus p-values correspondentes estão sumarizados na Tabela 5.

Tabela 5. Frequências alélicas e genotípicas do gene *ABCB1*, testes de associação (teste exato de Fisher) com a ocorrência de falha virológica após estratificação por esquema terapêutico contendo IPs.

SNPs	Alelos	Frequências		OR [IC de 95%]	p
	Minoritários e Genótipos	Falha n=14 (%)	Sucesso n=73 (%)		
rs3842	G	6/28 (21,4)	21/146 (14,4)	1,62 [0,48–4,79]	0,39
	A/A	9 (64,3)	54 (74,0)		
	A/G	4 (28,6)	17 (23,3)	-	0,42
	G/G	1 (7,1)	2 (2,7)		
rs1045642*	T	15/28 (53,6)	47/146 (32,2)	2,42 [0,99-6,02]	0,05
	C/C	3 (21,4)	37 (50,7)		
	C/T	7 (50,0)	25 (34,2)	-	0,09
	T/T	4 (28,6)	11 (15,1)		

*Polimorfismo selecionado para inclusão na análise de regressão logística.

OR - razão de chances

IC de 95% - intervalo de confiança de 95%

5.3 Frequências alélicas e genotípicas do gene *ABCC1*

Todas as frequências do *ABCC1* estiveram em conformidade com o princípio de Hardy-Weinberg. Não houve diferenças significativas das frequências do alelo T do polimorfismo 197248C>T (rs3743527) entre os grupos de estudo (14,3% nos casos contra 18,5% nos controles, OR=0,74, IC de 95%=0,17-2,40; p=0,74) nem dos genótipos (p=1,00).

Foi observada uma associação estatisticamente significante entre o alelo C do polimorfismo 198217T>C (rs212091) com a ocorrência de falha virológica de esquemas antirretrovirais contendo IPs (OR=4,41, IC de 95%=1,39-13,53; p=0,01). O resultado do teste de Cochran-Armitage demonstra que esse alelo teria um efeito dominante, ou seja, a presença de pelo menos um alelo C no genótipo estaria

relacionada com risco para a falha virológica. (T=2,40, p=0,02). Genótipos com o alelo C (T/C ou C/C) estiveram mais frequentes nos casos em comparação com os controles: 42,9% contra 15,1% (Tabela 6).

Tabela 6. Frequências alélicas e genotípicas do gene *ABCC1*, testes de associação (teste exato de Fisher) com a ocorrência de falha virológica após estratificação por esquema terapêutico contendo IPs.

SNPs	Alelos Minoritários e Genótipos	Frequências		OR [IC de 95%]	p
		Falha n=14 (%)	Sucesso n=73 (%)		
rs212091*	C	8/28 (28,6)	12/146 (8,2)	4,41 [1,39-13,53]	0,01
	T/T	8 (57,1)	62 (84,9)	-	0,02
	T/C	4 (28,6)	10 (13,7)		
	C/C	2 (14,3)	1 (1,4)		
rs3743527	T	4/28 (14,3)	27/146 (18,5)	0,74 [0,17-2,40]	0,74
	C/C	10 (71,4)	50 (68,5)	-	1,00
	C/T	4 (28,6)	19 (26,0)		
	T/T	0 (0,0)	4 (5,5)		

*Polimorfismo selecionado para inclusão na análise de regressão logística.

OR - razão de chances

IC de 95% - intervalo de confiança de 95%

5.4 Frequências alélicas e genotípicas do gene *CYP2B6*

Após a estratificação de acordo com os esquemas contendo INNTR, não houve diferenças estatisticamente significativas das frequências alélicas ou genotípicas do polimorfismo não-sinônimo 516G>T (Gln172His, rs3745274). Todas as frequências estiveram de acordo com o princípio de Hardy-Weinberg e estão sumarizadas na Tabela 7.

Tabela 7. Frequência alélica e genotípica do gene *CYP2B6*, testes de associação (teste exato de Fisher) com a ocorrência de falha virológica após estratificação por esquema terapêutico contendo INNTRs.

SNP	Alelos	Frequências		OR [IC de 95%]	p
	Minoritários e Genótipos	Falha n=13 (%)	Sucesso n=87 (%)		
rs3745274	T	6/26 (23,1)	54/174 (31,0)	0,67 [0,21-1,85]	0,50
	G/G	8 (61,5)	41 (47,1)		
	G/T	4 (30,8)	38 (43,7)	-	0,75
	T/T	1 (7,7)	8 (9,2)		

OR - razão de chances

IC de 95% - intervalo de confiança de 95%

5.5 Frequências alélicas e genotípicas do gene *SLC22A1*

Não houve desvios das frequências alélicas em relação ao equilíbrio de Hardy-Weinberg. Não foram observadas diferenças significativas entre as frequências do SNP não-sinônimo 1222A>G (Met408Val, rs628031) entre os grupos de estudo (Tabela 8).

Tabela 8. Frequência alélica e genotípica do gene *SLC22A1*, testes de associação (teste exato de Fisher) com a ocorrência de falha virológica.

SNP	Alelos	Frequências		OR [IC de 95%]	p
	Minoritários e Genótipos	Falha n=27 (%)	Sucesso n=160 (%)		
rs628031	A	15/54 (27,8)	96/320 (30,0)	0,90 [0,44-1,76]	0,87
	G/G	14 (51,9)	79 (49,4)		
	G/A	11 (40,7)	66 (41,3)	-	1,00
	A/A	2 (7,4)	15 (9,3)		

OR - razão de chances

IC de 95% - intervalo de confiança de 95%

5.6 Frequências alélicas e genotípicas do gene *SLCO3A1*

Mesmo após análise estratificada de acordo com esquemas contendo INNTR, não foi observada associação entre o polimorfismo não-sinônimo 882G>C (Glu294Asp, rs1517618), como observado na Tabela 9. Todas as frequências não diferiram significativamente do esperado pelo princípio de Hardy-Weinberg.

Tabela 9. Frequência alélica e genotípica do gene *SLCO3A1*, testes de associação (teste exato de Fisher) com a ocorrência de falha virológica após estratificação por esquema terapêutico contendo INNTRs.

SNP	Alelos	Frequências		OR [IC de 95%]	p
	Minoritários e Genótipos	Falha n=13 (%)	Sucesso n=87 (%)		
rs1517618	G	2/26 (7,7)	22/174 (12,6)	0,58 [0,06-2,61]	0,75
	C/C	11 (84,6)	68 (78,2)		
	C/G	2 (15,4)	16 (18,4)	-	1,00
	G/G	0 (0,0)	3 (3,4)		

OR - razão de chances

IC de 95% - intervalo de confiança de 95%

5.7 Regressão logística

Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada quando se comparou fatores clínicos e epidemiológicos dos dois grupos. Entretanto, devido à importância fisiológica do sexo, raça, idade e massa corporal no início do tratamento, foram incluídas no modelo de regressão logística junto com os genótipos de *ABCB1* e *ABCC1*. Para essa análise, foram incluídos apenas pacientes que receberam esquemas anti-HIV que continham inibidores de protease (n=87, 14 casos e 73 controles), já que não observamos associação significativa dos outros genes e polimorfismos com a ocorrência de falha terapêutica.

Os resultados da regressão logística mantiveram a associação significativa dos SNPs rs1045642 (*ABCB1*) e rs212091 (*ABCC1*) com a falha virológica. De acordo com o modelo, a presença dos genótipos C/T ou T/T do rs1045642 (*ABCB1*) estaria associada com risco cinco vezes maior de falha virológica de um esquema contendo inibidor de protease, embora tenha sido uma tendência estatística (OR=5,01; IC de 95%=1,04-24,23; $p=0,045$).

Os genótipos T/C ou C/C do SNP rs212091 (*ABCC1*) estiveram significativamente associados com um risco mais de seis vezes maior para falha terapêutica de um esquema contendo inibidor de protease (OR=6,50; IC de 95%=1,33-31,81, $p=0,02$).

Tomando como exemplo um indivíduo hipotético e típico da amostra do presente estudo (uma mulher negra de 30 anos com 70 kg de massa corporal), o *log-odds* predito pelo modelo é de -2,1067, quando não há genótipos de risco para ambos os genes. Isso significa que as chances de falha virológica é equivalente a $\exp(-2,1067)=0,1216$, o que equivale a uma chance 88% menor de falha virológica. Mas se essa mesma pessoa tivesse genótipos de risco para ambos os genes, cálculos similares mostrariam que as chances de falha virológica seriam quase quatro vezes maior (*odds*=3,96).

A validação interna do modelo (ou seja, a medição de quão bem o modelo explica os dados) indicou que o teste possuía boa aderência ($z=0,80$, $p=0,43$) e revelou que a área sob a curva (AUC), um parâmetro que leva em conta a sensibilidade e especificidade do modelo, foi de 0,82 ($p<0,001$), o que em teoria significa dizer que o modelo conseguiria diferenciar corretamente um paciente em risco de falha de um paciente com sucesso na terapia em 82% das vezes.

A Tabela 10 a seguir sumariza as variáveis incluídas no modelo, bem como medidas estatísticas relacionadas.

Tabela 10. Coeficientes estimados, razão de chances (*odds ratio*) relacionadas, intervalos de 95% de confiança e p-valores do modelo com melhor aderência para explicar a ocorrência de falha virológica de esquema antirretrovirais de primeira linha contendo inibidores de protease (n=87).

Variável	Estimativa	OR [IC de 95%]	p
Idade	0,0716	1,0742 [0,9761 - 1,1822]	0,1427
Massa corporal	0,0428	1,0437 [0,9928 - 1,0973]	0,0938
Etnia	1,2773	3,5870 [0,8495 - 15,1463]	0,0822
Sexo	0,0152	1,0153 [0,1664 - 6,1945]	0,9868
Genótipos rs1045642 (<i>ABCB1</i>)*	1,6114	5,0096 [1,0358 - 24,2293]	0,0451
Genótipos rs212091 (<i>ABCC1</i>)*	1,8710	6,4947 [1,3259 - 31,8137]	0,0210
Intercepto	-8,5290	-	0,0019

*Modelo dominante

6. DISCUSSÃO

Foram analisados sete polimorfismos em cinco genes candidatos (*ABCB1*, *ABCC1*, *CYP2B6*, *SLC22A1* e *SLCO3A1*), selecionados de acordo com critérios funcionais, quando controlados com fatores clínicos e epidemiológicos em uma análise de regressão logística.

Levando em consideração dados clínicos como sexo, idade e massa corporal, os resultados do presente estudo apoiam resultados anteriores, isto é, que teriam pouca influência na determinação do resultado da terapia. Homens e mulheres de fato possuem composições corporais distintas. Com exceção de ocorrência de efeitos adversos, a evidência disponível não indica significativas diferenças relacionadas ao sexo do resultado da terapia, e essa é a razão pela qual esquemas terapêuticos de antirretrovirais não são diferenciados de acordo com o sexo do indivíduo (Floridia *et al.*, 2008).

Manrique *et al.* (2010) investigaram um grupo de idosos diagnosticados com infecção pelo HIV acima dos 50 anos, que então iniciaram a terapia. Os resultados apontaram que eles tiveram excelentes respostas virológicas e imunológicas, mesmo com a idade avançada.

O mesmo pode ser dito sobre fatores raciais. Estudos *in vitro* mostram que a raça tem pouca influência no resultado da terapia e na concentração de drogas em tecidos (Paintsil *et al.*, 2011). O estudo de Mugavero *et al.* (2009) em uma população dos EUA acompanhou pacientes para tentar entender o quão a raça influenciaria nas diferentes respostas ao tratamento, e observaram que diferenças atribuídas a raças na realidade podem ser devido a características socioeconômicas das diferentes parcelas da sociedade americana.

O SNP *missense* rs3745274 em *CYP2B6* causa uma diminuição na função da enzima P450 e já foi associado a concentrações plasmáticas maiores do antirretroviral efavirenz (Gatanaga *et al.*, 2007). No entanto, nossos resultados não apontaram um papel nesse SNP na falha terapêutica de terapia anti-HIV de primeira linha, embora possa estar mais relacionado com efeitos adversos da terapia, o que não foi analisado no presente estudo (Tsuchiya *et al.*, 2004).

Dois novos genes candidatos foram selecionados para estudos de associação farmacogenética: *SLC22A1* e *SLCO3A1*. Esses genes codificam para proteínas transportadoras de cátions e ânions orgânicos, respectivamente, e contribuem para o transporte de NRTIs através das membranas celulares (Purcet *et al.*, 2006; Janneh *et al.*, 2009). No entanto, nenhuma influência desses polimorfismos foi detectada sobre a ocorrência de falha terapêutica.

De uma maneira geral, foi observado que polimorfismos em genes de proteínas transportadoras de inibidores de protease estiveram associados com a ocorrência de falha virológica. Um estudo anterior reportou uma associação entre o genótipo C/C do SNP rs1045642 (3435C>T) no gene *ABCB1*. Este genótipo vem sendo relacionado a maiores níveis de transcrição do gene (Brumme *et al.*, 2003).

No entanto, o presente estudo encontrou uma associação do genótipo T/T com a falha virológica, mas não com o C/C. Fellay *et al.* (2002) reportaram que o genótipo T/T estaria relacionado a baixa transcrição do gene *ABCB1* e portanto, baixa produção de proteína. Interessantemente, os autores observaram que os níveis plasmáticos do IP nelfinavir em indivíduos portando o genótipo T/T eram baixos. Os autores então formularam uma hipótese para explicar essa observação: a baixa expressão de *ABCB1* seria compensada pela super-expressão de outros transportadores ou enzimas da superfamília CYP450. Isso levaria a uma maior

eliminação dos substratos dessas proteínas (IPs, nesse caso). Dessa forma, mais estudos são necessários para melhor entender a relação dos polimorfismos do gene *ABCB1* com a resposta ao tratamento antirretroviral.

O presente estudo reporta pela primeira vez a associação do polimorfismo rs212091 no gene *ABCC1* com a falha virológica da terapia anti-HIV-1 de primeira linha. Esse polimorfismo está localizado na região 3' não traduzida do gene, que é expresso em tecidos linfoides e expulsa do ambiente intracelular os inibidores de protease mais usados na prática clínica, lopinavir e ritonavir (Giraud et al., 2010). Possivelmente, esse polimorfismo poderia influenciar na conformação do RNAm ou sua estabilidade, o que afetaria os níveis de proteína expressas. As análises apontam para um efeito dominante do alelo C, então ele poderia estar relacionado com níveis maiores da proteína *ABCC1*, o que poderia resultar numa concentração intracelular reduzida dos inibidores de protease.

Em resumo, os presentes resultados apontam que a presença de genótipos de risco dos genes *ABCB1* (contendo o alelo A) e *ABCC1* (contendo o alelo T), juntos ou independentemente, estão associados com uma menor probabilidade de sucesso terapêutico (supressão da replicação do HIV-1). É possível que esses polimorfismos afetem a atividade proteica ou sua expressão, contribuindo para um efluxo ainda maior dos inibidores de protease, o que resultaria em concentrações intracelulares subótimas nas células-alvo, reduzindo a eficácia do tratamento.

A análise de regressão logística obtida poderia ser utilizada para ajudar a prever, com base em fatores genéticos, quais pacientes teriam um risco maior de sofrer falha virológica durante o tratamento com esquemas antirretrovirais de primeira linha. Com isso, os médicos poderiam personalizar esquemas terapêuticos (escolhendo outra classe de antirretrovirais em vez dos inibidores de protease,

ajustar doses, checando mais atentamente a adesão do paciente ao tratamento, etc).

Evidentemente, mais estudos são necessários, principalmente para validar os resultados obtidos, preferencialmente com outros grupos de pacientes. Além disso, novos genes e suas variantes que atuem no resultado final da terapia poderiam ser incluídos no modelo de regressão logística, o que refinaria seu poder preditivo.

Uma limitação do nosso estudo está relacionada com informações ausentes sobre o status de resistência primária do HIV-1 nos pacientes recrutados, devido a duas razões (1) o desenho do estudo foi retrospectivo e (2) diretrizes de saúde pública nacionais geralmente não recomendam genotipagem do HIV-1 pré-tratamento, visto que no Brasil ainda há baixa prevalência de cepas virais resistentes (Soares *et al.*, 2004; Brasil. Ministério da Saúde. Secretária de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de DST e Aids, 2008).

7. CONCLUSÃO

- 1- Das variáveis analisadas, os genótipos dos polimorfismos rs1045642 (*ABCB1*) e rs212091 (*ABCC1*) foram as mais importantes para a predição da falha terapêutica, confirmando resultados obtidos anteriormente por outros pesquisadores.
- 2- Não houve evidência de que polimorfismos em *CYP2B6* e *SLC22A1* possuam influência sobre o resultado da terapia.
- 3- Um modelo de regressão logística para explicar e prever a ocorrência de falha terapêutica através de componentes epidemiológicos e clínicos foi elaborado, e seu poder discriminatório foi estimado em 82%.

REFERÊNCIAS

Aldous JL e Haubrich RH (2009) Defining treatment failure in resource-rich settings. *Current opinion in HIV and AIDS* 4:459-466.

Alves S, D'avila S, de Freitas MA, Freitas C, Pascom ARP, Pereira GF, Pinto ÂP, da Silva FVN e Ravasi G (2012). Progress Report on the Brazilian Response to HIV/AIDS. Brasil, Departamento de DST-AIDS e Hepatites Virais: 125.

Balding DJ (2006) A tutorial on statistical methods for population association studies. *Nat Rev Genet* 7:781-791.

Barre-Sinoussi F, Chermann J, Rey F, Nugeyre M, Chamaret S, Gruest J, Dauguet C, Axler-Blin C, Vezinet-Brun F, Rouzioux C, *et al.* (1983) Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 220:868-871.

Borst P e Elferink RO (2002) Mammalian ABC transporters in health and disease. *Annu Rev Biochem* 71:537-592.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretária de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de DST e Aids (2008) Recomendações para Terapia Anti-retroviral em Adultos Infectados pelo HIV: 2008. 7ª edição. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Programa Nacional de DST e Aids, Brasília: Ministério da Saúde, 136 p.

Brumme ZL, Dong WW, Chan KJ, Hogg RS, Montaner JS, O'Shaughnessy MV e Harrigan PR (2003) Influence of polymorphisms within the CX3CR1 and MDR-1 genes on initial antiretroviral therapy response. *AIDS* 17:201-208.

Candore G, Balistreri CR, Caruso M, Grimaldi MP, Incalcaterra E, Listi F, Vasto S e Caruso C (2007) Pharmacogenomics: a tool to prevent and cure coronary heart disease. *Current Pharmaceutical Design* 13:3726-3734.

Center for Disease Control (1981) *Pneumocystis Pneumonia* - Los Angeles. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 31:1-3.

Center for Disease Control (1982a) Current Trends Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS): Precautions for Clinical and Laboratory Staffs. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 31:577-580.

Center for Disease Control (1982b) *Epidemiologic Notes and Reports Pneumocystis carinii Pneumonia among Persons with Hemophilia A* *Morbidity and Mortality Weekly Report* 31:365-367.

Center for Disease Control (1983) Current Trends Prevention of Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS): Report of Inter-Agency Recommendations *Morbidity and Mortality Weekly Report* 32:101-103.

Colombo S, Soranzo N, Rotger M, Sprenger R, Bleiber G, Furrer H, Buclin T, Goldstein D, Décosterd L, Telenti A, *et al.* (2005) Influence of ABCB1, ABCC1,

ABCC2, and ABCG2 haplotypes on the cellular exposure of nelfinavir in vivo. *Pharmacogenetics and Genomics* 15:599-608.

Cressey TR e Lallemand M (2007) Pharmacogenetics of antiretroviral drugs for the treatment of HIV-infected patients: an update. *Infect Genet Evol* 7:333-342.

De Cock KM, Jaffe HW e Curran JW (2011) Reflections on 30 years of AIDS. *Emerg Infect Dis* 17:1044-1048.

Fanales-Belasio E, Raimondo M, Suligoi B e Butto S (2010) HIV virology and pathogenetic mechanisms of infection: a brief overview. *Ann Ist Super Sanita* 46:5-14.

Fellay J, Marzolini C, Meaden ER, Back DJ, Buclin T, Chave JP, Decosterd LA, Furrer H, Opravil M, Pantaleo G, et al. (2002) Response to antiretroviral treatment in HIV-1-infected individuals with allelic variants of the multidrug resistance transporter 1: a pharmacogenetics study. *Lancet* 359:30-36.

Floridia M, Giuliano M, Palmisano L e Vella S (2008) Gender differences in the treatment of HIV infection. *Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society* 58:173-182.

Franke RM, Gardner ER e Sparreboom A (2010) Pharmacogenetics of drug transporters. *Curr Pharm Des* 16:220-230.

Fujimoto H, Higuchi M, Watanabe H, Koh Y, Ghosh AK, Mitsuya H, Tanoue N, Hamada A e Saito H (2009) P-Glycoprotein Mediates Efflux Transport of Darunavir in Human Intestinal Caco-2 and ABCB1 Gene-Transfected Renal LLC-PK1 Cell Lines. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 32:1588-1593.

Gallo RC, Sarin PS, Gelmann EP, Robert-Guroff M, Richardson E, Kalyanaraman VS, Mann D, Sidhu GD, Stahl RE, Zolla-Pazner S, *et al.* (1983) Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 220:865-867.

Gatanaga H, Hayashida T, Tsuchiya K, Yoshino M, Kuwahara T, Tsukada H, Fujimoto K, Sato I, Ueda M, Horiba M, *et al.* (2007) Successful efavirenz dose reduction in HIV type 1-infected individuals with cytochrome P450 2B6 *6 and *26. *Clin Infect Dis* 45:1230-1237.

Gilbert MTP, Rambaut A, Wlasiuk G, Spira TJ, Pitchenik AE e Worobey M (2007) The emergence of HIV/AIDS in the Americas and beyond. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104:18566-18570.

Giraud C, Manceau S e Treluyer J-M (2010) ABC transporters in human lymphocytes: expression, activity and role, modulating factors and consequences for antiretroviral therapies. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* 6:571-589.

Hammer SM, Katzenstein DA, Hughes MD, Gundacker H, Schooley RT, Haubrich RH, Henry WK, Lederman MM, Phair JP, Niu M, *et al.* (1996) A Trial Comparing Nucleoside Monotherapy with Combination Therapy in HIV-Infected Adults with CD4 Cell Counts from 200 to 500 per Cubic Millimeter. *New England Journal of Medicine* 335:1081-1090.

Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS e Griffith R (1992) Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N Y)* 10:413-417.

HIV Sequence Compendium 2012 (2011). Theoretical Biology and Biophysics Group, Los Alamos, New Mexico, 450 p.

Hochman JH, Chiba M, Yamazaki M, Tang C e Lin JH (2001) P-glycoprotein-Mediated Efflux of Indinavir Metabolites in Caco-2 Cells Expressing Cytochrome P450 3A4. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 298:323-330.

Hoglund PJ, Nordstrom KJ, Schioth HB e Fredriksson R (2011) The solute carrier families have a remarkably long evolutionary history with the majority of the human families present before divergence of Bilaterian species. *Mol Biol Evol* 28:1531-1541.

Holland PM, Abramson RD, Watson R e Gelfand DH (1991) Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:7276-7280.

Hosmer DW e Lemeshow S (2000) Applied logistic regression. 2ª edª edição. Wiley, New York.

Hutchinson JF (2001) The Biology and Evolution of HIV. Annual Review of Anthropology 30:85-108.

Ingelman-Sundberg M, Sim SC, Gomez A e Rodriguez-Antona C (2007) Influence of cytochrome P450 polymorphisms on drug therapies: pharmacogenetic, pharmacoeypigenetic and clinical aspects. Pharmacol Ther 116:496-526.

Janneh O, Anwar T, Jungbauer C, Kopp S, Khoo SH, Back DJ e Chiba P (2009) P-glycoprotein, multidrug resistance-associated proteins and human organic anion transporting polypeptide influence the intracellular accumulation of atazanavir. Antiviral therapy 14:965-974.

Jonker JW e Schinkel AH (2004) Pharmacological and Physiological Functions of the Polyspecific Organic Cation Transporters: OCT1, 2, and 3 (SLC22A1-3). Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 308:2-9.

Jung N, Lehmann C, Rubbert A, Knispel M, Hartmann P, van Lunzen J, Stellbrink H-J, Faetkenheuer G e Taubert D (2008) Relevance of the Organic Cation Transporters 1 and 2 for Antiretroviral Drug Therapy in Human Immunodeficiency Virus Infection. Drug Metabolism and Disposition 36:1616-1623.

Kalow W (2002) Pharmacogenetics and personalised medicine. *Fundam Clin Pharmacol* 16:337-342.

Kent WJ, Sugnet CW, Furey TS, Roskin KM, Pringle TH, Zahler AM e Haussler D (2002) The human genome browser at UCSC. *Genome Res* 12:996-1006.

Kilmarx PH (2009) Global epidemiology of HIV. *Current opinion in HIV and AIDS* 4:240-246.

Kis O, Robillard K, Chan GNY e Bendayan R (2010) The complexities of antiretroviral drug-drug interactions: role of ABC and SLC transporters. *Trends in Pharmacological Sciences* 31:22-35.

König SK, Herzog M, Theile D, Zembruski N, Haefeli WE e Weiss J (2010) Impact of drug transporters on cellular resistance towards saquinavir and darunavir. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 65:2319-2328.

Loo TW e Clarke DM (2008) Mutational analysis of ABC proteins. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 476:51-64.

Mahungu TW, Johnson MA, Owen A e Back DJ (2009) The impact of pharmacogenetics on HIV therapy. *Int J STD AIDS* 20:145-151.

Mancinelli L, Cronin M e Sadee W (2000) Pharmacogenomics: the promise of personalized medicine. *AAPS PharmSci* 2:E4.

Manrique L, Aziz M e Adeyemi OM (2010) Successful Immunologic and Virologic Outcomes in Elderly HIV-Infected Patients. JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes 54:332-333 310.1097/QAI.1090b1013e3181d1092eef1091.

McWhinney SR e McLeod HL (2009) Using germline genotype in cancer pharmacogenetic studies. Pharmacogenomics 10:489-493.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. (2010). "Quais são os antirretrovirais." Acesso em 23 dez. 2010, <<http://www.aids.gov.br/pagina/quais-sao-os-antirretrovirais>>.

Ministério da Saúde (2012) Boletim Epidemiológico - Aids e DST. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. Ano VIII, nº 1, Brasília, DF, 164 p.

Minuesa G, Volk C, Molina-Arcas M, Gorboulev V, Erkizia I, Arndt P, Clotet B, Pastor-Anglada M, Koepsell H e Martinez-Picado J (2009) Transport of Lamivudine [(-)- β -l-2',3'-Dideoxy-3'-thiacytidine] and High-Affinity Interaction of Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors with Human Organic Cation Transporters 1, 2, and 3. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 329:252-261.

Moss DM, Kwan WS, Liptrott NJ, Smith DL, Siccardi M, Khoo SH, Back DJ e Owen A (2011) Raltegravir Is a Substrate for SLC22A6: a Putative Mechanism for the Interaction between Raltegravir and Tenofovir. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 55:879-887.

Mugavero MJ, Lin H-Y, Allison JJ, Giordano TP, Willig JH, Raper JL, Wray NP, Cole SR, Schumacher JE, Davies S, *et al.* (2009) Racial Disparities in HIV Virologic Failure: Do Missed Visits Matter? *JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes* 50:100-108 110.1097/QAI.1090b1013e31818d31815c31837.

Muller M. (2012). "48 Human ATP-Binding Cassette Transporters." Acesso em 15 nov 2012,<<http://www.nutrigene.4t.com/humanabc.htm>>.

Paintsil E, Dutschman GE, Hu R, Grill SP, Wang C-J, Lam W, Li F-Y, Ghebremichael M, Northrup V e Cheng Y-C (2011) Determinants of Individual Variation in Intracellular Accumulation of Anti-HIV Nucleoside Analog Metabolites. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55:895-903.

Princeton DC (2003) *Manual of HIV/AIDS therapy. Current Clinical Strategies* Publishing.

Purcet S, Minuesa G, Molina-Arcas M, Erkizia I, Casado FJ, Clotet B, Martinez-Picado J e Pastor-Anglada M (2006) 3'-Azido-2',3'-dideoxythymidine (zidovudine) uptake mechanisms in T lymphocytes. *Antiviral therapy* 11:803-811.

R Development Core Team 2010. (2010). "**R**: A language and environment for statistical computing." Acesso em 18 jun. 2010,<<http://www.r-project.org/>>.

Ribaldo HJ, Liu H, Schwab M, Schaeffeler E, Eichelbaum M, Motsinger-Reif AA, Ritchie MD, Zanger UM, Acosta EP, Morse GD, *et al.* (2010) Effect of CYP2B6,

ABCB1, and CYP3A5 Polymorphisms on Efavirenz Pharmacokinetics and Treatment Response: An AIDS Clinical Trials Group Study. *Journal of Infectious Diseases* 202:717-722.

Schulz KF e Grimes DA (2002) Case-control studies: research in reverse. *Lancet* 359:431-434.

Shah RR (2005) Pharmacogenetics in drug regulation: promise, potential and pitfalls. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 360:1617-1638.

Shaik N, Giri N, Pan G e Elmquist WF (2007) P-glycoprotein-Mediated Active Efflux of the Anti-HIV1 Nucleoside Abacavir Limits Cellular Accumulation and Brain Distribution. *Drug Metabolism and Disposition* 35:2076-2085.

Sleasman JW e Goodenow MM (2003) 13. HIV-1 infection. *J Allergy Clin Immunol* 111:S582-592.

Soares MA, Brindeiro RM e Tanuri A (2004) Primary HIV-1 drug resistance in Brazil. *AIDS* 18 Suppl 3:S9-13.

Tang MW e Shafer RW (2012) HIV-1 Antiretroviral Resistance: Scientific Principles and Clinical Applications. *Drugs* 72.

Telenti A e Zanger UM (2008) Pharmacogenetics of anti-HIV drugs. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 48:227-256.

Tsuchiya K, Gatanaga H, Tachikawa N, Teruya K, Kikuchi Y, Yoshino M, Kuwahara T, Shirasaka T, Kimura S e Oka S (2004) Homozygous CYP2B6 *6 (Q172H and K262R) correlates with high plasma efavirenz concentrations in HIV-1 patients treated with standard efavirenz-containing regimens. *Biochem Biophys Res Commun* 319:1322-1326.

UNAIDS (2010) Global report: UNAIDS report on the global AIDS epidemic 2010. UNAIDS, Geneva.

Urban TJ, Sebro R, Hurowitz EH, Leabman MK, Badagnani I, Lagpacan LL, Risch N e Giacomini KM (2006) Functional genomics of membrane transporters in human populations. *Genome Res* 16:223-230.

Valasek MA e Repa JJ (2005) The power of real-time PCR. *Adv Physiol Educ* 29:151-159.

Vella S, Schwartlander B, Sow SP, Eholie SP e Murphy RL (2012) The history of antiretroviral therapy and of its implementation in resource-limited areas of the world. *AIDS* 26:1231-1241.

Votteler J e Schubert U (2008) Human Immunodeficiency Viruses: Molecular Biology. In: Mahy BWJ e Van Regenmortel HV (EE.) *Encyclopedia of Virology*. Elsevier Science & Technology Books, p 517-525.

Ward BA, Gorski JC, Jones DR, Hall SD, Flockhart DA e Desta Z (2003) The Cytochrome P450 2B6 (CYP2B6) Is the Main Catalyst of Efavirenz Primary and Secondary Metabolism: Implication for HIV/AIDS Therapy and Utility of Efavirenz as a Substrate Marker of CYP2B6 Catalytic Activity. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 306:287-300.

Watts JM, Dang KK, Gorelick RJ, Leonard CW, Bess Jr JW, Swanstrom R, Burch CL e Weeks KM (2009) Architecture and secondary structure of an entire HIV-1 RNA genome. *Nature* 460:711-716.

Zanger UM, Turpeinen M, Klein K e Schwab M (2008) Functional pharmacogenetics/genomics of human cytochromes P450 involved in drug biotransformation. *Anal Bioanal Chem* 392:1093-1108.

APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título da pesquisa: Polimorfismos em Genes de Vias de Metabolização e Transporte de Drogas e Terapia Antirretroviral Contra o HIV.

Pesquisador responsável

Antonio Victor Campos Coelho
Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade
Universitária, Recife, PE. CEP: 50670-
901. Telefone: 2101-2542
avccbio@gmail.com

Comitê de Ética em Pesquisa

Rua dos Coelhos, 300, Boa Vista,
Recife, PE. CEP: 50070-550.
Telefone: 2122-4756
comitedeetica@imip.org.br

Convidamos você a participar da pesquisa que estamos realizando sobre diferenças genéticas envolvidas no resultado final da terapia contra o HIV.

Em algumas pessoas o remédio contra o HIV não tem o efeito esperado, que é impedir que o vírus se multiplique. Outras pessoas apresentam efeitos não esperados (adversos) durante o tratamento.

Estamos fazendo essa pesquisa para tentar descobrir se as pessoas que não respondem bem ao tratamento apresentam diferenças genéticas que expliquem porque isso acontece. Essa pesquisa terá como benefício a geração de conhecimento que poderá contribuir para que, no futuro, os médicos melhorem os tratamentos contra o HIV. No fim da pesquisa, você receberá um protocolo resumindo os resultados do trabalho.

Com sua autorização, gostaríamos de utilizar uma pequena quantidade do seu sangue (um total de 4 mL) que será colhido hoje nos exames de rotina de acompanhamento do seu tratamento. Pedimos também a sua autorização para usar na pesquisa dados como idade, sexo e resultados dos seus últimos exames.

Informamos que você não sofrerá prejuízo algum. Os riscos que você poderá sofrer são apenas sintomas provocados pela coleta do sangue, como vermelhidão e dor no braço no local da coleta. Além disso, todas as suas informações pessoais estarão seguras. Nenhuma pessoa fora da pesquisa terá acesso a elas.

Você não terá nenhum problema caso não queira participar ou desistir dessa pesquisa. Asseguramos que você vai continuar a receber o mesmo atendimento que sempre recebeu neste hospital. Caso você tenha alguma dúvida, por favor, entre em contato com os responsáveis pela pesquisa.

Eu, _____
 (nome completo) compreendi as informações repassadas e autorizo que seja realizada a avaliação genética a partir da amostra de sangue coletada, e concordo que os dados obtidos sejam utilizados para pesquisa. Declaro que fui informado(a) pela equipe do pesquisador sobre os objetivos do e estou consciente de que:

1. Concordei em participar da pesquisa sem nenhum tipo de pressão;
2. Posso a qualquer momento entrar em contato por telefone com o pesquisador se tiver dúvida sobre a pesquisa;
3. Posso a qualquer momento desistir da pesquisa e não vou ter problemas no atendimento do hospital por causa disso;
4. O pesquisador poderá ter acesso ao meu prontuário e que minhas informações pessoais serão mantidas em sigilo;
5. Recebi uma cópia deste documento.

Data de Nascimento	Nº da Identidade	Nº do Prontuário
Assinatura do Voluntário		
Assinatura da Testemunha	Assinatura da Testemunha	
Assinatura do Pesquisador Responsável		

APÊNDICE B – QUESTIONÁRIO CLÍNICO

1. Dados Pessoais (apenas para identificação, não serão divulgados)

Nome do Paciente			Data de Nascimento	
Nome da Mãe				
Número do RG	Data do 1º Atendimento	Naturalidade		
Peso (em kg)	Altura (em m)	Sexo		
		M ()	F ()	
Endereço				
			Nº	
Bairro		Cidade	CEP	
Telefone		Nível de Escolaridade (anos de estudo)		
O paciente se considera de qual etnia (segundo classificação do IBGE)?				
<input type="checkbox"/> Branca	<input type="checkbox"/> Parda	<input type="checkbox"/> Amarela		
<input type="checkbox"/> Negra	<input type="checkbox"/> Indígena	<input type="checkbox"/> Não informado		

2. Infecção pelo HIV e fatores de risco

Modo de transmissão			
<input type="checkbox"/> Transmissão vertical	<input type="checkbox"/> Relações sexuais heterossexuais		
<input type="checkbox"/> Relações sexuais homossexuais	<input type="checkbox"/> Transfusão sanguínea		
<input type="checkbox"/> Durante tratamento para hemofilia	<input type="checkbox"/> Acidente com material biológico (seroconversão até 6 meses)		
<input type="checkbox"/> Uso de drogas injetáveis	<input type="checkbox"/> Ignorado		
Qual o ano em que o paciente descobriu que tem o HIV?			
Se a paciente for mulher, ela está atualmente grávida?			
SIM ()	NÃO ()	Mês de gestação:	
O paciente tem relações com um parceiro sabidamente HIV+?			
SIM ()	NÃO ()	IGNORADO ()	
O paciente é usuário de drogas injetáveis?			
SIM ()		NÃO ()	

3. Tratamento Anti-HIV

Desde qual data o indivíduo recebe medicamentos anti-HIV?					
O indivíduo está no primeiro esquema anti-HIV?					
SIM ()			NÃO ()		
Se não, quantas vezes houve mudança de esquema?					
Indique o(s) Esquema(s) terapêutico(s)					
Esquema			Remédio	Doses diárias	
1	2	3			
			Abacavir (ABC)	comp. de 300 mg ()	sol. oral 20 mg/ml ()
			Amprenavir (APV)	sol. oral 15 mg/ml ()	
			Atazanavir (ATV)	cáps. de 200 mg ()	150 mg () 300 mg ()
			Darunavir (DRV)	comp. de 300 mg ()	
			Didanosina (ddI)	cáps. de 250 mg ()	400 mg () sol. oral 10 mg/ml ()
			Efavirenz (EFZ)	comp. de 600 mg ()	cáps. de 400 mg () sol. oral 10 mg/ml ()
			Enfuvirtida (T20)	frascos-ampola de 90 mg/ml ()	
			Estavudina (d4T)	cáps. 30 mg ()	sol. oral 1 mg/ml ()
			Fosamprenavir (FPV)	comp. de 700 mg ()	
			Indinavir (IDV)	cáps. de 400 mg ()	
			Lamivudina (3TC)	comp. de 150 mg ()	sol. 10 mg/ml ()
			Lopinavir/ritonavir (LPV/r)	comp. 200 mg + 50 mg ()	sol. oral 80 mg/ml + 20 mg/ml ()
			Nevirapina (NVP)	comp. de 200 mg ()	susp. oral 10 mg/ml ()
			Raltegravir (RAL)	comp. de 400 mg ()	
			Ritonavir (RTV)	cáps. de 100 mg ()	
			Saquinavir (SQV)	cáps. de 200 mg ()	
			Tenofovir (TDF)	comp. de 300 mg ()	
			AZT+3TC	comp. de 300 mg + 150 mg ()	
			Zidovudina (AZT)	cáps. de 100 mg ()	sol. oral 10 mg/ml () sol. injetável 10 mg/ml ()
A mudança do esquema foi devido a falha terapêutica?				SIM ()	NÃO ()
A mudança do esquema foi devido a efeitos adversos?				SIM ()	NÃO ()
Informar os sintomas sentidos que levaram à mudança do esquema:					
() alta de açúcar no sangue			() icterícia		
() anemia			() infarto		
() aumento no colesterol			() insônia		
() cansaço			() lipodistrofia		
() mal estar			() mal estar		
() diarreia			() problemas nos nervos (formigamento, dormência)		
() dificuldade de concentração			() problemas no fígado		
() dor abdominal			() problemas nos rins		
() dor de cabeça			() reação alérgica		
() dor de estômago			() sonolência		
() dor de garganta			() tontura		
() enjoo			() tosse		
() erupção cutânea			() vômitos		
() falta de ar					
O indivíduo tem uma boa aderência ao tratamento?					
SIM ()		NÃO ()		NÃO INFORMADO ()	

4. Comorbidades

O indivíduo apresenta alguma doença pré-existente?		
SIM ()	NÃO ()	IGNORADO ()
Se sim, indique:	O paciente toma alguma medicação para tratar dessa doença?	
Diabetes ()		
Doença autoimune ()		
Hepatite ()		
Hipertensão ()		
Tuberculose ()		
Outras (explique)		
O indivíduo é fumante?		
SIM ()	NÃO ()	
O indivíduo bebe?		
SIM ()	NÃO ()	

5. Infecções Oportunistas

O paciente apresentou alguma infecção oportunista ANTES de iniciar o tratamento?	SIM ()	NÃO ()
O paciente apresentou alguma infecção oportunista DURANTE o tratamento?	SIM ()	NÃO ()
Indique quais foram: (assinale com A para ANTES e D para DURANTE)		
() Tuberculose disseminada/extra-pulmonar/não cavitária	() Candidíase oral	
() Candidíase de traqueia, brônquios ou pulmão	() Candidíase do esôfago	
() Tuberculose pulmonar cavitária ou não especificada	() Herpes zoster	
() Herpes simples	() Disfunção do SNC	
() Diarreia por 1 mês ou mais	() Febre >38 °C por 1 mês ou mais*	
() Perda de peso >10%*	() Fadiga ("moleza")*	
() Dermatite persistente	() Anemia e/ou linfocitopenia e/ou trombocitopenia	
() Tosse persistente ou pneumonia*	() Íngua por 1 mês ou mais	
() Câncer cervical invasivo (HPV)	() Pneumonia por <i>Pneumocystis carinii</i>	
() Toxoplasmose	*não causadas por tuberculose	
Medicamentos para Infecções Oportunistas		
Esquema	Remédio	Dosagens
1 2 3		
	Aciclovir	comp. de 200 mg () FA de 250 mg ()
	Acetato de Caspofungina	FA de 50 mg ()
	Ácido fólico	comp. de 15 mg () Ácido fólico
	Anfotericina B	FA de 50 mg ()
	Azitromicina	comp. de 500 mg () Azitromicina
	Ciprofloxacina	comp. de 500 mg () Ciprofloxacina
	Cetoconazol	comp. de 200 mg ()
	Claritromicina	comp. de 500 mg ()
	Clindamicina	comp. de 300 mg ()
	Espiramicina	comp. de 1,5 mui ()

Medicamentos para Infecções Oportunistas (continuação)						
Esquema			Remédio	Dosagens		
1	2	3				
			Ganciclovir	comp. de 250 mg ()	FA de 500 mg ()	
			Itraconazol	cáps. de 100 mg ()		
			Pantamioina	FA de 300 mg ()		
			Pirimetamina	comp. de 25 mg ()		
			Pravastatina	comp. de 20 mg ()		
			Respigard II	()		
			Sulfadiazina	comp. de 500 mg ()		
			Sulfamet. + trimet.	comp. de 400/80 mg ()	susp. 400/80 mg/6 ml ()	

6. Acompanhamento do Tratamento anti-HIV

DATA	CARGA VIRAL	CD4+	CD8+	CD45+			

APÊNDICE C – CONCEITOS DE REGRESSÃO LOGÍSTICA

A regressão logística é uma técnica estatística aplicável em situações em que se deseja explicar uma variável resposta do tipo dicotômica (ou binária), ou seja, com apenas dois valores possíveis.

Dessa forma, é um método bastante adequado para análises de epidemiologia, que muitas vezes se detém em entender em situações semelhantes às descritas, como por exemplo, tentar determinar quais fatores estão relacionados ao desenvolvimento de determinada doença.

Estudos de associação genética (EAG) são um bom exemplo onde a regressão logística pode ser aplicada, pois para esse tipo de metodologia é necessário que variantes genéticas sejam selecionadas para então avaliar se elas possuem influência no surgimento da doença ou fenótipo sob observação.

Os desenhos de estudo mais comumente presentes em EAG são os de caso controle ou de coortes. No primeiro tipo, indivíduos são selecionados com base em seu *status* clínico e então possíveis fatores de risco (no nosso exemplo, polimorfismos genéticos e outros fatores) são identificados retrospectivamente. No segundo tipo, os indivíduos são recrutados antes do aparecimento do *status* clínico e os fatores de risco são então identificados prospectivamente.

Seguindo o recrutamento amostral e coleta de dados, os indivíduos são agrupados em tabelas de contingência de acordo com seu *status* (casos ou controles, presença ou ausência de uma doença, por exemplo) e com a exposição aos fatores de risco (alelos ou genótipos).

A tabela de contingência mais simples é a 2 x 2, em que se avalia se um fator de exposição dicotômico está associado com um fenótipo também dicotômico,

ou seja, se a presença do fator está associada com o aparecimento da doença. Isso é facilmente determinado pelo cálculo da razão de chances (*odds ratio*, OR) em estudos de caso-controle ou do risco relativo (RR), no caso do estudo de coortes.

A OR e o RR medem o quanto um fator está associado a um *status* clínico. Uma OR igual a um indica que o fator de interesse está igualmente presente em ambos os grupos de estudo, e portanto ele não está associado com a presença da doença. Se, no entanto, a OR obtida for maior que um, significa que a presença do fator está mais presente nos casos, e portanto está associada com suscetibilidade à doença. Similarmente, se for menor que um, então o fator protege contra o aparecimento do fenótipo clínico.

Geralmente, além dos dados genéticos, dados clínicos e/ou epidemiológicos são também coletados com o objetivo de ajustar a análise, de forma a assegurar que as eventuais associações detectadas sejam de fato relevantes, e não espúrias. Isso é uma das vantagens da regressão logística, visto que essa técnica é capaz de lidar com diversas variáveis simultaneamente, fornecendo OR ajustadas.

A regressão logística pode ser representada pela fórmula

$$y = \frac{e^{\alpha + \beta x}}{1 + e^{\alpha + \beta x}},$$

Em que y representa a probabilidade de ocorrer a doença dado os valores das variáveis x . Como y é binária, podemos representar que ela assume como valores 0 (ausência de doença) ou 1 (presença de doença).

No entanto, os valores de x podem assumir diversos valores, pois são nossas variáveis em estudo, que podem incluir: genótipos (variáveis categóricas), idade em anos (variável numérica discreta), massa corporal (variável numérica

contínua), etc. Dessa forma, o formato do segundo termo da equação permite que y possa assumir valores entre 0 e 1 (probabilidades).

Outra propriedade da regressão logística são os parâmetros que acompanham o valor de cada variável x , os betas. Existem tantos betas quanto forem as variáveis incluídas na regressão. O beta representa o quanto uma mudança de unidade na variável que o acompanha contribui para o risco de desenvolvimento da doença. O outro parâmetro é o alfa, que representa o risco inicial de desenvolver a doença independentemente das outras variáveis.

Valores de beta positivos sinalizam que a variável contribui para o desenvolvimento da doença, enquanto valores negativos significam que o fator em questão protege contra a doença.

A regressão logística consiste em justamente estimar esses parâmetros por meio de máxima verossimilhança e testar a hipótese de que eles são estatisticamente diferentes de zero (o que implica em dizer que eles de fato contribuem para o desenvolvimento do fenótipo clínico).

Os parâmetros podem ser interpretados da seguinte forma: se compararmos duas pessoas com valores idênticos das variáveis x , exceto por uma, saberemos exatamente quanto essa variável influencia no risco de ocorrência de doença, por meio do beta que a acompanha.

Após estimados os valores de beta, devemos verificar se eles têm importância no modelo, ou seja, se a variável contribui significativamente para o risco do desenvolvimento do *status* clínico em observação. O princípio dessa verificação é comparar modelos incluindo a variável com modelos sem incluí-la. Essa comparação pode ser feita por duas propriedades da regressão, a desviância (D) e o critério de informação de Akaike (*Akaike information criterion*, AIC).

A D recebe esse nome pois mede a diferença (desvio) entre a verossimilhança (L) entre dois modelos e pode ser calculada pela fórmula:

$$D = -2 \ln \left(\frac{L_{\text{modelo}}}{L_{\text{modelo saturado}}} \right)$$

Primeiramente assumimos que o “modelo saturado” explicaria perfeitamente o risco e portanto sua verossimilhança é igual a um ($L=1$), simplificando a equação acima para

$$D = -2 \ln(L_{\text{modelo}})$$

Dessa forma, podemos usar a D como um critério de qualidade das variáveis incluídas. Quanto menor for a D , melhor o modelo se aproxima do “modelo saturado” hipotético.

O mesmo conceito se aplica ao AIC:

$$AIC = 2k - 2 \ln(L),$$

em que k representa o número de parâmetros em análise (os betas) e L a verossimilhança do modelo em análise. Ele mede o quanto de informação é perdida em comparação a um modelo saturado hipotético. Portanto, quanto menor o AIC, melhor seria o modelo.

Após a seleção do modelo final com a ajuda da D e do AIC, é necessário que seja verificado se o modelo descreve corretamente o risco baseando-se nas observações usadas para gerar o modelo (aderência), o que é feito com o teste de le Cessie-van Houwelingen-Copas-Hosmer (para esse teste um p-valor acima do nível de significância adotado indica que a aderência do modelo é adequada).

Caso o modelo apresente uma aderência adequada, os parâmetros estimados podem então ser usados para interpretar o risco de ocorrência da doença com base nas variáveis incluídas.

A primeira propriedade da regressão logística usada para isso é o fato de que podemos obter ORs ajustadas para uma variável em questão por meio de seu beta:

$$OR = e^{\beta},$$

em que e representa a base do logaritmo natural (aproximadamente 2,71828).

A segunda propriedade permite calcular a probabilidade de ocorrência da doença (ver a primeira fórmula) ou uma razão que expressa quantas vezes o risco individual é aumentado ou diminuído face às variáveis presentes (*odds*), a partir da transformação logística da primeira fórmula:

$$\text{logit}(y) = \ln\left(\frac{y}{1-y}\right) = \alpha + \beta x$$

Em que o termo $\left(\frac{y}{1-y}\right)$ representa a *odds*, ou seja, a razão entre as probabilidade de ocorrer a doença (y) sobre a de não ocorrer a doença ($1-y$), dado os valores de x . Se a *odds* resultar em um número maior que 1, significa que os valores de x provenientes daquele indivíduo conferiram suscetibilidade à doença. Caso contrário (valores menores que 1), indicam que ele está protegido contra a doença.

LEITURAS RECOMENDADAS

Balding DJ (2006) A tutorial on statistical methods for population association studies. Nat Rev Genet 7:781-791.

Hosmer DW e Lemeshow S (2000) Applied logistic regression. 2ª edª edição. Wiley, New York.

ANEXO A – PARECER DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

Instituto de Medicina Integral
Prof. Fernando Figueira
Escola de Pós-graduação em Saúde Materno Infantil
Instituição Civil Filantrópica



DECLARAÇÃO

Declaro que o projeto de pesquisa nº 2273 – 11 intitulado **“Polimorfismos em genes de vias de Metabolização e Transporte de Drogas e terapia Antirretroviral contra o HIV - 1.”** apresentado pelo (a) pesquisador (a) **Antonio Victor Campos Coelho** foi **APROVADO** pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira – IMIP, em reunião de 11 de maio de 2011.

Recife, 12 de maio de 2011


Dr. José Eulálio Cabral Filho
Coordenador do Comitê de Ética
em Pesquisa em Seres Humanos do

Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira (IMIP)

CURRICULUM VITAE

Antonio Victor Campos Coelho

Curriculum Vitae

Dados pessoais

Nome Antonio Victor Campos Coelho
Filiação Wilma Arruda Campos Coelho
Nascimento 13/07/1989 - Recife/PE - Brasil
Carteira de Identidade 7664224 SDS - PE - 29/10/2012
CPF 075.763.894-51

Formação acadêmica/titulação

2011 Mestrado em Genética.
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
Título: Polimorfismos em Genes de Vias de Metabolização e Transporte de Drogas e Terapia Antirretroviral contra o HIV
Orientador: Sergio Crovella
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

2007 - 2010 Graduação em Ciências Biológicas - Bacharelado.
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
Título: Polimorfismos da Lectina Ligadora de Manose (MBL) e Serino-protease Associada (MASP2) e Infecção pelo Vírus T-linfotrópico Humano Tipo 1 (HTLV-1)
Orientador: Sergio Crovella

Formação complementar

2009 - 2009 Curso de curta duração em Epigenetics and Cancer.
Sociedade Brasileira de Genética, SBG, Ribeirao Preto, Brasil

2008 - 2008 Curso de curta duração em Identificação e Caracterização da Função Gênica em.
Universidade Federal Rural de Pernambuco, UFRPE, Recife, Brasil

2008 - 2008 Curso de curta duração em Genômica do câncer na medicina personalizada.
Sociedade Brasileira de Genética, SBG, Ribeirao Preto, Brasil

2008 - 2008 Curso de curta duração em Applied Biosystems: Muito além do Genoma.
Life Technologies , LIFE TEC, Sao Paulo, Brasil

2008 - 2008 Curso de curta duração em Entre Bytes, Células e Informações.
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil

2008 - 2008 Curso de curta duração em 5oCurso Sensibilização/Informação em Biossegurança.
Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães, CPQAM, Brasil

Produção

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. Sandrin-Garcia, Paula, Brandão, Lucas André Cavalcanti, **Coelho, Antônio Victor Campos**, Guimarães, Rafael Lima, Pancoto, João Alexandre Três, Segat, Ludovica, Donadi, Eduardo Antônio, de Lima-Filho, José Luiz, Crovella, Sergio

Mannose binding lectin gene (MBL2) functional polymorphisms are associated with systemic lupus erythematosus in southern Brazilians. Human Immunology. , v.72, p.516 - 521, 2011.

2. Schreiber, R., **Campos-Coelho, A. V.**, Brandão, L., Guimarães, R. L., KAMADA, A. J., Ferreira-Sae, M. C., Matos-Souza, J. R., Cipolli, J. A., de Lima-Filho, J. L., CROVELLA, S., Nadruz, W.

Mannose-binding lectin (MBL2) polymorphisms and inflammation in hypertensive patients. International Journal of Immunogenetics (Print). , v.38, p.525 - 527, 2011.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. KAMADA, A. J., CARVALHO, M. S. Z. M. G., **COELHO, A. V. C.**, CROVELLA, S.

Distribuição de Polimorfismos de Base Única (SNPs) nos genes NALP1 e NALP3 em pacientes coinfectados HIV-TB In: XIX Encontro de Genética do Nordeste, 2012, Pólo Petrolina PE /Juazeiro BA.

XIX Encontro de Genética do Nordeste. , 2012.

2. SILVA, R. C., **Coelho, Antônio Victor Campos**, SERAFIM-SILVA, S. P., BRANDAO, L. A. C., CROVELLA, S.

HLA-G 14-pb del/ins polymorphism is not associated with heterosexual HIV-1 infection susceptibility in Recife population In: XIX Encontro de Genética do Nordeste, 2012, Pólo Petrolina PE /Juazeiro BA.

XIX Encontro de Genética do Nordeste. , 2012.

3. LOUREIRO, P., ARRUDA, B., RIBEIRO, P., VEIGA, R., BRANDAO, L. A. C., GUIMARAES, R. L., SOUZA, P. R. E., **COELHO, A. V. C.**, BEZERRA, A. C., GOMES, Y. M.

A TRANSMISSÃO FAMILIAR DO HTLV-1 EM PERNAMBUCO, BRASIL In: XI SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE HTLV, 2011, Recife, PE.

XI SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE HTLV. , 2011.

4. KAMADA, A. J., **Campos-Coelho, A. V.**, BRANDAO, L. A. C., GUIMARAES, R. L., CROVELLA, S.

ARE IL18 GENETIC POLYMORPHISMS INVOLVED IN SUSCEPTIBILITY TO HTLV-I INFECTION? In: XI SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE HTLV NO BRASIL, 2011, Olinda.

XI SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE HTLV NO BRASIL - ANAIS. , 2011.

5. BEZERRA, A. C., SOUZA, P. R. E., LOUREIRO, P., RODRIGUES, L., **Coelho, Antônio Victor Campos**, SILVA, J. L. A., QUEIROZ, N. M. O. B., SAMPAIO, D. A., COELHO, M. R. C. D.

CLASSIFICAÇÃO DA SEQUÊNCIA TAX DO VÍRUS LINFOTRÓPICO DE CÉLULAS T HUMANAS DO TIPO 1 (HTLV-1) EM PORTADORES ASSINTOMÁTICOS E PACIENTES COM PARAPARESIA ESPÁSTICA TROPICAL / MIELOPATIA ASSOCIADA AO HTLV-1 In: XI SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE HTLV, 2011, Recife, PE.

XI SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE HTLV. , 2011.

6. BRANDAO, L. A. C., **Campos-Coelho, A. V.**, KAMADA, A. J., GUIMARAES, R. L., SOUZA, P. R. E., CROVELLA, S.

GENETIC HOST FACTORS IN HTLV-1 INFECTION In: XI SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE HTLV NO BRASIL, 2011, Olinda.

XI SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE HTLV NO BRASIL - ANAIS. , 2011.

7. SILVA, R. C., **Campos-Coelho, A. V.**, BRANDAO, L. A. C., CROVELLA, S.

SNP (RS735240) IN DC-SIGN GENE IS NOT INVOLVED WITH HTLV-1 INFECTION SUSCEPTIBILITY IN RECIFE POPULATION, BRAZIL In: XI SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE HTLV NO BRASIL, 2011, Olinda.

XI SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE HTLV NO BRASIL - ANAIS. , 2011.

8. KAMADA, A. J., **CAMPOS, A.V.**, BRANDAO, L. A. C., Guimarães, R. L., LOUREIRO, P., ARRAES, L. C., Crovella, Sergio

Polimorfismos do Gene da Beta-Defensina 1 na Susceptibilidade à Infecção pelo HTLV-1 In: 56º Congresso Brasileiro de Genética, 2010, Guarujá, SP.

56º Congresso Brasileiro de Genética. , 2010.

9. KAMADA, A. J., **CAMPOS, A.V.**, BRANDAO, L. A. C., GUIMARAES, R. L., SOUZA, P. R. E., ARRAES, L. C., LIMA-FILHO, J.L., CROVELLA, S., SEGAT, L.

Correlation Between DEFB104 Gene Polymorphisms and HIV-1 Vertical Transmission in Brazilian Children In: XXXVIII Reunião Anual da SBBq, 2009, Águas de Lindóia.

XXXVIII Annual Meeting of SBBq. , 2009.

10. CEZAR, N. J. B., LYRA, R., BALBINO, V. Q., SILVA, R. S., MARANHÃO, R. M. A., KAMADA, A. J., **COELHO, A. V. C.**, MAURICIO-DA-SILVA, L.

Detecção das mutações do gene TCF7L2 relacionadas com Diabetes Mellitus tipo II no distrito de Jericó, Triunfo, Pernambuco In: 55º Congresso Brasileiro de Genética, 2009, Águas de Lindóia.

Resumos do 55º Congresso Brasileiro de Genética. , 2009.

11. KAMADA, A. J., PONTILLO, A., **CAMPOS, A.V.**, BRANDAO, L. A. C., GUIMARAES, R. L., ARAUJO, J., CROVELLA, S.

NALP3 gene polymorphism involved in type 1 diabetes mellitus In: 55º Congresso Brasileiro de Genética, 2009, Águas de Lindóia.

Resumos do 55º Congresso Brasileiro de Genética. , 2009.

12. SERAFIM-SILVA, S. P., **COELHO, A. V. C.**, BRANDAO, L. A. C., GUIMARAES, R. L., PONTILLO, A., CROVELLA, S.

Polimorfismos do gene NALP1 não apresentam associação com diabetes tipo 1 em população do nordeste brasileiro In: 55º Congresso Brasileiro de Genética, 2009, Águas de Lindóia.

Resumos do 55º Congresso Brasileiro de Genética. , 2009.

13. **CAMPOS, A.V.**, KAMADA, A. J., BRANDAO, L. A. C., GUIMARAES, R. L., LOUREIRO, P., SOUZA, P. R. E., CROVELLA, S., ARRAES, L. C.

Polimorfismos Funcionais do Gene MBL2 e Susceptibilidade à Infecção pelo HTLV-1 In: 55º Congresso Brasileiro de Genética, 2009, Águas de Lindóia.

Resumos do 55º Congresso Brasileiro de Genética. , 2009.

14. **CAMPOS, A.V.**, KAMADA, A. J., BRANDAO, L. A. C., GUIMARAES, R. L., CROVELLA, S., ARRAES, L. C., SOUZA, P. R. E., LIMA-FILHO, J.L., SEGAT, L.

Polymorphisms of Lactoferrin Gene and Susceptibility to Vertical Transmission of HIV In: XXXVIII Annual Meeting of SBBq, 2009, Águas de Lindóia.

XXXVIII Annual Meeting of SBBq. , 2009.

15. MARANHÃO, R. M. A., LYRA, R., BALBINO, V. Q., SILVA, R. S., CEZAR, N. J. B., NEVES, C. A., **COELHO, A. V. C.**, MAURICIO-DA-SILVA, L.

SNPs do gene TFC7L2 relacionadas com Diabetes Mellitus tipo II no distrito de Canaã, Triunfo, Pernambuco In: 55º Congresso Brasileiro de Genética, 2009, Águas de Lindóia.

Resumos do 55º Congresso Brasileiro de Genética. , 2009.

16. COELHO, A. V. C., KAMADA, A. J., CARVALHO, J. R. L., RODRIGUES, F. F., CARRERA, M. C., ZANIN, V., BRANDAO, L. A. C., GUIMARAES, R. L., SOUZA, P. R. E., CROVELLA, S., ARRAES, L. C.

AUMENTO DA SUSCEPTIBILIDADE À DERMATITE ATÓPICA DEVIDO A POLIMORFISMO GÊNICO DA BETA-DEFENSINA 1 In: 54º Congresso Brasileiro de Genética, 2008, Salvador.

Resumos do 54º Congresso Brasileiro de Genética. , 2008. p.139 -

17. COELHO, A. V. C., ANTUNES, M.M.C., SILVA, G.P., KAMADA, A. J., CARVALHO, J. R. L., RODRIGUES, F. F., ZANIN, V., BRANDAO, L. A. C., GUIMARAES, R. L., SOUZA, P. R. E., ARRAES, L. C., CROVELLA, S.

MBL2 POLYMORPHISMS AND SUSCEPTIBILITY TO CELIAC DISEASE In: IV Jornada de Iniciação Científica do LIKA, 2008, Recife.

IV Jornada de Iniciação Científica do LIKA. , 2008.