



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

MARCELA VIEIRA FREIRE

**RESISTÊNCIA SECUNDÁRIA AOS ANTIRRETROVIRAIS E PERFIL GENOTÍPICO
VIRAL EM PESSOAS VIVENDO COM HIV/AIDS NO ESTADO DE PERNAMBUCO
NO PERÍODO DE 2010 A 2015**

RECIFE
2018

MARCELA VIEIRA FREIRE

**RESISTÊNCIA SECUNDÁRIA AOS ANTIRRETROVIRAIS E PERFIL GENOTÍPICO
VIRAL EM PESSOAS VIVENDO COM HIV/AIDS NO ESTADO DE PERNAMBUCO
NO PERÍODO DE 2010 A 2015**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, para obtenção do título de mestre em Medicina Tropical.

Área de concentração: Medicina Tropical

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª Vera Magalhães da Silveira

Co-orientadora: Prof^ª. Dr^ª Ana Maria Salustiano Cavalcanti

Recife

2018

Catálogo na Fonte
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

F866r Freire, Marcela Vieira.
Resistência secundária aos antirretrovirais e perfil genotípico viral em
pessoas vivendo com HIV/AIDS no estado de Pernambuco no período de
2010 a 2015 / Marcela Vieira Freire. – 2018.
79 f.: il.; tab.; quad.; gráf.; 30 cm.

Orientadora: Vera Magalhães da Silveira.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco,
CCS. Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical. Recife, 2018.

Inclui referências, apêndices e anexos.

1. HIV. 2. Resistência a medicamentos. 3. Antirretrovirais. 4.
Síndrome de imunodeficiência adquirida. I. Silveira, Vera Magalhães da
(Orientadora). II. Título.

616.9792 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2018-273)

MARCELA VIEIRA FREIRE

**RESISTÊNCIA SECUNDÁRIA AOS ANTIRRETROVIRAIS E PERFIL GENOTÍPICO
VIRAL EM PESSOAS VIVENDO COM HIV/AIDS NO ESTADO DE PERNAMBUCO
NO PERÍODO DE 2010 A 2015**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestra em Medicina Tropical.

Aprovada em 27/02/2018

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Vláudia Maria Assis Costa (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Prof. Dr. Carlos Roberto Weber Sobrinho (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Prof^a. Dr^a. Cláudia Fernanda de Lacerda Vidal (Examinadora Externa)
Hospital das Clínicas (HC/UFPE)

Às pessoas que vivem com HIV/Aids que cotidianamente resistem à discriminação, especialmente às/aos pacientes do SAE Amélia de Pontes e SAE Jaboatão, por me concederem a honra de conhecer sua vida e me fazerem aprender a cada dia.

AGRADECIMENTOS

Essa pesquisa nasce da necessidade de conhecer mais profundamente a temida resistência secundária aos antirretrovirais que diariamente causa sofrimento às pessoas que vivem com HIV/Aids. Embora a cansativa elaboração do trabalho científico e os muros da academia por vezes nos façam esquecer o verdadeiro motivo de estar debruçada em artigos, números e planilhas, meu compromisso com a saúde do povo brasileiro me lembra a cada dia o que me impulsiona nessa jornada. Expresso aqui meus agradecimentos às pessoas que contribuíram decisivamente para que pudesse concluir esse estudo.

Inicialmente, agradeço à minha mãe Maria Durce e ao meu pai Marcelus pelo amor e pela compreensão; por cada passo que me ensinaram, por sonharem com meus sonhos e serem sempre exemplo. Cada dia sou grata por tê-los em minha vida, bússola na minha jornada. Aos meus avós Olindina, Vicente, Cecê e Freire (in memoriam) pelos sábios ensinamentos.

Agradeço ao meu companheiro de vida Augusto Cesar, por cada olhar sereno, pela poesia dos dias, pelo apoio em cada passo e pela paciência de um camponês que espera o germinar da semente.

Agradeço a minha orientadora Professora. Dra. Vera Magalhães pelas imprescindíveis contribuições, pelo exemplo como profissional e docente. Meu profundo agradecimento por ter despertado o meu olhar científico, pela dedicação e apoio sem os quais jamais teria concluído esse estudo.

Minha gratidão a minha co-orientadora Dra. Ana Salustiano Cavalcanti pelas tantas horas ao meu lado durante a pesquisa no LACEN, pelo empenho e por proporcionar enriquecimento das análises através de sua vasta experiência na área.

Meus sinceros agradecimentos às equipes do SAE Amélia de Pontes e SAE Jaboatão, onde tive a honra de conhecer pessoas comprometidas e empenhadas em acolher PVHA, especialmente Eline, Nelma, Erivânia, Erika, Jesus, Socorro, Pedro, Marli, Renata, Lourdes, Luciete, Adriana, Paloma, Cleidinha, Poliana, Joelma, Cecinha, Joselma, Marina, Jane, Tulio e Josiel. Agradeço à equipe da UPA Rendeiras em Caruaru e Hospital Manoel Afonso, com quem aprendi muito, especialmente Luciana, seu Salu, Bebê, Branca, Cíntia, Maria dos Anjos e todos os demais.

Agradeço a toda equipe do LACEN-PE especialmente Shirley, Alexandre, Jefferson e João Carlos.

Agradeço a todos os colegas do mestrado, especialmente Jorge, Leyla, Kamilla, Lucas, Gisele, Luan e Gabriela que me apoiaram carinhosamente e foram essenciais nessa jornada. Meus agradecimentos ao Sr. Walter, membro da secretaria do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical pela paciência e pelo apoio.

Agradeço aos meus tios e tias Arlindo, Tereza, Nadja, Gil, Zito, Maria José, Pedro e Vanessa, primas e primos que tanto me apoiam e me compreendem, assim como são essenciais na minha construção como ser humano; agradeço aos queridos amigos de curso, com quem tive a honra de compartilhar momentos de aprendizado e carinho: Lucas, Giselle, Vanessa, Andrea, Marquinhos, Rafa Alex, Bob, Rubens, Hugo, Flávia, Thiago Henrique, Joelson, Mariana, Vivaldo, Samara, Emille, Renato, Sara, Evelin, Laura, Raonne, Carol, Magda, Andreia, Pati, Marcelo, Moniquinha, Poli, Camila, Adriana, Dani e Eline.

Agradeço a todas/os amigos/as pelo apoio, especialmente Lívia, Halina, Thaisa, Lorena, Priscila, Tercio, Jhose, Camila e todos que sonham e seguem construindo o SUS a cada dia.

Agradeço a Saulo Santos, pelo empenho como docente e pelo grande exemplo de compromisso com a universidade.

Aos amigos sempre presentes Dani, Mateus, Arthur, Rosane, Lima, Hannah, Pedro, Selma, Nelma, Chico Zenir, Bia, Patrícia e Tony.

Meus sinceros agradecimentos a Gestos – Soropositividade, Comunicação e Gênero, por ter me despertado aos 13 anos a conhecer a vida das pessoas que vivem com HIV/aids; esse momento foi imprescindível para a mim.

Agradeço aos amigos da Rede Nacional de Médicas/os Populares e à Consulta Popular pela solidariedade, pelo amor e compromisso com a vida do povo brasileiro.

Meus profundos agradecimentos a todos os profissionais assistentes, equipes de saúde, pesquisadores que acompanham cotidianamente a vida das PVHA.

Agradeço por fim a todas e todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização desse trabalho.

As iniquidades em saúde são as expressões mais nocivas das desigualdades sociais e econômicas e devem ser um argumento relevante para modificar a prioridade dada ao crescimento econômico, trazendo o desenvolvimento humano para o coração do debate. (MARMOT, 2015)

RESUMO

Estima-se que a epidemia pelo HIV atinja cerca de 36,7 milhões de pessoas no mundo (UNAIDS, 2017), das quais 54% não sabem que estão infectadas. O início precoce de antirretrovirais (ARV) em pessoas que vivem com HIV/Aids (PVHA) tem sido apontado como um fator determinante à melhoria da qualidade de vida, redução da mortalidade e preservação ou restauração do status imunológico de PVHA (LUNDGREN, 2015). Apesar dos avanços terapêuticos, um dos principais desafios da pandemia pelo HIV é a capacidade do vírus em gerar altas taxas de mutações e desenvolver resistência à terapia antirretroviral (TARV) (HIVDB, 2016). O presente estudo teve como principal objetivo avaliar a resistência secundária aos antirretrovirais em Pernambuco através da análise dos testes de genotipagem desenvolvidos no Laboratório Central de Saúde Pública do estado de Pernambuco (LACEN-PE) no período de 2010 a 2015. Foram analisadas 792 amostras, das quais 86,1% apresentaram pelo menos um tipo de mutação capaz de gerar resistência de acordo com a tabela IAS- 2017. Quanto à distribuição da frequência de mutações, os dados evidenciaram que houve maior percentual de mutações associadas à resistência aos Inibidores da Transcriptase Reversa Análogos de Nucleosídeos. O estudo sugere ainda que a prevalência das mutações associadas à resistência aos antirretrovirais vem apresentando uma tendência de estabilização em relação aos estudos anteriores. O perfil genotípico viral nessa população denota a elevação do percentual de CRFs. Conhecer o processo evolutivo do HIV-1, assim como os mecanismos de resistência é parte essencial ao desenvolvimento de ações e estratégias que minimizem os efeitos danosos da falha virológica.

Palavras chave: HIV. Resistência a medicamentos. Antirretrovirais. Síndrome de imunodeficiência adquirida.

ABSTRACT

It is estimated the HIV epidemic reaches about 36.7 million people around the world (UNAIDS, 2017), of whom 54% are unaware that they are infected. The early use of antiretroviral therapy (ART) in people living with HIV/AIDS (PLHIV) has been identified as a key factor in improving quality of life, reducing mortality and preserving the immune status of PLHIV (LUNDGREN, 2015). One of the major challenges of the HIV pandemic is the ability of the virus to generate high rates of mutations and develop resistance to ART (HIVDB, 2016). The main objective of this study was to evaluate ART resistance in Pernambuco based on the analysis of the genotyping tests developed at the Central Laboratory of Public Health from Pernambuco state over the period of 2010 to 2015. A total of 792 samples were analyzed, of which 86.1% had at least one type of mutation capable of generating resistance according to table IAS-2017. The samples showed there was a higher percentage of mutations associated with resistance to Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors. The study also suggests the prevalence of mutations associated with antiretroviral resistance has been stabilizing in relation to previous studies. The viral genotypic profile in this population denotes the increase in the percentage of CRFs. Knowing the evolutionary process of HIV-1 as well as the development of resistance is an essential part of the development of strategies that minimize the harmful effects of virological failure.

Key words: HIV. Drug resistance. Anti-retroviral agents. Acquired immunodeficiency syndrome.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	-	Estrutura Morfológica do HIV	18
Quadro 1	-	Critérios para definição de falha terapêutica	37
Figura 2	-	Distribuição do Percentual de Subtipos virais do HIV-1 no mundo	22
Figura 3	-	Distribuição do Percentual de Subtipos virais do HIV-1 no Brasil	23
Gráfico 1	-	Distribuição percentual de mutações relacionadas aos Inibidores da Transcriptase Reversa análogos de Nucleosídeo/nucleotídeo – Pernambuco, 2010 a 2015.	45
Gráfico 2	-	Distribuição percentual de mutações relacionadas aos Inibidores da Transcriptase Reversa não análogos de Nucleosídeo– Pernambuco, 2010 a 2015.	45
Gráfico 3	-	Distribuição percentual de mutações <i>Major</i> relacionadas aos Inibidores de Protease – Pernambuco, 2010 a 2015.	46
Gráfico 4	-	Distribuição do percentual de amostras com mutações associadas às classes de mutações – Pernambuco - 2010 a 2015.	46
Gráfico 5	-	Evolução da distribuição percentual de Subtipos Virais e CRFs do HIV-1. Pernambuco, 2010 a 2015.	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Distribuição dos dados demográficos, imunológico e virológicos dos 1040 testes de genotipagem avaliados em Pernambuco 2010-2015.....	42
Tabela 2 -	Distribuição percentual de laudos resgatados/ano- Pernambuco, 2010 a 2015.....	43
Tabela 3 -	Percentual de amostras com mutações e amostras não amplificadas..	43
Tabela 4 -	Prevalência de mutações para cada classe de medicamentos.....	44
Tabela 5 -	Prevalência de mutações para cada classe de ARV e associações	44

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

3TC	Lamivudina
ABC	Abacavir
AIDS/SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
ARV	Antirretroviral
ATV	Atazanavir
AZT	Zidovudina
CCR5	Co-receptor quimoquina do tipo 5
cDNA	DNA complementar
CRF	Forma recombinante circulante (circulating recombinant form)
CV	Carga viral
d4T	Estavudina
ddI	Didanosina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EFV	Efavirenz
env	Envelope
FDA	Food and Drug Administration
FPV	Fosamprenavir
FTC	Emtricitabina
HAART	Highly Active Antiretroviral Therapy
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HIV-1	Vírus da Imunodeficiência Humana do tipo 1
HIV-2	Vírus da Imunodeficiência Humana do tipo 2
IDH	Índice de Desenvolvimento Humano
IF	Inibidor de fusão
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
INI	Inibidor da integrase
IN	Integrase
ITRNN	Inibidor de transcriptase reversa não análogo ao nucleosídeo
ITRN	Inibidor de transcriptase reversa análogo ao nucleosídeo
IP	Inibidor de protease
LACEN	Laboratório Central de Saúde Pública

LPV/r	Lopinavir + Ritonavir
mm3	Milímetro cúbico
MRV	Maraviroque
MS	Ministério da Saúde
n	Número
NC	Nucleocapsídeo
NVP	Nevirapina
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pol	Polimerase
PR	Protease
PVHA	Pessoas vivendo com HIV/Aids
RAL	Raltegravir
RENAGENO	Rede Nacional de Genotipagem
RNA	Ácido ribonucleico
RNA _m	RNA mensageiro
RT-PCR	Reação em Cadeia da Polimerase do Transcrito Reverso
RTV	Ritonavir
SPSS	Software Statistical Package for Social Sciences
SQV	Sequinavir
SU	Glicoproteína de superfície
T	Timina
T-20	Enfurvitida
TAM	Thymidine analog mutations (mutações associadas aos análogos de timidina)
TARV	Terapia antirretroviral
TCD4 ⁺	Linfócito TCD4 ⁺
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TDF	Tenofovir
TR	Transcriptase Reversa
UNAIDS	Programa Conjunto das Nações Unidas sobre HIV/Aids
URF	Forma recombinante única (unique recombinant form)
Vif	Proteína viral Vif
Vpr	Proteína viral r
WHO	Organização Mundial de Saúde (World Health Organization)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1	EPIDEMIOLOGIA	19
2.2	PERFIL GENOTÍPICO VIRAL	20
2.3	RESISTÊNCIA A ANTIRRETROVIRAIS	23
2.4	MECANISMOS DE RESISTÊNCIA AOS ANTIRRETROVIRAIS	24
2.4.1	Mecanismos de Resistência a ITRNs	25
2.4.2	Mecanismos de Resistência a ITRNNs	25
2.4.3	Mecanismos de Resistência a IPs	25
2.5	PRINCIPAIS ANTIRRETROVIRAIS E MUTAÇÕES ASSOCIADAS	26
2.5.1	Inibidores de transcriptase reversa análogo de nucleosídeo/nucleotídeo (ITRN/ITRnt)	26
2.5.2	Inibidores da transcriptase reversa não análogos de nucleosídeos (ITRNN)	28
2.5.3	Inibidores de Protease (IP)	28
2.5.4	Inibidores de Integrase (INI)	30
2.5.5	Inibidor de Fusão (IF)	30
2.6	IMPLICAÇÕES DO USO DE ANTIRRETROVIRAIS	31
2.7	TESTES DE GENOTIPAGEM	32
3	OBJETIVOS	34
3.1	OBJETIVO GERAL	34
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
4	MATERIAIS E MÉTODO	35
4.1	DESENHO DO ESTUDO	35
4.2	POPULAÇÃO DO ESTUDO	35
4.3	CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO	35
4.4	DEFINIÇÃO DE VARIÁVEIS	35
4.5	CATEGORIZAÇÃO DAS VARIÁVEIS:	36
4.6	OPERACIONALIZAÇÃO DO ESTUDO	36
4.7	DEFINIÇÃO DE TERMOS	37
4.8	TESTE DE GENOTIPAGEM	37
4.9	IDENTIFICAÇÃO DO SUBTIPO VIRAL	38

5	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	39
6	RESULTADOS	40
7	CONCLUSÕES.....	53
	REFERÊNCIAS.....	54
	APENDICE A - ARTIGO VERSÃO LÍNGUA INGLESA	61
	ANEXO A - TABELA IAS-2017	76
	ANEXO B - AUTORIZAÇÃO DO USO DE DADOS LACEN-PE.....	78
	ANEXO C - PARCER DO CEP – CCS/UFPE	79

1 INTRODUÇÃO

O início precoce de antirretrovirais (ARV) em pessoas que vivem com HIV/Aids (PVHA) reduz em 53% a morbimortalidade, notadamente em pessoas que começaram a terapia antirretroviral (TARV) com níveis de linfócitos TCD4+ superiores a 500 cel/mm³ em relação aos indivíduos com contagem de CD4 + abaixo de 350 cel/mm³ (LUNDGREN, 2015). O uso de ARV por longo período de tempo, entretanto, tem sido limitado pelo aparecimento de resistência e toxicidade (DE BETHUNE & HERTOGS, 2006). Esses eventos podem levar à suspensão prematura das medicações tornando-se uma ameaça à saúde pública (ROBERT et al., 2010), motivo pelo qual faz-se necessário realizar o acompanhamento sistemático das resistências primária e secundária aos ARV, bem como ações e estratégias em adesão. Fatores programáticos - como modelos de atendimento, monitoramento de tratamento, escassez de provisões de medicamentos -, culturais, relacionados às PVHA ou ao perfil genotípico viral - por exemplo, aderência, fatores de risco, subtipo - podem resultar no desenvolvimento de extensa resistência a medicamentos e deve ser abordado regionalmente (GODFREY et al, 2017).

Tendo em vista a recente implementação no Brasil do consenso que recomenda a disponibilização da terapia Antirretroviral (TARV) a todos os indivíduos diagnosticados com infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) (BRASIL, 2015; WHO, 2015), a observação da resistência aos ARV torna-se, por conseguinte, necessária para a monitorização e contribuição com a ampliação dos recursos terapêuticos.

Segundo o recente estudo HIV Transmitted Drug Resistance in Latin America and the Caribbean: A Systematic Review and Meta-Analysis, (AVILA-RIOS et al., 2016) realizado na América Latina e Caribe há uma tendência global na elevação das taxas de resistência aos ARV principalmente nos países que baseiam seu esquema terapêutico em Inibidores da Transcriptase Reversa Análogo de Nucleosídeos (ITRN) e Inibidores da Transcriptase Reversa não Análogos de Nucleosídeos (ITRNN), a exemplo do Brasil até dezembro de 2016, quando inseriu na sua primeira linha de tratamento o Dolutegravir, um inibidor de integrase em substituição ao Efavirenz (BRASIL, 2016). O supracitado estudo verificou ainda que ao final de 2013 cerca de 24% das pessoas em uso de ARV encontravam-se no esquema de segunda linha e 5% no esquema de terceira linha.

Segundo Diaz et al (2015), houve no Brasil o crescimento da resistência secundária aos ITRNN de 50% entre 2001 e 2003 para 60% entre 2006 e 2009, embora tenha ocorrido o decréscimo da resistência secundária aos ITRN e IP. Ainda de acordo com o estudo, 22,4% das pessoas que apresentaram resistência às três classes de drogas eram portadoras do subtipo F. A análise do crescimento da resistência a ARV no Brasil é corroborada pelo recente estudo realizado nos municípios de Salvador, Fortaleza, Rio de Janeiro, Campinas, Vitória e Porto Alegre segundo o qual a maioria dos pacientes (675 pessoas – 43,1%) encontrava-se em falha do segundo esquema terapêutico, 37,8% apresentavam falha na primeira linha de tratamento e em 15% já houve falha de três ou mais regimes de tratamento (BRITES et al, 2016). Segundo Cavalcanti (2011), a frequência de resistência primária em Pernambuco no ano de 2009 baseada na tabela de Mutações do IAS-2009 foi de 6,1%, correspondendo a um acréscimo significativo em relação ao estudo realizado em 2002 que identificou uma frequência de 3,6% (MEDEIROS et al, 2006). Além disso, na análise de 576 amostras do Nordeste para avaliação da resistência secundária aos fármacos, foram identificadas frequências de mutações compatíveis com resistência a ARV nas seguintes classes: ITRNN (94,4%), ITRN (97,9%) e IP (52,1%) entre 2002 e 2004 (CAVALCANTI, 2005).

Uma vez que o início do tratamento é prescrito de forma empírica, na maioria dos casos, a implementação da terapêutica ARV de acordo com o consenso do Ministério da Saúde (2015) respalda a importância de atualizar os dados referentes à resistência a ARV evitando, assim, a introdução da administração precoce de esquemas possivelmente fadados à falha terapêutica.

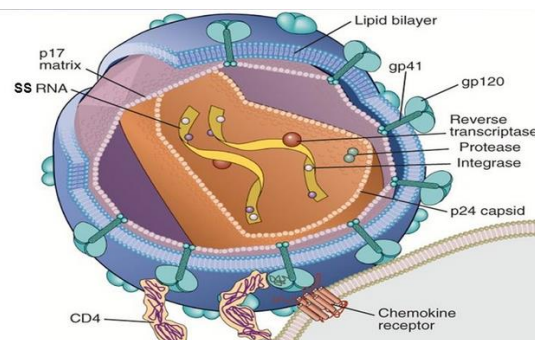
Levando-se em consideração os estudos recentes no Brasil acima citados que têm evidenciado a elevação das taxas de resistência a ARV além da peculiaridade do estado de Pernambuco, por totalizar um percentual de HIV-1 subtipo F de 37,7% (MEDEIROS et al., 2006), torna-se necessário identificar e analisar a resistência aos ARV no estado. O presente estudo se propõe, portanto, a analisar o comportamento da prevalência da resistência secundária para cada classe de medicamentos e o perfil genotípico viral nas amostras analisadas pelo LACEN-PE, no período de 2010 a 2015.

2 REVISÃO DE LITERATURA

O vírus da Imunodeficiência humana (HIV) é um retrovírus classificado no gênero *Lentivirus*, transmitido através da exposição por meio de sangue, sêmen, secreção vaginal e leite materno, principalmente mediante relação sexual, capaz de gerar a AIDS - Síndrome da Imunodeficiência Adquirida. A infecção pelo HIV induz alterações inflamatórias significativas no hospedeiro, a exemplo da liberação de citocinas inflamatórias mediadas pelo interferon alfa e interleucina 15, simultâneo ao aumento da carga viral plasmática e à paulatina diminuição dos linfócitos T CD4+. Após um período que varia de 1 a mais de 10 anos e média de 5 anos, a PVHA apresentará as complicações advindas do processo de disfunção e ativação imune, particularmente da imunidade celular, que caracterizam a evolução da doença, como as infecções oportunistas e o aumento da susceptibilidade a neoplasias e doenças crônico-degenerativas (BRASIL, 2015).

As estruturas morfológicas dos vírus HIV tipo 1 e 2 são compostas por proteínas estruturais e funcionais e um genoma de RNA. O envelope é constituído por uma bicamada lipídica cujo gene *env* é responsável pela codificação de duas glicoproteínas: gp41 transmembrana e gp120 que se projetam externamente ao envelope viral. Na sua face interna o HIV possui a proteína viral denominada p17 (matriz); o capsídeo composto pela proteína p24 é uma espécie de envoltório que protege os dois filamentos simples de RNA e três enzimas essenciais, p51 (transcriptase reversa), p11 (protease) e p31 (integrase) (KASPER et al., 2017) conforme ilustração 1.

Figura 1 - Estrutura Morfológica do HIV



Fonte: Abbas et al. Cellular and Molecular Immunology. Elsevier.
9ª edição, 2017

O genoma do HIV-1 possui nove genes dos quais três estão relacionados à síntese de proteínas estruturais – *gag*, *pol* e *env*. Os produtos proteicos dos outros seis genes - *vif*, *vpr*, *vpu*, *tat*, *rev* e *nef* - estão envolvidos na regulação da expressão

do genoma do vírus (LARDER et al., 2001) o que torna o HIV-1 mais complexo em comparação aos demais retrovírus uma vez que os supracitados genes codificam proteínas envolvidas na modificação das células do hospedeiro para promover a replicação do vírus e expressão gênica viral (KASPER et al, 2017).

2.1 EPIDEMIOLOGIA

A incidência anual do HIV no mundo vem apresentando taxas de 2,1 milhões de casos novos em 2016 desde a maior taxa registrada em 1997 de 3,3 milhões, refletindo um cenário de desaceleração do avanço da infecção, embora a análise epidemiológica evidencie o crescimento da incidência anual nos seguintes países periféricos: no Leste Europeu e Ásia Central houve um acréscimo de 57% nas taxas de novas infecções, no Caribe houve o incremento de 9%, o Oriente Médio e norte da África apresentaram taxas de incidência com elevação de 4% e na América Latina, o aumento de novos casos correspondeu a 2% (UNAIDS, 2017). Estima-se que a epidemia pelo HIV atinja cerca de 36,7 milhões de pessoas ao redor do mundo (UNAIDS, 2017), das quais 54% não sabem que estão infectadas e cujo tratamento poderá ser iniciado tão logo sejam diagnosticadas. Um dos principais desafios no tratamento da pandemia pelo HIV é a sua capacidade em gerar altas taxas de mutações e desenvolver resistência aos medicamentos antirretrovirais existentes: um aspecto fundamental do tratamento do HIV (HIVDB, 2016). O mesmo grupo de pessoas que possivelmente não aderem ao tratamento antirretroviral, tendo como consequência o desenvolvimento de HIV resistente, é o grupo que também apresenta dificuldades em aderir às recomendações de uso de preservativo e prevenção da transmissão das cepas resistentes. Dessa forma, deve ser dada atenção especial às medidas de contenção da transmissão do HIV nesse grupo específico de pessoas (DIAZ, 2011).

No Brasil, a incidência do HIV permanece elevando-se: segundo o Programa das Nações Unidas para HIV/Aids 2016 houve um acréscimo de 11% entre 2005 e 2013 e no período de 1980 a 2016 um total de 842.710 pessoas foram notificadas com Aids no país. A distribuição proporcional desses casos mostra uma concentração nas regiões Sudeste e Sul, correspondendo a 53,0% e 20,1% do total de casos, respectivamente; a região Nordeste corresponde a 15,1%, a região Centro-Oeste apresenta 6,0% e a região Norte com 5,9% do total dos casos (BRASIL, 2016). O Brasil possui ainda a maior taxa de incidência anual na América Latina,

correspondendo a 49% das novas infecções na região ou em números absolutos, 48.000 novos casos em 2016 (UNAIDS, 2017). No período de 2011 a 2015, a região Norte apresentou uma média de 3,9 mil novos casos ao ano; o Nordeste, 8,6 mil; o Sudeste, 16,8 mil; o Sul, 8,7 mil; e o Centro Oeste, 2,8 mil casos novos ao ano. No período de 2007 a 2016, no que se refere às faixas etárias, observou-se que a maioria dos casos de infecção pelo HIV encontra-se nas faixas de 20 a 34 anos, totalizando 52,3% dos casos, o que reflete um grande percentual de jovens vivendo com HIV no Brasil. Ainda de acordo com o Boletim Epidemiológico 2016 o maior percentual de casos de Aids se encontra nos indivíduos de 25 a 39 anos, dos quais 53, 6% são homens e 49,4% são mulheres (BRASIL, 2016).

De forma geral, o Brasil vem apresentando estabilização da epidemia nos últimos dez anos com taxa de detecção anual de 20,7 casos/100 mil habitantes (hab), entretanto, as regiões Norte e Nordeste apresentam uma tendência linear de crescimento da taxa de detecção: em 2006 a taxa de detecção registrada foi de 14,9 (Norte) e 11,2 (Nordeste) casos/100 mil hab., enquanto no ano de 2016 a taxa foi de 24,0 (Norte) e 15,3 (Nordeste), representando um aumento de 61,4% (Norte) e 37,2% (Nordeste). As regiões Sul e Sudeste vêm apresentando tendência de queda e a região Centro-oeste vem evidenciando uma estabilização da taxa de detecção (BRASIL, 2016).

Dentre os estados do Nordeste, Pernambuco apresenta a segunda maior taxa de detecção: 17,6 para 100 mil hab. em 2006, elevando-se para 19/100 mil hab. em 2015 (BRASIL, 2016). Conforme o boletim do Programa Estadual DST/Aids, atualizado em dezembro de 2016, no estado de Pernambuco, de 1983 a 2015, foram registrados 23.399 casos de Aids notificados e – entre notificações HIV e AIDS- foram observados casos em 146 dos 185 municípios pernambucanos dos quais 65% dos casos ocorreram em homens e 35% em mulheres. Quanto à faixa etária, a epidemia se concentra nos adultos jovens, de 20 a 39 anos (PERNAMBUCO, 2016), em consonância com os dados do Brasil.

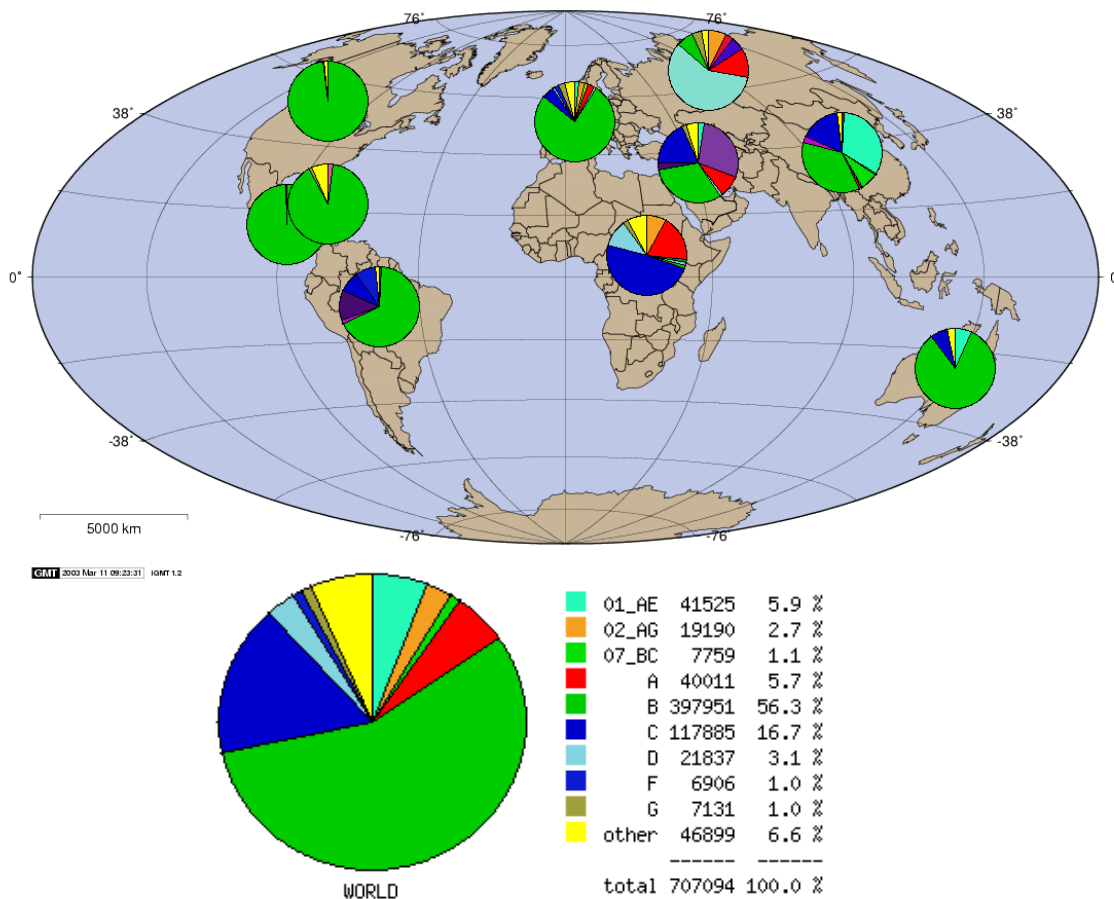
2.2 PERFIL GENOTÍPICO VIRAL

A grande variabilidade genética do HIV-1 é uma das principais características dessa infecção que se reflete na pandemia pelo HIV/Aids. Para descrever esse

fenômeno gerado por mutação e recombinação do genoma viral foi definido um sistema de nomenclatura unificado dos subtipos virais (ROBERTSON et al., 2000; apud PESSÔA et al., 2016). Dessa maneira, o HIV-1 pode ser classificado em três grandes grupos: M (Major), O (Outlier) e N (non-M/non-O). A análise genética de isolados do HIV-1 evidenciou, dentro do grupo M, a existência dos seguintes subtipos: A1, A2, A3, A4, B, C, D, F1, F2, G, H, I, J e K, além das atualmente reportadas 90 formas recombinantes denominadas CRFs (*Circulating Recombinant Forms*) e as formas recombinantes únicas (URFs) - *unique recombinant forms* (<http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/CRFs/CRFs.html>). Os subtipos E e I originais nunca foram encontrados, apenas as formas recombinantes (ROBERTSON et al., 2000; LAU et al., 2013; HIV SEQUENCE DB, 2017). As CRFs são vírus com genomas mosaico que se propagaram de forma epidêmica encontradas em pelo menos três isolados virais de indivíduos não relacionados epidemiologicamente; as URFs são vírus com genoma mosaico identificados em um único indivíduo ou em um grupo de indivíduos relacionados epidemiologicamente (FANG et al., 2004). O HIV- 2, descoberto em 1986, encontra-se confinado a alguns países da África Ocidental onde é endêmico e, esporadicamente, é descrito em outras regiões como Portugal, Índia e Filipinas (MARLINK et al., 1994). As variações genéticas do HIV-1 extrapolam as fronteiras geográficas, porém é possível identificar a predominância de alguns subtipos de acordo com a região; na África, por exemplo, os subtipos mais prevalentes são A, C e D enquanto a Europa, América do Norte, Austrália e Brasil apresentam majoritariamente o subtipo B (BRENNAN et al, 2006; apud PESSÔA et al., 2016; www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/CRFs/CRFs I2018) conforme figura 2.

No Brasil, o subtipo B do HIV-1 é o mais prevalente de forma geral, seguido pelo F1 e CRF B/F1 nas regiões Norte, Nordeste, Sudeste e Centro-Oeste. Na região Sul há uma alta prevalência do subtipo C, com valores que variam de um estado a outro e do CRF31_BC. O aumento na complexidade dos subtipos virais e formas recombinantes tem sido observado nas diferentes regiões brasileiras ao longo do tempo (BRASIL, 2014). Dessa maneira, conhecer as variações genéticas do HIV-1 se torna determinante para o desenvolvimento de drogas e de vacinas efetivas (PESSÔA et al, 2016).

Figura 2 – Distribuição do Percentual de Subtipos virais do HIV-1 no mundo



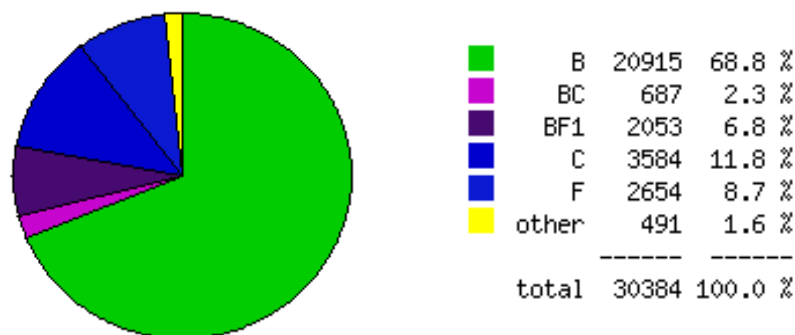
Fonte: Los Alamos – Laboratory - (<http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/CRFs/CRFs.html>)

De acordo com estudo realizado por Cavalcanti (2005) a taxa de PVHA na região Nordeste em falha terapêutica pertencentes ao subtipo F do HIV-1 foi de 11,8%, dos quais, Pernambuco apresentava a maior prevalência das amostras em relação aos demais estados, apresentando 22% desse subtipo viral. Segundo Medeiros et al. (2006) em estudo com pacientes virgens de tratamento foi identificada prevalência de 22.6% do subtipo F. Cavalcanti et al. (2012) evidenciaram aumento da prevalência do subtipo F em pacientes diagnosticados em Centros de Testagem e Aconselhamento da Região Metropolitana do Recife, elevando-se a 37,7% dos pacientes recém diagnosticados. Essa prevalência é corroborada pelo estudo realizado com 169 amostras procedentes do estado de Pernambuco segundo o qual a análise da região *pol* evidenciou a frequência do subtipo F1 em 31,4% das amostras (LIMA, et al, 2017).

Entretanto, alguns estudos realizados através do sequenciamento das regiões *pol*, *gag* e *env* denotaram a elevada prevalência dos CRFs BF em contraposição à frequência verificada nos estudos que analisaram a região *pol*: Santos et al (2011) identificaram prevalência de 21,0% de formas recombinantes BF e somente 1,8% de

amostras oriundas do Subtipo F; Pessoa et al (2016) realizaram o método full-length genome em amostras de doadores de sangue de hemocentros de Pernambuco, Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo e identificaram valores elevados de CRFs BF1 incluindo o CRF70 e 71 BF1, notadamente em Pernambuco, onde foi observada frequência do CRF BF em 27% das 96 amostras analisadas. É importante ressaltar porém que de acordo com o Los Alamos National Laboratory Database – HIV sequence database (2018), o Brasil possui prevalência de 6,8% de BF1 e 8,7% do subtipo F conforme figura 3 (<http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/CRFs/CRFs.html>)

Figura 3 - Distribuição do Percentual de Subtipos Virais do HIV-1 no Brasil



Fonte: Los Alamos – Laboratory- www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/CRFs/CRFs |2018

2.3 RESISTÊNCIA A ANTIRRETROVIRAIS

Existem dois grupos de resistência a ARV: a resistência primária ou transmitida e a resistência secundária. Na resistência primária a cepa viral resistente é transmitida ao hospedeiro e esse não apresentará resposta ao uso dos antirretrovirais. Na resistência secundária, o paciente iniciará o tratamento com drogas de primeira linha, apresentando melhora clínica e laboratorial, porém ao longo dos anos não haverá a manutenção desse quadro em consequência da pressão seletiva exercida pelos ARV e consequente desenvolvimento de resistência (CAVALCANTI, 2005). Dentre as principais consequências da supressão viral incompleta encontra-se o acúmulo de mutações que levam à resistência aos ARV e, por conseguinte a perda de opções terapêuticas adequadas. Logo, cerca de 60% dos pacientes mantidos com supressão viral parcial desenvolvem novas mutações de resistência após 18 meses e após um ano sob viremia persistente, há perda de uma opção de medicamento em

aproximadamente um terço dos casos (BRASIL, 2015). O paciente então evolui desfavoravelmente à medida em que a resistência secundária progride e reduz a eficácia do tratamento.

No Brasil, a partir de 2017 o esquema terapêutico de primeira linha consiste na administração de dois medicamentos ITRN/ITRNt (Lamivudina -3TC e Tenofovir - TDF) e um Inibidor da Integrase (INI) – Dolutegravir (DTG) (BRASIL, 2016). Entretanto, até dezembro de 2016 o esquema de primeira linha para os pacientes que iniciariam o tratamento – exceto crianças ou pacientes que tivessem alguma contraindicação ao uso desses medicamentos – seria composto pelos ITRN/ITRNt (3TC e TDF) em associação com o ITRNN (Efavirenz – EFV), ou seja, no período de realização dos testes de genotipagem para o atual estudo o esquema preferencial de tratamento em vigência era composto pela associação ITRN(t)/ITRNN. De acordo Robert et al (2010), a elevação das taxas de resistência a ARV vem se tornando uma ameaça substancial à saúde pública, notadamente nos países periféricos, cujo arsenal terapêutico de primeira e segunda linha se baseiam nos medicamentos mais susceptíveis à resistência, como os inibidores da transcriptase reversa não análogos de nucleosídeos (ITRNN). Corroborando com essa análise, Barth et al (2010) demonstraram que a falha terapêutica nas combinações ITRNN/inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeo (ITRN) ocorre em 10 a 30% dos pacientes por ano.

Segundo Soulie et al (2014), o percentual de mutações de resistência secundária a ARV em PVHA com agravos neurológicos foi significativamente maior no líquido cefalorraquidiano (LCR) em relação ao plasma estabelecendo um novo capítulo na análise da resistência aos ARV. De acordo com esse estudo (2014), foi possível realizar o acompanhamento de 244 pacientes, dos quais 12,5% dos pacientes previamente tratados - 155 pessoas - apresentaram mutações no gene da Transcriptase Reversa e 19,8% para o gene da Protease unicamente no LCR; segundo os autores, tal fato se deve em grande medida à baixa penetração dos antirretrovirais nos compartimentos do sistema nervoso central.

2.4 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA AOS ANTIRRETROVIRAIS

A partir da pressão seletiva gerada pelo meio em que o vírus se desenvolve, cepas virais mais adaptadas serão selecionadas na presença de ARV, gerando,

portanto, cepas capazes de reduzir a eficácia desses medicamentos. Para o HIV, essa seleção ocorre rapidamente em função do ciclo replicativo desse vírus e das mutações genéticas que emergem no HIV. Quando se leva em consideração (I) o índice de erros naturais da transcriptase reversa (TR) estimado em 4×10^4 , (II) o alto índice de replicação do vírus em uma pessoa sem uso de ARV que produz e elimina 10 bilhões de vírus diariamente e (III) o genoma do vírus, que é de 10 kB (10 mil pares de base), percebe-se que todas as mutações possíveis são geradas diariamente no HIV -1. Essa diversidade genética torna o HIV capaz de evadir da vigilância do sistema imune ou da atividade dos ARV, no último caso, através da resistência (DIAZ, 2011).

2.4.1 Mecanismos de Resistência a ITRNs

Os ITRNs são medicamentos estruturalmente muito semelhantes aos nucleosídeos verdadeiros: adenosina, guanosina, citosina e timidina que no processo de polimerização ocupam o sítio que seria do substrato natural. Os mecanismos de resistência a ITRNs têm sido compreendidos a partir de dois grupos:

- a) As mutações propiciam um aumento na habilidade da TR do HIV -1 em discriminar entre o ITRN e o substrato natural, levando a uma incorporação preferencial dos nucleosídeos verdadeiros.
- b) Mutações que aumentam a habilidade da enzima em eliminar o ITRN que se encontra ligado ao final da cadeia com a função de impedir seu alongamento (DIAZ, 2011).

2.4.2 Mecanismos de Resistência a ITRNNs

Esses medicamentos se ligam em sítios específicos da TR localizados próximo ao sítio ativo dessa enzima, bloqueando a atividade da TR. As mutações de resistência promovem a alteração na conformação estrutural da enzima, impedindo a ligação dos ITRNNs.

2.4.3 Mecanismos de Resistência a IPs

Os IPs atuam de forma competitiva para ocupar o sítio ativo da Protease (PR), importante enzima responsável pela clivagem de grandes poliproteínas virais antes do encapsulamento do vírus. As mutações de resistência selecionadas pelos IPs levam a uma alteração na conformação tridimensional da PR cuja consequência

dessa alteração é: diminuição do tempo de ligação dos IPs à PR e diminuição do tempo que a PR levaria para clivar seu substrato natural (DIAZ, 2011).

2.5 PRINCIPAIS ANTIRRETROVIRAIS E MUTAÇÕES ASSOCIADAS

2.5.1 Inibidores de transcriptase reversa análogo de nucleosídeo/nucleotídeo (ITRN/ITRNT)

Durante o processo de transcrição realizado pela TR, os ITRNs substituem, de forma competitiva, os nucleosídeos verdadeiros. A Zidovudina e a Estavudina são análogos à timidina; a Lamivudina é análogo à citosina; a Didanosina e o Tenofovir são análogos à adenosina, e o Abacavir é análogo à guanosina. Desse modo, durante a polimerização do vírus, a TR pode utilizar um falso nucleotídeo (medicamento) que ocupa competitivamente o sítio das bases nitrogenadas virais e, por conseguinte interrompe essa etapa do ciclo replicativo do HIV e impede a formação de cepas virais viáveis (DIAZ, 2011).

- I) Lamivudina (3TC): Medicamento largamente utilizado e bem tolerado; compõe a primeira linha da TARV no Brasil para adultos em associação com o Tenofovir (TDF) ou Zidovudina para pacientes com comorbidades que contraindiquem o TDF (BRASIL, 2017). Uma especificidade desse fármaco é sua capacidade de manter-se ativo na presença das mutações associadas à timidina (TAM), devendo compor o esquema terapêutico em associação à Zidovudina ou Tenofovir na presença dessas mutações como forma de neutralizar as TAMs (IAS-2017)
- II) Tenofovir (TDF): Inibidor da transcriptase reversa análogo de nucleotídeo (ITRNT) geralmente utilizado em associação com a Lamivudina. O acúmulo da droga nas células em repouso permite ao fármaco inibir o HIV em células latentes, característica ausente nos ITRNs (KEARNEY et al., 2004). Devido a sua ação terapêutica contra o vírus da hepatite B (HVB) é recomendado para pacientes que apresentem co-infecção HIV-HVB (BRASIL, 2017). A nefrotoxicidade é o maior fator limitante ao seu uso em indivíduos predispostos à doença renal ou em uso concomitante de medicamentos nefrotóxicos. A mutação K65R está relacionada à falha terapêutica desses fármacos: estudos têm demonstrado que as mutações K65R + M184V/I parecem ser suficientes para revogar a atividade das drogas ITRN de um regime que compreende Abacavir (ABC), TDF, ou

Estavudina. A presença da mutação K65E/N vem sendo largamente relatada entre os pacientes que fazem uso de tenofovir ou didanosina. (BORROTO-ESODA et al., 2007, apud IAS-2017).

III) Zidovudina (AZT): primeiro fármaco utilizado como terapêutica antirretroviral, é um análogo da timidina que auxilia o tratamento do HIV reduzindo o déficit cognitivo em indivíduos com demência associada ao HIV (HAZRA et al., 2007). A toxicidade hematológica é um dos principais efeitos adversos do AZT e recomenda-se evitar o uso desse medicamento em casos de anemia ($Hb < 10g/dL$) e/ou neutropenia (neutrófilos < 1.000 células/ mm^3) (BRASIL, 2013). As Mutações análogas da Timidina (TAMs) clássicas - M41L, D67N, K70R, L210W, T215Y / F e K219Q / E - foram relatadas pela primeira vez em pacientes que receberam monoterapia com AZT. (MEYER, et al 2000). Além das mutações supracitadas, a mutação Q151M complex também é responsável por altos níveis de resistência secundária ao AZT, assim como reduz a susceptibilidade ao ddl, ABC e D4T (MELIKIAN et al., 2012).

IV) Abacavir (ABC): O ABC é um análogo da guanosina, com atividade contra o HIV que tem demonstrado eficácia, poucas interações medicamentosas e reduzida toxicidade (BRASIL, 2017). O efeito adverso mais importante do abacavir é uma reação imunológica de hipersensibilidade que afeta 5 a 8% dos pacientes durante as primeiras seis semanas de tratamento. Os sintomas são: febre, erupção cutânea, sintomas constitucionais, sintomas gastrointestinais, sintomas respiratórios. É necessário interromper de forma imediata o tratamento para que haja uma rápida reversão dos sintomas (BRASIL, 2017). A mutação L74V ocorre comumente em pacientes que receberam ABC ou Didanosina (ddl); esta também ocorre ocasionalmente em pacientes recebendo TDF (IAS-2017). A combinação das mutações L74V + M184V é o padrão mais comum de mutações que se desenvolvem em pacientes que fazem uso do esquema ABC+ 3TC. Esta combinação reduz a susceptibilidade ao ABC em mais de 5 vezes e à ddl mais de 2 vezes (SAX, et al., 2011).

V) Didanosina (ddl): A utilização da droga é somente recomendada em caso de intolerância ao AZT, TDF e ABC tendo em vista os efeitos adversos relacionados à pancreatite e neuropatia periférica (BRASIL, 2015). As principais mutações relacionadas a ddl são K65R, L74V, Q151M Complex, T69/D/N/G e V75T/M/A/S (IAS, 2017).

2.5.2 Inibidores da transcriptase reversa não análogos de nucleosídeos (ITRNN)

Agem através da inibição direta da transcriptase reversa, de forma não competitiva próximo ao sítio de ligação dos nucleosídeos, além de não ser necessária a fosforilação para desencadear a ação do fármaco.

I) Efavirenz (EFV): medicamento utilizado na primeira linha de esquema terapêutico até o início de 2017. Apresenta tempo de meia vida longo, necessitando ser administrado somente uma vez ao dia, porém os efeitos adversos relacionados aos distúrbios de sono, sonhos vívidos, tontura e alucinações contraindicam o medicamento em indivíduos com transtornos de humor (BRASIL, 2015). As mutações associadas fortemente à falha terapêutica do EFV são L100I que em associação com K103N/P pode provocar redução da susceptibilidade do fármaco (IAS, 2017).

II) Nevirapina (NVP): nos casos de contraindicação ao EFV, a NVP é uma opção de substituição segura, exceto em caso de exantema associado ao EFV. Em comparação com EFV ou Atazanavir (ATV), foi observada uma redução das taxas de LDL e elevação do HDL, sendo um fato importante para prevenção de eventos cardiovasculares para pacientes portadores de score *Framingham* > 20 (risco cardiovascular elevado) (BRASIL, 2013). Quanto às mutações identificadas em uso de NVP encontram-se L100I, K103N/S, V106A/M e K101P sendo a última uma mutação não polimórfica usualmente encontrada nas terapêuticas com ITRNN e reduz a susceptibilidade do HIV ao NVP de 3 a 10 vezes (ROBBINS et al., 2014; IAS, 2017)

2.5.3 Inibidores de Protease (IP)

Os genes *gag* e *pol* são decodificados em poliproteínas precursoras que seriam clivadas pela protease viral para a obtenção das proteínas maduras. Os IPs, porém, interferem no processamento das poliproteínas provocando a inativação das

partículas, tornando-as não infecciosas. As drogas dessa classe apresentam maior barreira genética para resistência viral, entretanto dentre os efeitos adversos encontram-se a lipodistrofia e a hiperglicemia (BRASIL, 2015). OS IPs são utilizados na segunda linha de esquema terapêutico segundo recomendações do Ministério da Saúde (2015), associado a duas drogas ITRN, quando não for possível utilizar EFV ou NVP.

I) Lopinavir (LPV/r): possui apresentação co-formulado com o Ritonavir, porém recentemente foi suspenso pelo Ministério da Saúde. Os efeitos colaterais mais comuns são os sintomas gastrointestinais e as alterações no metabolismo dos lipídios (BRASIL, 2017). As mutações mais comumente relacionadas à resistência ao HIV são I47V, V32I, L76V e V82A/F/T/S (IAS, 2017).

II) Ritonavir (RTV): inibidor de protease utilizado geralmente em associação com outros fármacos (LPV, Atazanavir -ATV- e Darunavir -TMC 114). Os principais efeitos adversos são os gastrointestinais como náuseas, vômitos, diarreia, além das alterações no metabolismo dos lipídios, cefaleia, parestesia perioral e periférica e astenia (BRASIL, 2017)

III) Atazanavir (ATV): utilizado de forma isolada ou em associação com o RTV como esquema de resgate, esse fármaco é bem tolerado em paciente com insuficiência renal, porém apresenta efeitos adversos como alargamento do intervalo PR evidenciado no ECG, intolerância à glicose ou diabetes mellitus, sintomas gastrointestinais e a icterícia (BRASIL, 2017). As mutações mais comumente associadas à falha terapêutica desse fármaco são: N88S, I84V e principalmente I50L (IAS, 2017)

IV) Darunavir (TMC 114): droga utilizada em associação com RTV geralmente em caso de falha dos IPs de primeira escolha. Apresenta entre os principais efeitos adversos os efeitos gastrointestinais (diarreia, náuseas) e cefaleia (BRASIL, 2017). Devido a sua metabolização no fígado pela enzima CYP3A4 há inúmeras interações medicamentosas que necessitam ser avaliadas: midazolam, carbamazepina, fenobarbital, rifampicina e anticoncepcionais orais a base de estradiol. As principais mutações observadas entre os pacientes que fazem uso do Darunavir são as I47V, I50V, I54M/L, L76V entre outras (IAS, 2017).

2.5.4 Inibidores de Integrase (INI)

Bloqueiam a ação da integrase, a proteína do HIV responsável pela inserção permanente de DNA viral no código genético da célula hospedeira. Este processo permite a elaboração de múltiplas cópias de RNA viral pela célula infectada para produção de novos vírus (MANDELL et al., 2016).

I) Dolutegravir (DTG) esse medicamento inibe a integrase do HIV por ligação ao sítio ativo dessa enzima e bloqueio da etapa de transferência do filamento na integração do ácido desoxirribonucleico (DNA) do retrovírus, que é essencial para o ciclo de replicação do HIV (CONITEC, 2015). Apresenta poucos efeitos adversos relatados, a exemplo de cefaleia, vertigem e sonolência (BRASIL, 2017). A principal mutação capaz de gerar resistência a esse medicamento é a Q148H/K/R – embora existam outras que reduzam eficácia a exemplo da N155H, F121Y, E138AK dentre outras (IAS, 2017).

II) Raltegravir (RAL): inibidor da integrase do HIV aprovado pela *Food and Drugs Administrations* (FDA) e pelo Comitê Nacional de Incorporação de Tecnologias no SUS (CONITEC) em 2007. Atualmente utilizado no Brasil no esquema de primeira linha em gestantes vivendo com HIV e pacientes co-infectados por Tuberculose (TB) (BRASIL, 2017). Após as 24 semanas, a proporção de pacientes com níveis de RNA viral <400 cópias/ml foi de 76% para os que estavam em uso de Raltegravir em comparação a 33% para os pacientes tratados com outros fármacos exceto Raltegravir (FDA, 2007 Apud Brito, 2011). Dentre as mutações principais encontram-se F121Y, Y143R/H/C, Q148H/K/R e N155H (IAS, 2017).

2.5.5 Inibidor de Fusão (IF)

Fármacos utilizados na terapia de resgate capazes de reduzir de forma substancial a carga viral em pessoas vivendo com HIV/Aids multirresistente através da inibição da fusão do HIV às células TCD4+ do hospedeiro (BRASIL, 2012).

I) Enfuvirtida (ENF/T-20): esse fármaco se liga aos receptores de membrana do HIV gp41 e dessa maneira, através da alteração conformacional impedem a fusão do HIV à célula do hospedeiro. Seu uso

é indicado apenas para pacientes que apresentaram falha de pelo menos um medicamento das três seguintes classes de fármacos: ITRN, ITRNN e IP (BRASIL, 2017). As principais mutações associadas a resistência a esse fármaco são: G36D/S, I37V, V38A/M/E dentre outras.

II) Inibidor CR5- Maraviroque (MVC): incide sobre o tropismo viral exercido pelo co-receptor CCR5, impedindo a ligação do vírus HIV com a célula TCD4+. Dessa maneira, esse fármaco bloqueia a replicação da variante R5 do HIV após ligação ao co-receptor transmembrana CCR5 (BRASIL, 2012).

2.6 IMPLICAÇÕES DO USO DE ANTIRRETROVIRAIS

O recente protocolo adotado pelo Ministério da Saúde (2015), segundo o qual recomenda-se o uso precoce de ARV em todos os pacientes, abre um novo capítulo na terapêutica do HIV. Os estudos observacionais que respaldaram a efetivação do protocolo da OMS no Brasil, entre eles o *Antiretrovirals Therapy Cohort Collaboration* (ART-CC), observou-se um aumento estatisticamente significativo de 28% na relação da evolução para Aids e óbito quando o início da terapia ARV ocorreu na faixa de LT-CD4+ de 251 a 350 células/mm³ em comparação com o seu início na faixa de 351 a 450 células/mm³. Em consonância com o estudo supracitado, porém apresentando número maior de pacientes e comparações, o *North American AIDS Cohort Collaboration on Research and Design* (NA-ACCORD), analisou 17.517 pacientes sem uso prévio de ARV entre os anos 1996 e 2006 e concluiu que na comparação entre os pacientes que iniciaram a TARV de forma imediata em relação aos que postergaram o tratamento após a taxa de LT CD4+ para 350 células/mm³, houve um acréscimo do risco de morte de 64% para os que adiaram o uso de ARV. Há, entretanto, uma questão que não foi evidenciada pelos estudos anteriores: a análise da resistência viral nos pacientes que fizeram uso precoce dos ARV em relação aos dados previamente observados. Os estudos observacionais concluíram ainda uma drástica redução da transmissibilidade entre parceiros sorodiscordantes – 96%-mediante uso precoce de ARV (GRINSZTEJN et al., 2014), o que reduziria, por conseguinte, a transmissão de cepas mutantes e, por analogia, a resistência aos antirretrovirais.

Uma vez que o tratamento no Brasil é realizado de forma empírica, a realização da genotipagem dos pacientes com falha terapêutica e, desta maneira, a

estimativa desse percentual relacionado a cada respectiva classe de medicamentos poderá auxiliar a elucidar a prevalência de resistência a ARV. Pode-se, portanto, evitar o uso de ARV possivelmente fadados à falha terapêutica.

2.7 TESTES DE GENOTIPAGEM

Os testes de genotipagem determinam a sequência genômica da região que codifica as enzimas transcriptase reversa (RT) e protease (PR) do HIV-1, analisando automaticamente o ácido desoxirribonucleico (DNA) gerado por amplificação do ácido ribonucleico (RNA) viral. Esta análise permite a identificação dos pontos de mutação do HIV isolado, revelando a que drogas antirretrovirais o vírus está resistente (HERTTOGS et al., 1998; PETROPOULOS et al., 2000; MORTENSEN; AZEVEDO; MUNERATO, 2002 apud CAVALCANTI, 2005).

Segundo o estudo GART (BAXTER et al, 2000), houve uma resposta significativa na comparação entre a contagem de Linfócitos T CD4+ nas PVHA evoluindo com falha terapêutica submetidas ao teste de genotipagem (GART) em relação às que tiveram o esquema terapêutico modificado pela experiência do profissional assistente (NO-GART). Os pacientes GART tiveram um aumento das taxas de CD4+ em 25×10^6 células/l enquanto os NO-GART tiveram o acréscimo de 18×10^6 cel/l CD4+ ao longo de 12 semanas. O estudo Francês VIRADAPT (1999) também evidenciou a importância da realização do teste de genotipagem em relação ao resgate empírico, uma vez que no sexto mês 32% dos usuários submetidos ao teste de genotipagem apresentavam carga viral indetectável enquanto somente 14% do grupo controle evoluíram para tal condição. Inúmeros estudos respaldaram, portanto, a importância da realização do teste de genotipagem para o direcionamento adequado da terapêutica uma vez que reduz os riscos de uso de medicamentos ineficazes, subsidia o uso de drogas ativas por tempo prolongado, auxilia a identificar má adesão quando há falha virológica sem mutações presentes e evita progressões desnecessárias para linhas de tratamento com maior barreira genética precocemente (DIAZ, 2016).

Segundo Hamers et al (2012), indivíduos com infecções causadas por HIV resistente apresentam piores desfechos clínicos, além de necessitar de maior aparato do sistema de saúde do que PVHA que apresentam vírus não resistente.

Uma das mais recentes meta-análises da América Latina incluindo 98 revisões (9 do Caribe, 10 da Mesoamerica, 7 da Região Andina, 44 do Brasil e 11 do

Cone Sul) e população de 11.441 indivíduos evidenciou resistência primária a ARV de 7,7% e crescimento da variação anual devido a classe de ITRNN (AVILA-RIOS, et al, 2016). A tendência temporal de crescimento foi observada em todas as resistências primárias na América Latina e Caribe quando comparado o período 2000-2005 (6,0%) e 2006 a 2015 (8,2% $p<0.0001$) A predominância da resistência primária foi observada entre as drogas ITRN no período de 2000 a 2005 e entre as drogas ITRNN nos anos 2006-2015. A dominância da resistência primária aos ITRNN no período de 2000-2005 foi somente observada no Cone Sul. Ainda segundo o estudo supracitado, observa-se que dentre os motivos que levam ao aumento da taxa de resistência secundária nos países da América Latina e Caribe estão a falta de disponibilidade de medicamentos, detecção tardia, intervalo longo entre diagnóstico de realização de assistência e a supressão sub-ótima da carga viral. A análise da resistência a ARV, portanto, se faz necessária à garantia da eficácia do cuidado e do tratamento (AVILA-RIOS et al., 2016).

Segundo Brites et al (2016), 1.481 genotipagens foram realizadas em PVHA de seis grandes cidades do Brasil: Salvador (552), Vitória (246), Fortaleza (219), Rio de Janeiro (152), Porto Alegre (112) e Campinas (102 testes). De acordo com o estudo, 43,1% dos pacientes estavam apresentando falha do segundo esquema terapêutico, 37,8% apresentavam falha do primeiro regime de tratamento e 15% já haviam apresentado falha de três ou mais esquemas terapêuticos. Tendo em vista o esquema terapêutico de primeira linha vigente (ITRN + ITRNN) observa-se a predominância da resistência a ARV dessas classes nas amostras analisadas pelo estudo, a exemplo de São Paulo e Rio Grande do Sul que apresentaram respectivamente 92% e 58% de resistência a ITRNN. Foram observadas, entretanto, altas taxas de resistência a Inibidores de Protease (IP) na Bahia e no Rio Grande do Sul (30 e 50% respectivamente), o que denota que a resistência a essa classe de drogas tem se tornado mais expressiva ao longo dos anos.

Dessa maneira, a identificação da prevalência anual da resistência secundária no estado de Pernambuco, bem como as mutações associadas à falha virológica em cada classe de medicamentos poderá contribuir para o acompanhamento sistemático da eficácia dos tratamentos.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Identificar a prevalência das mutações genéticas do HIV-1 capazes de desencadear resistência secundária a ARV (ITRNN, ITRN, IP) e a frequência dos subtipos virais em pessoas vivendo com HIV/Aids no estado de Pernambuco no período de 2010 a 2015.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar o perfil demográfico, características imunológicas e virológicas das PVHA que apresentaram falha terapêutica e se submeteram à realização do teste de genotipagem no LACEN-PE no período de 2010 a 2015;
- Determinar a prevalência de mutações do gene *pol* do HIV-1 nas regiões das enzimas transcriptase reversa e protease associadas a resistência aos antirretrovirais das classes ITRNN, ITRN e IP;
- Determinar a evolução temporal da prevalência das mutações associadas à resistência a ARV para cada classe de medicamentos no período de 2010 a 2015;
- Estabelecer a frequência dos subtipos do vírus HIV-1 no estado de Pernambuco e a evolução do perfil genotípico viral no período de 2010 a 2015.

4 MATERIAIS E MÉTODO

4.1 DESENHO DO ESTUDO

Estudo descritivo observacional transversal realizado a partir da análise dos resultados dos testes de genotipagem desenvolvidos no Laboratório Central de Saúde Pública do Estado de Pernambuco (LACEN-PE) de amostras de sangue de pessoas vivendo com HIV/Aids no estado de Pernambuco, cujo tratamento apresentou falha devido à resistência secundária a ARV no período de janeiro de 2010 a dezembro de 2015. Os testes de genotipagem realizados no LACEN-PE nesse período identificou as mutações nos genes da Transcriptase Reversa (TR) e da Protease capazes de desencadear resistência aos fármacos das classes ITRN, ITRNN e IP obtidos através do laudo *Trugene Siemens*.

4.2 POPULAÇÃO DO ESTUDO

Pessoas vivendo com HIV/Aids residentes no estado de Pernambuco no período de janeiro de 2010 a dezembro de 2015 que apresentaram falha terapêutica devido à resistência secundária a ARV e realizaram o supracitado teste no LACEN-PE.

4.3 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Foram excluídos os testes de genotipagem de gestantes e de pessoas com idade inferior a 18 anos. Para esses indivíduos o protocolo do Ministério da Saúde recomenda a realização do teste de genotipagem tão logo sejam diagnosticados, dessa maneira não se identificaria a resistência secundária nessas amostras.

4.4 DEFINIÇÃO DE VARIÁVEIS

Variáveis independentes: idade, sexo, procedência, última e penúltima determinação de carga viral, última contagem de linfócitos TCD4+

Variáveis dependentes: mutações detectadas no gene *pol* das regiões da transcriptase reversa e protease contidas na Tabela IAS 2017 (anexo) e a classificação dos subtipos virais.

4.5 CATEGORIZAÇÃO DAS VARIÁVEIS

- A variável sexo foi categorizada como masculino e feminino;
- A variável idade foi categorizada em 18 a 29, 30 a 39, 40 a 49, 50 a 59 e 60 a 89 anos;
- A procedência foi categorizada de acordo com o local de solicitação dos testes de genotipagem em Região Metropolitana do Recife, Zona da Mata, Agreste e Sertão;
- As determinações de carga viral foram categorizadas como <10.000, maior que 10.000 e menor que 100.000, >100.000 cópias/ml e dados não informados.
- A contagem de linfócitos TCD4+ foi determinada em menor ou igual a 100, entre 101 e 200, 201 a 500 e >500 cél/mm³, e dados não informados.

4.6 OPERACIONALIZAÇÃO DO ESTUDO

As amostras recebidas pelo LACEN-PE no período de 2010 a 2015 provenientes de usuários de serviços públicos do estado de Pernambuco que apresentaram falha virológica foram analisadas segundo método TRUGENE HIV-1 Genotyping Assay and OpenGene DNA Sequencing System- SIEMENS. Essa técnica realiza a extração e purificação do RNA viral, seguida pela reação de transcrição reversa (RT) e reação em cadeia de polimerase (PCR), reação de sequenciamento CLIP e eletroforese em gel de poliacrilamida, sendo então obtido o sequenciamento das regiões da Transcriptase Reversa e da Protease no gene pol do HIV-1.

Os laudos obtidos através dessa técnica encontravam-se arquivados no LACEN-PE, dos quais foram resgatados 1040 resultados de testes de genotipagem após exclusão dos usuários oriundos de outros estados, idade inferior a 18 anos e gestantes.

A contagem de “Linfócitos TCD4” observada nos resultados foi reproduzida conforme havia no preenchimento das solicitações do teste de genotipagem enviadas ao LACEN-PE. Os resultados identificados em “Carga Viral” foram obtidos no LACEN-PE no momento anterior à realização do sequenciamento.

4.7 DEFINIÇÃO DE TERMOS

A falha terapêutica é considerada uma resposta subótima ou falta de resposta sustentada à terapia antirretroviral, mediante critérios virológicos, imunológicos e/ou clínicos.). Após recente atualização do Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas (PCDT) 2017, a falha virológica passou a ser determinada pela carga viral de 500 cópias/ml (BRASIL, 2017); porém, no período estudado, a técnica utilizada pelo LACEN-PE realizava a amplificação a partir de CV de 1000 cópias/ml, motivo pelo qual foi mantido o critério em vigência no período de 2010 a 2015.

A resistência secundária ao ARV ocorre em consequência da pressão seletiva exercida pelos antirretrovirais, gerando mutações capazes de reduzir a susceptibilidade a determinado fármaco (BRASIL, 2017).

Quadro 1 – Critérios para Definição de Falha Terapêutica

Falha Virológica	<i>Resposta Incompleta</i> : permanência de níveis detectáveis de carga viral (> 1000 cópias/mL) após 6 meses de tratamento, exceto nos casos de <i>Blips</i> (viremia transitória e isolada abaixo de 500 cópias/mL)
	<i>Rebote Virológico</i> : há supressão da carga viral por um período, porém o paciente volta a apresentar de forma consecutiva (com intervalo de 4 semanas entre as coletas) carga viral > 1000 cópias/mL
Falha Imunológica	<i>Resposta Imunológica Incompleta</i> : incremento menor que 30% nos níveis de LT CD4+ após 12 meses de tratamento.

Quadro baseado no Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Manejo da Infecção pelo HIV em Adultos 2014-(BRASIL, 2014)

4.8 TESTE DE GENOTIPAGEM

O teste de genotipagem analisa a sequência genômica da região do HIV-1 que codifica as enzimas transcriptase reversa e a protease, sendo utilizado a partir da amplificação do ácido ribonucleico (RNA) em ácido desoxirribonucleico (DNA). A

técnica requer o isolamento e purificação do RNA viral do plasma e a posterior síntese do DNA complementar (cDNA) e amplificação pela técnica de PCR (polimerase chain reaction) de uma fração da região *pol* do HIV isolado, levando à obtenção do produto para sequenciamento do gene da protease (códon de 1 a 99) e dois terços do gene da transcriptase reversa (códon de 1 a 335) (CAVALCANTI, 2005). Essa técnica é capaz de identificar as mutações que determinaram a resistência do HIV a ARV além de um instrumento importante para o redirecionamento da terapêutica implementada (MORTENSEN, AZEVEDO & MUNERATO, 2002)

A base de dados da tabela IAS – 2017 (anexo) possibilita a identificação das mutações capazes de gerar resistência aos ARV e foi utilizada para a análise dos resultados. De acordo com a tabela IAS- 2017, as principais mutações indutoras de resistência estão grifadas em negrito e as demais são consideradas mutações, porém apresentam menor capacidade de gerar resistência quando isoladas. As mutações listadas foram identificadas por 1 ou mais dos seguintes critérios: (1) experimentos *in vitro* ou validação da resistência utilizando mutagênese dirigida ao local; (2) teste de susceptibilidade de laboratório ou isolados clínicos; (3) sequenciamento de nucleotídeos de vírus de pacientes cujo tratamento está apresentando falha; (4) associação de estudos entre genótipo e resposta virológica em pacientes expostos à droga (IAS-2017).

4.9 IDENTIFICAÇÃO DO SUBTIPO VIRAL

As sequências genômicas da região *pol* obtidas através do ensaio TRUGENE no formato FASTA foram analisadas pelo Stanford Resistance Data Base da Stanford University para a identificação do subtipo viral de cada amostra.

5 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O estudo foi autorizado segundo parecer favorável do Comitê de Ética do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, CAAE: 68741917.0.0000.5208, Nº do parecer 2.159.028 (Anexo). A utilização dos dados bem como a carta de anuência foram emitidos pelo LACEN-PE conforme anexo.

Uma vez que a pesquisa foi realizada nas dependências do LACEN, por meio do uso de dados, o estudo obteve dispensa de utilização do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

6 RESULTADOS

Resistência Secundária aos Antirretrovirais e Perfil Genotípico Viral de Pessoas Vivendo com HIV/Aids em Pernambuco - Nordeste do Brasil

Introdução

Estima-se que a epidemia pelo HIV atinja cerca de 36,7 milhões de pessoas em todo o mundo (UNAIDS, 2017), das quais 54% não sabem que estão infectadas e cujo tratamento poderá ser iniciado tão logo sejam diagnosticadas. O início precoce de antirretrovirais (ARV) em pessoas que vivem com HIV/Aids (PVHA) tem sido um fator determinante à melhoria da qualidade de vida, redução da mortalidade e preservação ou restauração do status imunológico de PVHA (LUNDGREN, 2015). Apesar dos avanços terapêuticos, um dos principais desafios da pandemia pelo HIV é a capacidade do vírus em gerar altas taxas de mutações e desenvolver resistência à terapia antirretroviral (TARV) (HIVDB, 2016) observada majoritariamente entre os indivíduos que não aderem corretamente à TARV (DIAZ, 2011). A resistência aos antirretrovirais, portanto, deve ser monitorada sistematicamente como ferramenta para contribuir com a ampliação dos recursos terapêuticos.

Segundo recente estudo realizado na América Latina e Caribe há uma tendência global na elevação das taxas de resistência aos ARV notadamente nos países que baseiam seu esquema terapêutico em Inibidores da Transcriptase Reversa Análogo de Nucleosídeos (ITRN) e Inibidores da Transcriptase Reversa não Análogos de Nucleosídeos (ITRNN), como ocorreu no Brasil até 2016 (AVILA-RIOS et al., 2016).

Além disso, o Brasil possui a maior incidência de HIV na América Latina, correspondendo a 49% das novas infecções na região ou em números absolutos, 48.000 novos casos em 2016 (UNAIDS, 2017); dentre os casos novos notificados no período de 2007 a 2016, 53,2% são jovens entre 20 e 34 anos (BRASIL, 2016).

Dada a alta incidência de HIV e a grande prevalência de jovens que iniciará a TARV e fará uso por longo período faz-se necessário avaliar a resistência secundária aos ARV. A análise da prevalência das mutações capazes de desencadear falha virológica à TARV em pessoas vivendo com HIV/Aids no estado de Pernambuco assim como o perfil genotípico viral torna-se, portanto, necessária à avaliação sistemática da evolução da epidemia no estado.

O presente estudo teve como principal objetivo avaliar a resistência secundária aos antirretrovirais em Pernambuco.

Materiais e Método

O estudo foi realizado a partir da análise dos testes de genotipagem realizados no Laboratório Central de Saúde Pública do estado de Pernambuco (LACEN-PE) de pessoas vivendo com HIV/Aids no estado de Pernambuco, cujo tratamento apresentou falha devido à resistência secundária a ARV no período de 2010 a 2015. Foram excluídos os testes de genotipagem de gestantes, de pessoas com idade inferior a 18 anos e procedentes de outros estados para que fosse possível obter estritamente a resistência secundária a ARV no estado de Pernambuco, visto que se preconiza a genotipagem pre-tratamento em menores de 18 anos e mulheres com diagnóstico positivo para HIV durante a gestação (BRASIL, 2015).

As amostras recebidas pelo LACEN-PE no período de 2010 a 2015 provenientes de usuários de serviços públicos do estado de Pernambuco que apresentaram falha virológica foram analisadas segundo método Trugene Siemens. Essa técnica realiza a extração e purificação do RNA viral, seguida pela reação de transcrição reversa (RT) e reação em cadeia de polimerase (PCR), reação de sequenciamento CLIP e eletroforese em gel de poliacrilamida, sendo então obtido o sequenciamento das regiões da Transcriptase Reversa e da Protease no gene pol do HIV-1. Os pacientes que preencheram os critérios de inclusão tiveram os seus laudos pesquisados no banco de dados do LACEN-PE, através do resgate dos resultados impressos ou da localização de registros das sequências genômicas e realização de nova análise segundo o programa *Stanford 2017*. Os dados obtidos foram tabulados segundo as tabelas a seguir através do programa de tabulação de dados IMB SPSS na versão 23.

A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética do Centro de Ciências da Saúde UFPE conforme N° do parecer 2.495.693.

Resultados

A análise do total de 1040 testes de genotipagem conforme a população do estudo, evidenciou dados demográficos, perfil imunológico e virológicos desses indivíduos, assim como a prevalência das mutações e dos subtipos virais ao longo do período de 2010 a 2015. Os dados demográficos revelam que 35,1% das PVHA que

realizaram o teste de genotipagem encontravam-se na faixa etária de 40 a 49 anos, 28,6% possuíam idade entre 30 e 39 anos e mediana de $42,70 \pm 10,42$; 60,1% são do sexo masculino, enquanto 39,9% são do sexo feminino e a procedência referida foi de 95,8% da Região Metropolitana do Recife. (Tabela 1). Quanto aos dados imunológicos e virológicos, observa-se um percentual elevado de pessoas com taxa reduzida de linfócitos T CD4+, totalizando 18,6% das pessoas com $CD4+ \leq 100 \text{ cel/mm}^3$ e 18,6% com $CD4+$ entre 101 e 200 cel/mm^3 , assim como 12,3% das pessoas possuíam carga viral elevada (Tabela 1).

Tabela 1 - Distribuição dos dados demográficos, imunológico e virológicos dos 1040 testes de genotipagem avaliados em Pernambuco 2010-2015

TOTAL: n (%)	1040 (100,0)
Idade: Média $\pm$ DP (Mediana)	42,70 $\pm$ 10,42 (42,00)
Faixa etária: n (%)	
18 a 29	93 (8,9)
30 a 39	297 (28,6)
40 a 49	365 (35,1)
50 a 59	188 (18,1)
60 a 89	57 (5,5)
Não informado	40 (3,8)
Sexo: n (%)	
Masculino	625 (60,1)
Feminino	415 (39,9)
Taxa de Linfócitos CD4: n (%)	
≤ 100	194 (18,7)
101 a 200	194 (18,7)
201 a 500	442 (42,5)
> 500	181 (17,4)
Não informado	29 (2,8)
Classificação da Carga Viral: n (%)	
< 10.000	427 (41,1)
10.000 a 100.000	346 (33,3)
> 100.000	128 (12,3)
Não informado	139 (13,4)
Procedência: n (%)	
RMR	996 (95,8)
Zona da Mata	2 (0,2)
Agreste	9 (0,9)
Sertão	33 (3,2)

Analisando-se os resultados dos testes de genotipagem resgatados, observa-se a elevação do total de laudos obtidos ao longo dos anos (Tabela 2).

Tabela 2 – Distribuição percentual de laudos resgatados/ano. Pernambuco, 2010 a 2015.

TOTAL: n (%)	1040 (100,0)
Ano da ocorrência: n (%)	
2010	178 (17,1)
2011	129 (12,4)
2012	199 (19,1)
2013	182 (17,5)
2014	106 (10,2)
2015	246 (23,7)

Dentre os 1040 exames realizados com resultados obtidos através dos laudos arquivados no LACEN-PE, 23,8% das amostras não foram amplificadas, ou seja, apresentaram carga viral insuficiente para a realização do exame pelo método disponível – protocolo TRUGENE SIEMENS ou pelo laboratório de referência- e foram excluídas das demais análises (Tabela 3).

Dessa forma, o total de amostras consideradas na análise das mutações foi 792, das quais 86,1% apresentaram pelo menos um tipo de mutação capaz de gerar resistência de acordo com a tabela IAS- 2017; pode-se inferir através desse dado que a elevação da carga viral de 13,9% das pessoas ocorreu pela má adesão à TARV uma vez que não foram observadas mutações nas amostras desses indivíduos (Tabela 3).

Tabela 3 – Percentual de amostras com mutações e amostras não amplificadas

Grupo: n (%)	1040
Com mutação	682 (86,1)
Sem mutação	110 (13,9)
Total	792 (100,0)
Amostras não amplificadas	248 (23,8)

Quanto ao número de mutações para cada classe de medicamentos, observa-se que para os Inibidores da Transcriptase Reversa análogos de Nucleosídeos/nucleotídeos 75,9% das amostras possuíam pelo menos uma mutação para essa classe. Os ITRN também apresentaram a maior prevalência de 4 ou mais mutações (14,4%) dentre as classes de antirretrovirais estudadas (Tabela 4).

Tabela 4 – Prevalência de mutações para cada classe de medicamentos

Classificação do número de mutações - Classe ITRN: n (%) ⁽¹⁾	
Nenhuma	191 (24,1)
Uma	275 (34,7)
2 a 3	212 (26,8)
4 ou mais	114 (14,4)
Classificação do número de mutações – Classe ITRNN: n (%) ⁽¹⁾	
Nenhuma	309 (39,0)
Uma	170 (21,5)
Duas	250 (31,6)
Três ou mais	63 (8,0)
Classificação do número de mutações - Classe IP: n (%) ⁽¹⁾	
Nenhuma	614 (77,5)
Uma	61 (7,7)
Duas	62 (7,8)
Três ou mais	55 (6,9)

A análise do número de amostras com mutações considerando a presença destas para cada classe de medicamentos evidencia que a combinação ITRN + ITRNN possui a maior vulnerabilidade às mutações secundárias aos ARV (42,6%) e um percentual significativo das amostras possui mutações para as três classes de medicamentos analisados (9,7%) (Tabela 5)

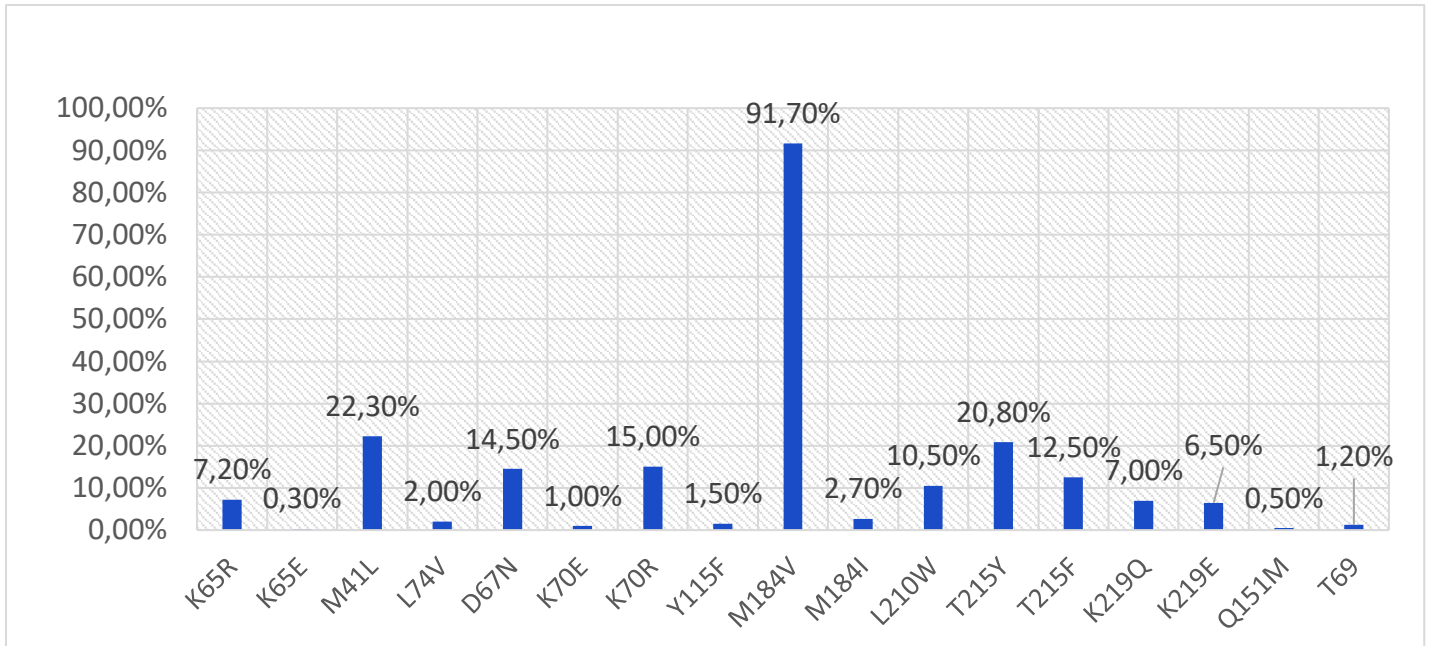
Tabela 5 – Prevalência de mutações para cada classe de ARV e associações

Mutações combinadas: n (%) ⁽¹⁾	
Sem mutação	110 (13,9)
ITRN	100 (12,6)
ITRN + ITRNN	337 (42,6)
ITRN + IP	87 (11,0)
ITRNN	67 (8,5)
ITRNN + IP	2 (0,3)
IP	12 (1,5)
ITRN+ ITRNN + IP	77 (9,7)

(1) Os valores percentuais foram obtidos com base no número total de 792 pacientes com ou sem mutação (foram excluídos os casos de comunicado)

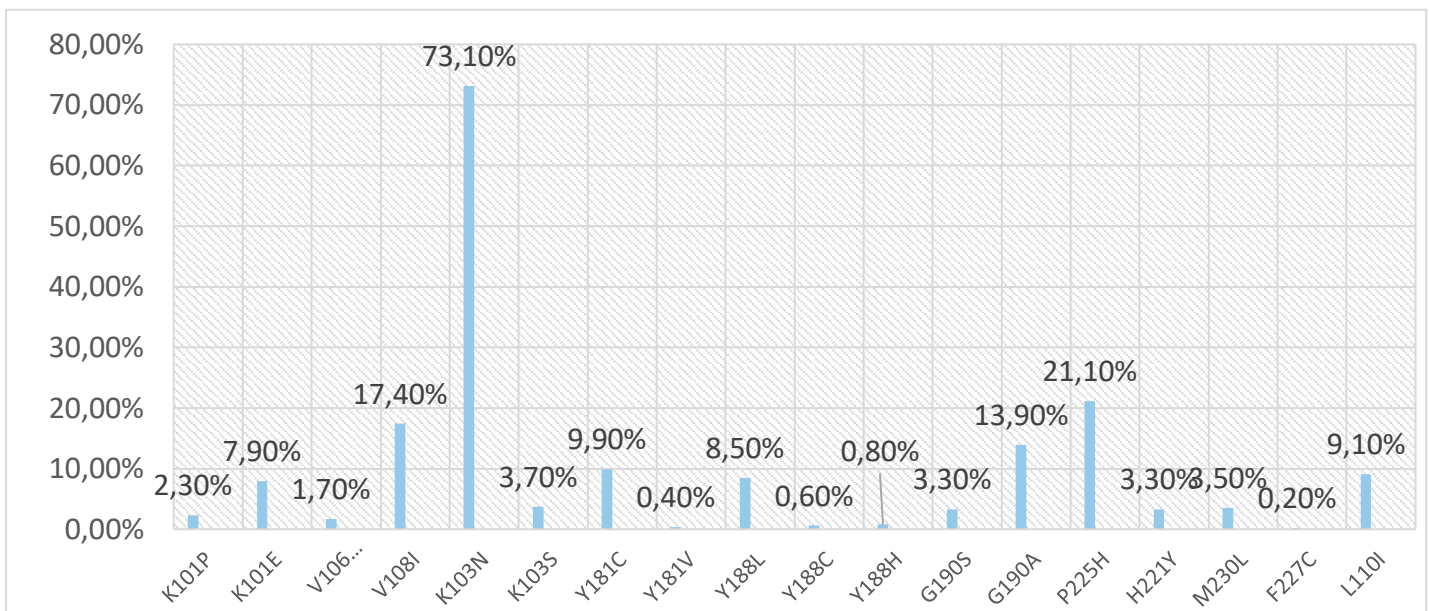
A prevalência das mutações capazes de desencadear resistência de acordo com a Tabela IAS- 2017 evidenciou que a mutação M184V esteve presente em 91,7% dentre as amostras com resistência aos ITRN, seguida pela mutação T215Y/F observada em 33,3% das amostras de indivíduos que possuíam mutações associadas a resistência aos ITRN.

Gráfico 1 – Distribuição percentual de mutações relacionadas aos Inibidores da Transcriptase Reversa análogos de Nucleosídeo/nucleotídeo – Pernambuco, 2010 a 2015.



A mutação mais prevalente associada à classe dos Inibidores da Transcriptase Reversa não análogos de Nucleosídeo (ITRNN) foi a K103N – presente em 73,1% das amostras – seguida pela P225H (21,1%), conforme gráfico 2.

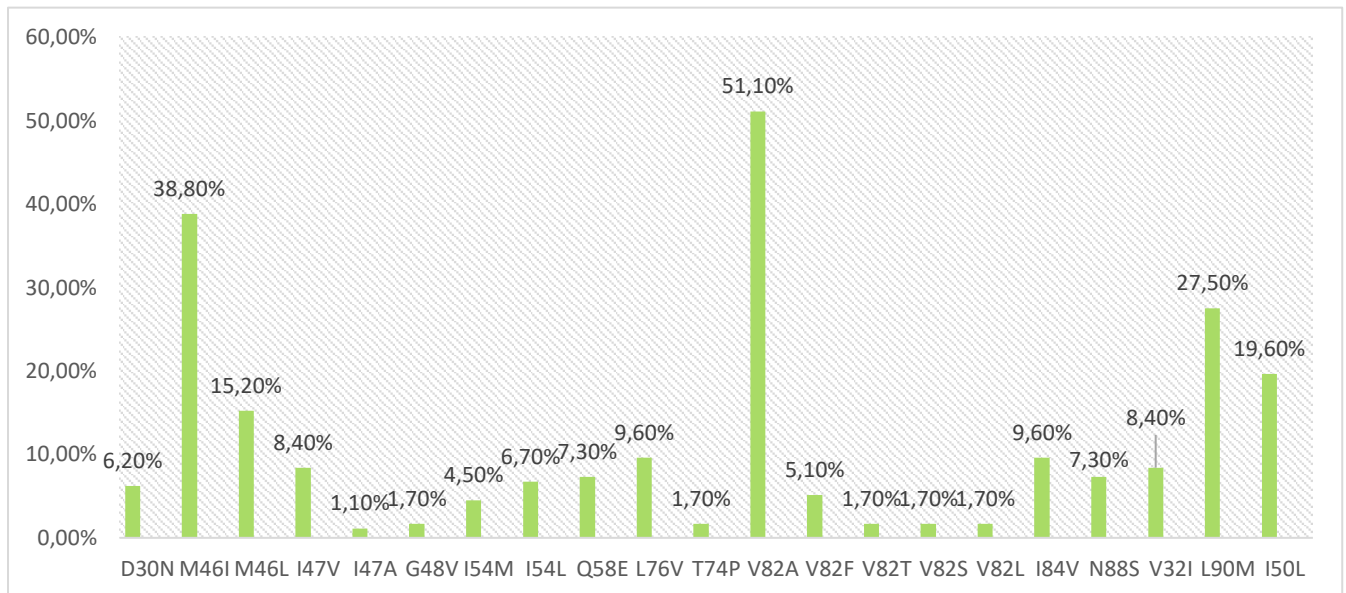
Gráfico 2 – Distribuição percentual de mutações relacionadas aos Inibidores da Transcriptase Reversa não análogos de Nucleosídeo– Pernambuco, 2010 a 2015



Considerando as mutações *Major* associadas aos Inibidores de Protease, ou seja, as mutações capazes de gerar resistência, a mutação mais prevalente foi a

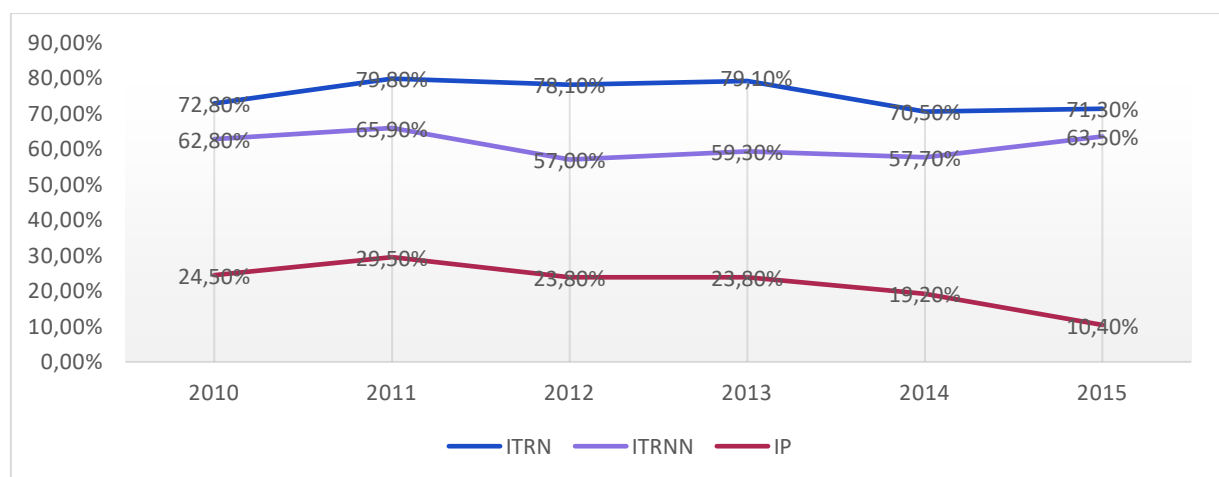
V82A/F/T/S/L, totalizando 61,3% das amostras, notadamente a V82A, que isoladamente totalizou 51,1% das amostras, seguida pela mutação M46I/L, que correspondeu a 54% das mutações *major*.

Gráfico 3 - Distribuição percentual de mutações *Major* relacionadas aos Inibidores de Protease – Pernambuco, 2010 a 2015



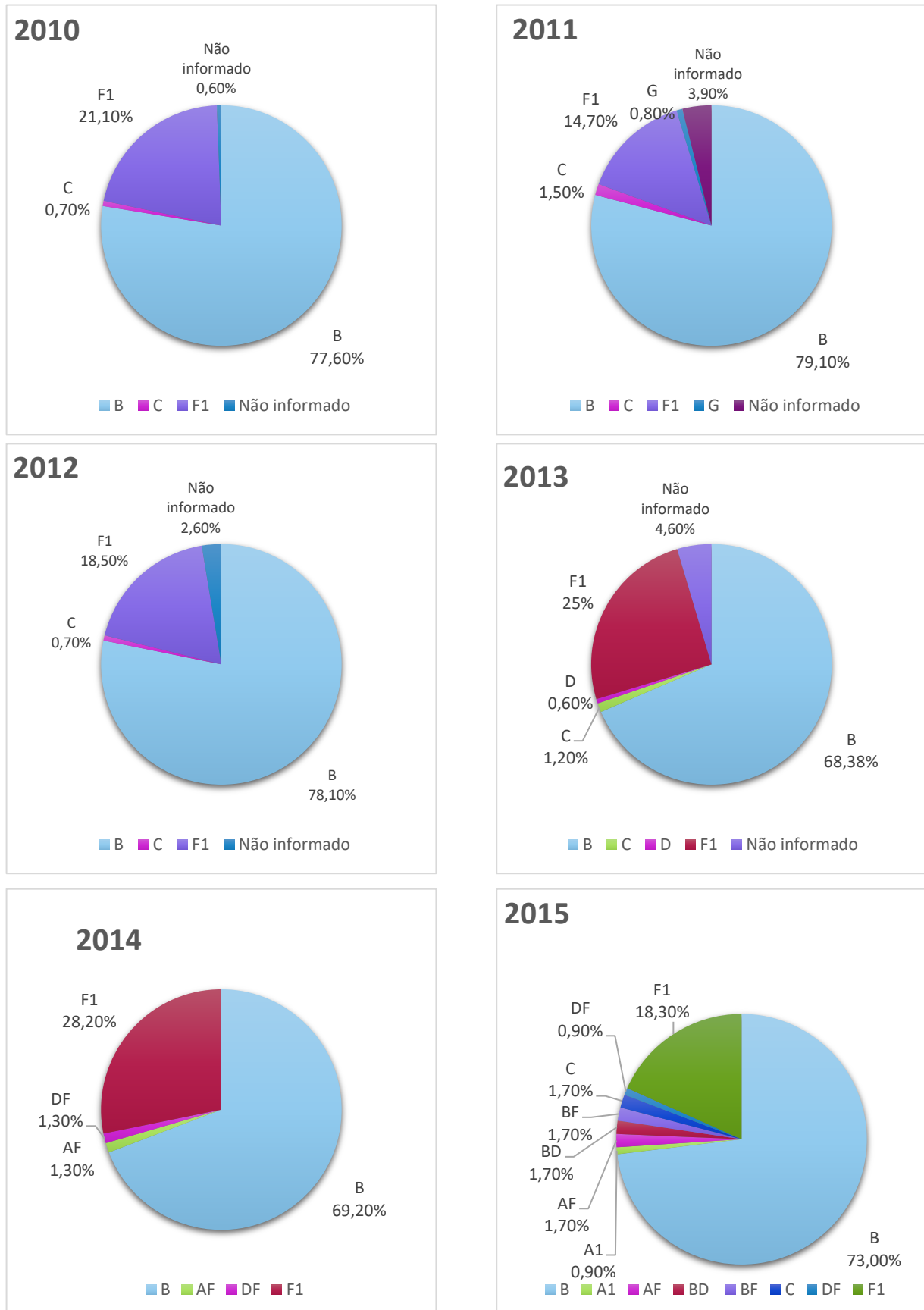
O gráfico 4 demonstra a tendência de estabilização do percentual de mutações associadas aos antirretrovirais ao longo dos anos; percebe-se também que o percentual de amostras com mutações associadas à resistência aos IP evolui com redução significativa.

Gráfico 4 – Distribuição do percentual de amostras com mutações associadas às classes de mutações – Pernambuco - 2010 a 2015.



Quanto à distribuição dos percentuais de subtipos virais e formas recombinantes circulantes (CRF) o gráfico 5 evidencia uma alta prevalência dos subtipos B e F1. Entretanto, ao longo dos seis anos do estudo observa-se o crescente percentual de CRFs, demonstrando a grande variabilidade genética do HIV-1.

Gráfico 5 – Evolução da distribuição percentual de Subtipos Virais e CRFs do HIV-1. Pernambuco, 2010 a 2015.



Discussão

O atual estudo reflete dados significativos do período imediatamente anterior à instituição do protocolo que determina a disponibilização de ARV a todas as PVHA, assim como antecede a introdução do Inibidor de Integrase na primeira linha do esquema terapêutico. Segundo os dados demográficos analisados foi identificada uma prevalência elevada de adultos jovens que evoluíram para falha virológica em consonância com o recente boletim epidemiológico que relatou percentual de 52,3% de novos casos entre jovens de 20 a 34 anos (BRASIL, 2016). Esse dado pode estar associado às menores taxas de adesão entre os jovens em decorrência da fase de vida menos estável (SABIN, 2008). A predominância de homens em relação às mulheres também se mantém no presente estudo, entretanto observa-se a elevação do percentual de mulheres quando comparado a estudos anteriores (CAVALCANTI, 2005), denotando a feminização da pandemia pelo HIV, a exemplo do que vem ocorrendo no Brasil, onde 49,4% das PVHA são mulheres. Percebe-se ainda uma alta prevalência de exames solicitados na Região Metropolitana do Recife em relação às demais regiões do estado reflexo da maior concentração e acesso aos serviços de saúde na RMR, bem como o maior percentual de PVHA nessa região.

Quanto aos dados imunológicos, observa-se que 37,4% das pessoas que realizaram o teste de genotipagem apresentavam resultados críticos de contagem de CD4+ e encontravam-se em risco iminente de desfechos desfavoráveis (BRASIL, 2017). As determinações de carga viral denotam, entretanto, que ao longo dos anos houve maior percentual de diagnóstico precoce da falha virológica em relação aos estudos anteriores (CAVALCANTI, 2005), possível resultado da ampliação da assistência a PVHA, embora ainda persistam percentuais elevados de diagnósticos tardios. As iniquidades em saúde são as expressões mais nocivas das desigualdades sociais e econômicas e devem ser um argumento relevante para modificar a prioridade dada ao crescimento econômico, trazendo o desenvolvimento humano para o coração do debate (MARMOT, 2015). O atual estudo demonstra maior percentual de PVHA com contagens de CD4+ inferiores a 200 cel/mm³ em relação ao estudo nacional realizado por Diaz et al (2015) segundo o qual 1/3 dos pacientes estudados no período de 2001 a 2009 apresentavam níveis críticos de contagem de CD4+; é necessário ressaltar, entretanto, que as disparidades socioeconômicas entre as regiões no Brasil podem justificar uma melhor média nacional em comparação ao resultado obtido pelo estudo em Pernambuco.

Foi observado também elevado percentual de exames solicitados que não preenchiam os critérios do teste de genotipagem, sendo consideradas 792 amostras, das quais 86,1% apresentaram pelo menos um tipo de mutação capaz de gerar resistência de acordo com a tabela IAS- 2017.

Pode-se inferir através desse dado que a elevação da carga viral de 13,9% das pessoas ocorreu pela má adesão à TARV uma vez que não foram observadas mutações nas amostras desses indivíduos. Observa-se, portanto, que embora os países em desenvolvimento evidenciem maiores taxas de adesão em relação aos países de maior índice de desenvolvimento humano (IDH) e produto interno bruto (PIB), os países periféricos contraditoriamente apresentam menores taxas de supressão viral possivelmente devido a permanência de PVHA em esquemas terapêuticos em falha, pelo acesso limitado aos serviços de saúde e a exames laboratoriais assim como o uso de tratamentos antirretrovirais obsoletos (COSTA et al., 2018). Dentre os fatores apontados como mais relevantes para a má adesão estão o uso abusivo de álcool e outras drogas além do desemprego; estigma social, depressão e falta de provisão têm sido menos relatados nos estudos mais recentes (NACHEGA et al., 2015 apud COSTA et al., 2018).

Quanto à distribuição da frequência de mutações em relação à classe de medicamentos, os dados evidenciaram que houve maior percentual de mutações associadas à resistência aos Inibidores da Transcriptase Reversa Análogos de Nucleosídeos quando comparados às demais classes, revelando a maior susceptibilidade dos fármacos dessa classe às mutações capazes de desencadear resistência. Dentre os 792 resultados observados, 601 possuíam mutação para ITRN, totalizando 75,9% das amostras; em segundo lugar estão os ITRNN, com 61,0% das amostras com mutações e por fim, corroborando com estudos anteriores, os Inibidores de Protease que possuem maior barreira genética, evidenciando mutações *Major* em 22,5% das amostras. Houve, portanto, decréscimo do percentual de mutações observadas nas três classes de medicamentos em relação ao estudo de Cavalcanti (2005); observa-se, porém, que o estudo anterior quantificou mutações primárias e secundárias enquanto o método utilizado na presente pesquisa identificou as mutações capazes de gerar resistência associada aos antirretrovirais: as mutações principais. Analisando-se o estudo de Diaz et al (2015), percebe-se que já havia uma tendência de redução da resistência associada aos ITRN e aos IP no período de 2001 a 2009, embora o percentual de mutações associadas à resistência aos ITRN

permanença maior em relação às demais classes. Pode-se inferir ainda que a redução da resistência associada aos inibidores de protease foi influenciada diretamente pela paulatina associação do IP (Lopinavir, Atazanavir) ao ritonavir ao longo dos anos (DIAZ et al, 2015) e pela disponibilização desse fármaco na apresentação termoestável a partir de 2014 uma vez que numerosas mutações são necessárias para um impacto substancial na resposta virológica do Inibidor de protease associado ao ritonavir (IAS, 2017).

Quanto à análise da resistência secundária aos ARV segundo a combinação das classes de medicamentos, observa-se maior prevalência na combinação de mutações associadas aos ITRN e aos ITRNN (42,6%), notadamente o esquema de primeira linha em uso no Brasil até dezembro de 2016 (BRASIL, 2016), em consonância com o estudo de Avila-rios et al (2016). A resistência simultânea às três classes (ITRN, ITRNN e IP) foi identificada em 11,2% do total de amostras com mutações, resultado inferior ao obtido pelo estudo anterior (CAVALCANTI, 2005). A mutação mais frequente associada à resistência aos ITRN foi a do códon 184, M184V, presente em 91,7% das amostras; essa mutação induz resistência ao Abacavir (exceto quando encontra-se isolada), à Lamivudina e à Emcitabina e possui ação ambígua uma vez que a sua presença retarda o aparecimento das mutações associadas à timidina (TAM); esse efeito, entretanto, é anulado pelo acúmulo de mutações TAM (IAS, 2017). Quanto às mutações associadas à multidroga resistência, verifica-se a estabilização de baixos percentuais da mutação Q151M e da inserção no códon 69 presente em 0,5% e 1,2% respectivamente.

Para a classe do ITRNN, observa-se que a mutação mais prevalente associada a essa classe foi a K103N, capaz de gerar resistência ao Efavirenz e à Nevirapina, largamente utilizados no Brasil. Quanto à mutação mais prevalente associada à resistência aos Inibidores de Protease, a V82A/F/T/S/L foi identificada em 61,3% das amostras, notadamente a V82A, relacionada à falha do esquema com Lopinavir/ritonavir. Embora existam evidências de que é necessário o acúmulo de 7 a 8 mutações associadas à resistência aos IP para que haja perda da opção terapêutica, segundo a tabela IAS (2017) a presença de I47A (1,1% de prevalência nas amostras) – e possivelmente I47V (8,4%) -, V32I (8,4%) e L76V (9,6%) eleva substancialmente a resistência ao LPV/r. Quanto às mutações relacionadas à resistência ao Atazanavir/ritonavir, observa-se um percentual elevado de M46IL (54%), I50L (19,6%), I84V (9,3%) e N88S (7,3%), significativamente maior em relação às indutoras de resistência ao LPV/r. Levando-se em consideração a recente substituição do esquema

antirretroviral LPV/r pelo ATV/r segundo nota técnica 059/2017 do Ministério da Saúde do Brasil pode-se inferir que ocorrerá elevação do número de pessoas que farão uso desse fármaco, tornando-se necessário ampliar a monitorização dessas mutações. A estabilização da frequência de mutações associadas à resistência, conforme análise do percentual de amostras com mutações associadas à resistência para cada classe de fármacos por ano no período de 2010 a 2015 é corroborada pelo estudo de Diaz et al (2015) segundo o qual no período de 2009 a 2011 houve uma elevação favorável nos níveis de CD4+ de pacientes em uso de antirretrovirais e 77,1% dos pacientes em uso de antirretrovirais possuíam carga viral abaixo de 400 cópias/ml. Esses dados refletem os resultados do estudo sobre a incidência global, regional e nacional e mortalidade do HIV, malária e Tuberculose no período de 1990 e 2013 que evidenciou redução de 2,3% da taxa de mortalidade de PVHA no Brasil (2000 a 2013) (MURRAY et al, 2014).

A análise da evolução dos subtipos virais demonstra a expressiva variabilidade genética do HIV-1 e sua correlação com os dados epidemiológicos no Nordeste, região que vem apresentando tendência linear de crescimento da incidência (BRASIL, 2017). Ao longo do período estudado observa-se, notadamente no ano de 2015 a presença de maior percentual de CRFs em relação aos anos anteriores, a exemplo do que vem sendo reportado no Nordeste. Segundo Delatorre et al (2017), amostras de 140 pacientes de Alagoas, Bahia, Ceará e Piauí demonstraram que o subtipo B é o mais prevalente (72%), seguido por F1 (6%), C (5%) e D (1%); os 16% restantes evidenciaram estruturas recombinantes das quais BF1 totalizou 11%, BC 4%, BCF1 (1%), CRF02_AG *like* (1%). Esses resultados revelam a complexa variabilidade do HIV-1 e sua capacidade de gerar formas recombinantes, a exemplo do que foi verificado nos estudos com sequenciamento das regiões gag, pol e env do HIV-1 através da técnica full-length genome apresentando frequência elevada de BF1 no Nordeste: 21% em 2011 e 27% em 2016 (MONTEIRO-CUNHA, 2011; PESSÔA et al 2016; SANTOS et al 2011). A atualização da prevalência das formas recombinantes, principalmente BF1, por meio da técnica *full-length genome* faz-se necessário uma vez que há discordâncias quanto ao percentual estimado segundo a técnica utilizada. Além disso, a análise da evolução do subtipo recombinante BF1 notadamente no Nordeste torna-se relevante para a saúde pública tendo em vista a rápida progressão para AIDS nas pessoas infectadas por esse subtipo (LEITE, et al.,2017).

O monitoramento da resistência aos ARV assim como a realização de ações que minimizem os fatores associados ao desenvolvimento das mutações de

resistência torna-se, dessa forma, um grande desafio no combate à epidemia do HIV, notadamente ampliar o acesso aos serviços, à realização da genotipagem e das ações em adesão. Identificar mecanismos relacionados à variabilidade genética e reconhecer o processo de evolução dos subtipos virais e sua relação com o desenvolvimento de resistência são parte desse processo que requer ações conjuntas entre pesquisadores, usuários e gestores em saúde.

Conflito de Interesses: Não houve conflito de interesses no processo de realização da presente pesquisa.

7 CONCLUSÕES

1) O estudo sugere que a prevalência das mutações associadas à resistência aos antirretrovirais vem apresentando uma tendência de estabilização em relação aos estudos anteriores, em consonância com a ampliação do acesso a antirretrovirais com maior barreira genética e disponibilização de apresentações farmacológicas mais fáceis de armazenar e ingerir. Observa-se também que esse resultado tem estreita relação com a elevação do percentual de supressão viral entre as PVHA e redução da mortalidade evidenciadas em estudos recentes que denotam melhores taxas de adesão e oferta de serviços de saúde, embora ainda seja necessário ampliar o diagnóstico precoce e o acompanhamento clínico das PVHA. Essa análise é corroborada pelo elevado percentual de usuários que evoluem com contagem de CD4+ inferior a 200cel/mm³ no momento da realização do teste de genotipagem.

2) Quanto à frequência de amostras com mutações associadas à resistência aos antirretrovirais, 86,1% apresentaram pelo menos um tipo de mutação capaz de gerar resistência de acordo com a tabela IAS- 2017, das quais os ITRNs apresentaram maior percentual de mutações (75,9%), seguidos pelos ITRNN (61,0%) e IPs (22,5%).

3) A variabilidade genética do HIV-1 também é expressa pelo aumento da prevalência de CRFs ao longo dos anos estudados conforme evolução observada nos demais estados do Nordeste.

4) Conhecer o processo evolutivo do HIV-1, assim como o desenvolvimento de resistência é parte essencial ao desenvolvimento de ações e estratégias que minimizem os efeitos danosos da falha virológica; torna-se necessário, portanto, ampliar a identificação do perfil genotípico viral através de estudos mais representativos com sequenciamento de regiões gag, pol e env, bem como a identificação de ações em adesão, com participação de profissionais, pesquisadores, usuários e gestores para reduzir a transmissibilidade de cepas resistentes.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. et al. **Cellular and Molecular Immunology**. Elsevier. 9ª edição, 2017.

AVILA-RIOS, S. et al. Surveillance of HIV Transmitted Drug resistance in Latin America and the Caribbean: A Systematic Review and Meta-Analysis. **PloS One**, 2016.

BARTH, R. et al. Virological follow-up of adult patients in antiretroviral treatment programmes in sub-Saharan Africa: a systematic review. **The Lancet Infectious Diseases** , Volume 10 , 155 - 166

BAXTER J.D. et al. A randomized study of antiretroviral management based on plasma genotypic antiretroviral resistance testing in patients failing therapy. Study Team for the Terry Bein Community Programs for Clinical Research on AIDS. **AIDS**, 2000.

BORROTO-ESODA, K. et al. In vitro evaluation of the anti-HIV activity and metabolic interactions of tenofovir and emtricitabine. **Antivir Ther**, 2006.

BRASIL. Comissão Nacional pela Incorporação de Tecnologias no SUS. **Dolutegravir sódico para terceira linha de tratamento da infecção pelo HIV** (Vírus da Imunodeficiência Humana) Brasília, 2015.

BRASIL. Comissão Nacional pela Incorporação de Tecnologias no SUS. **Maraviroque para pacientes em terapia antirretroviral**. Brasília, 2012.

_____Ministério da Saúde. **Boletim Epidemiológico 2016**. Brasília, 2016.

_____Ministério da Saúde. **Nota Informativa nº 007, de 2017/DDAHV/SVS/MS**, Brasília, 2017.

_____Ministério da Saúde. **Nota Informativa nº 059, de 2017/DDAHV/SVS/MS**, Brasília, 2017.

_____Ministério da Saúde. **Nota Informativa nº 096, de 2016/D DDAHV/SVS/MS**. Brasília, 2016.

_____Ministério da Saúde. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Manejo da infecção pelo HIV em adultos**. Brasília, 2015.

_____. Ministério da Saúde. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Manejo da infecção pelo HIV em adultos**. Brasília, 2017.

BRENNAN, C.A. et al. HIV global surveillance: foundation for retroviral discovery and assay development. **J Med Virol**, 2006

BRITES, C. et al. Extensive variation in drug-resistance mutational profile of Brazilian patients failing antiretroviral therapy in five large Brazilian cities. **Braz J Infect Dis**, 2016.

BRITO, M.A. Fármacos recentes usados para o tratamento da infecção pelo HIV-1: enfuvirtida, maraviroc, raltegravir e etravirina, **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, 2011.

CARR, J.K. et al. Reference Sequences Representing the Principal Genetic Diversity of HIV-1 in the pandemic. **Human Retroviruses and AIDS**, 1998

CAVALCANTI, A.M.S. **Resistência secundária aos anti-retrovirais em indivíduos com AIDS e prevalência de subtipos do HIV-1 no Nordeste do Brasil: 2002 a 2005**. Dissertação de Mestrado – Medicina Tropical, UFPE, Recife. <<https://repositorio.ufpe.br/handle/123456789/7430>> acessado em 13/04/2016

CAVALCANTI, A.M.S. et al. Primary resistance of HIV to antiretrovirals among individuals recently diagnosed at voluntary counselling and testing centres in the metropolitan region of Recife, Pernambuco, **Mem. Instituto Oswaldo Cruz**, 2012.

CLAVEL, F. HIV-2, the West African AIDS virus. **AIDS**.v.1(3):p.135-40, 1987.

COSTA, L.J. et al. Generation of Intersubtype Human Immunodeficiency Virus Type 1 Recombinants in env Gene In Vitro: Influences in the Biological Behavior and in the Establishment of Productive Infections. **Virology**, 268: 440-451, 2000.

COSTA, J.D.M. et al Adherence to antiretroviral therapy for HIV/AIDS in Latin America and the Caribbean: Systematic review and meta-analysis. **Journal of the International AIDS Society**, 2018.

DE BETHUME M.P., HERTOGS, K. Screening and selecting for optimized antiretroviral drugs: rising to the challenge of drug resistance. **Curr Med Res Opin** 2603–12,2006.

DELATORRE, et al. HIV-1 Genetic Diversity in Northeastern Brazil: high prevalence of non-B subtypes.. **AIDS RESEARCH AND HUMAN RETROVIRUSES** , 2017.

DIAZ, R.S. **Guia para Manuseio de Resistência Antirretroviral**. 1. ed. São Paulo: Permanyer Brasil, 2011.

DIAZ, R.S. et al. The Virological and Immunological Characteristics of the HIV-1-Infected Population in Brazil: From Initial Diagnosis to Impact of Antiretroviral Use. **Plos One**, 2015.

DURANT, J. et al. Drug-resistance genotyping in HIV-1 therapy: the VIRADAPT randomised controlled trial, **The Lancet**, 1999.

FANG, G.B. et al. Recombination following superinfection by HIV-1. **AIDS**. ed 23. n 18. vol 2. P. 153-9. Jan. 2004.

FROST SD, et al. Evolution of lamivudine resistance in human immunodeficiency virus type 1-infected individuals: the relative roles of drift and selection. **J Virol**, 2000.

GODFREY, C. et al. Regional Challenges in the Prevention of Human Immunodeficiency Virus Drug Resistance. **J Infect Dis**, 2017

HAMERS, R.L. et al. Effect of pre-treatment HIV-1 drug resistance on immunological, virological, and drug-resistance outcomes of first-line antiretroviral treatment in sub-Saharan Africa: a multicentre cohort study. **The Lancet Infect Dis**, 2012.

HERTTOGS, K. et al. A rapid method for simultaneous detections of phenotypic resistance to inhibitors of protease and reverse Transcriptase in recombinant human immunodeficiency virus type 1 isolates from patients treated with antiretrovirals drugs. **Antimicrob agentes Chemoter**, 1998.

HIVDB, HIV drug resistance database. Disponível em < <https://hivdb.stanford.edu>> acessado em: 12 de setembro de 2016.

IAS – USA -2017. Topics in Antiviral Medicine. <
<https://www.iasusa.org/sites/default/files/2017-drug-resistance-mutations-hiv-1-figure.pdf> > acessado em 15 de setembro de 2017.

KASPER, D.L. et al., **Medicina Interna de Harrison**, Cap. 182.19ª Ed. Porto Alegre, AMGH Editora, 2017.

KEARNEY, B.P., FLAHERTY, J.F. & SHAH, J. Tenofovir Disoproxil Fumarate. **J. Clin Pharmacokinet** (2004) 43: 595.

LAU, K.A.; WONG, J.J. Current Trends of HIV Recombination Worldwide. **Infect Dis Rep**, 2013.

LEITE, TC. et al. Impact of HIV-1 Subtypes on AIDS Progression in a Brazilian Cohort. **AIDS Res Hum Retroviruses**. Jan 2017;33(1):41- 48.

LIMA, K. et al. Epidemiological, Clinical and Antiretroviral Susceptibility Characterization of Human Immunodeficiency Virus Subtypes B and Non-B in Pernambuco, Northeast Brazil. **Plos One**, 2016.

LIMA, K. et al. Increase in human immunodeficiency virus 1 diversity and detection of various subtypes and recombinants in north-eastern Brazil. **J Med Microbiol**, 2017.

LOS ALAMOS - NATIONAL LABORATORY HIV DATABASE – HIV SEQUENCE DATABASE <hiv-web.lan.org> acesso em 12 de janeiro 2018.

LUNDGREN, J. D. et al. Initiation of antiretroviral therapy in early asymptomatic HIV infection- START. **New England Journal of Medicine**, Copenhagen, v. 373, n. 9, p.795-807, 27 ago. 2015.

MALAN, D.R. et al. Efficacy and safety of atazanavir, with or without ritonavir, as part of once-daily highly active antiretroviral therapy regimens in antiretroviral-naive patients. **J Acquir Immune Defic Syndr**, 2008.

MANDELL, G.L. et al. Principles and Practice of Infectious Diseases. 8ª ed. 2016.

Philadelphia, PA: **Elsevier Churchill Livingstone**; 2005:1477-2133

MARLINK, R. et al. Reduced rate of disease development after HIV-2 infection as compared to HIV-1. **Science**. 9;265(5178), p.1587-90. Sep. 1994.

MARMOT, M. The health gap: the challenge of an unequal world. *The Lancet*, Vol 386. 2015.

MEDEIROS L.B. et al. Primary resistance of human immunodeficiency virus type 1 in a reference center in Recife, Pernambuco, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, 2006.

MELIKIAN, G.L. et al. Standardized Comparison of the Relative Impacts of HIV-1 Reverse Transcriptase (RT) Mutations on Nucleoside RT Inhibitor Susceptibility. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 2012.

MEYER, P.R. et al. Differential removal of thymidine nucleotide analogues from blocked DNA chains by human immunodeficiency virus reverse transcriptase in the presence of physiological concentrations of 2'-deoxynucleoside triphosphates. **Antimicrob Agents Chemother**, 2000.

MONTEIRO-CUNHA, J.P, et al. Lack of high-level resistance mutations in HIV Type 1 BF recombinant strains circulating in northeast Brazil, **AIDS Res Hum Retroviruse**, 2011.

MORTENSEN, C; AZEVEDO, M.L.; MUNERATO, P. **Manual de Genotipagem do HIV**. São Paulo. Applied Biosystems do Brasil, 2002.

MURRAY, C.J.L. et al. Global, regional, and national incidence and mortality for HIV, tuberculosis, and malaria during 1990–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. **The Lancet**, 2014.

NACHEGA, JB. et al. Association between antiretroviral therapy adherence and employment status: systematic review and meta-analysis. *Bull World Health Organ*, 2015.

PESSÔA, R. et al. Ultra-Deep Sequencing of HIV-1 near Full-Length and Partial Proviral Genomes Reveals High Genetic Diversity among Brazilian Blood Donors. **PLoS One**, 2016.

PETROPOULOS, C.J. et al. A novel phenotypic drug susceptibility assay for human immunodeficiency virus type 1. **Antimicrobs Agents Chemother**, 2000.

PINOGE, L. et al. Risk factors and mortality associated with resistance to first-line antiretroviral therapy: a multicentric cross-sectional and longitudinal analyses **J Acquir Immune Defic Syndr**, 2015.

ROBBINS, G.K. et al. Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor (NNRTI) cross-resistance: implications for preclinical evaluation of novel NNRTIs and clinical genotypic resistance testing. **J Antimicrob Chemother**, 2014.

ROBERT, J. et al. Evolutionary Dynamics of Complex Networks of HIV Drug-Resistant Strains: The Case of San Francisco. **Science**, 2010.

ROBERTSON, D.L. et al. HIV-1 Nomenclature Proposal. A Reference Guide to HIV-1 Classification. HIV-1 Nomenclature, 1999.

SABIN, CA. et al. Response to combination antiretroviral therapy: variation by age. **AIDS**. 2008.

SANTOS, L.A. et al. Detection of Distinct Human Immunodeficiency Virus Type 1 Circulating Recombinant Forms in Northeast Brazil. **Journal of Medical Virology**, 2011.

SAX, P.E. et al. Abacavir/lamivudine versus tenofovir DF/emtricitabine as part of combination regimens for initial treatment of HIV: final results. **J Infect Dis**, 2011.

PERNAMBUCO. Secretaria Estadual de Saúde. **Boletim DST/AIDS 2016**. Recife, 2016.

SOULIE, C. et al, Antiretroviral-naïve and -treated HIV-1 patients can harbour more resistant viruses in CSF than in plasma. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 2014.

STANFORD UNIVERSITY, *Stanford Sequence Resistance Database*. Stanford, 2017.
<<http://hivdb.stanford.edu>> acesso em 18 de setembro de 2017.

UNAIDS. **Ending AIDS: progress towards the 90-90-90 targets**. 2017

UNAIDS. **Resumo Informativo – Dia Mundial contra a AIDS**. 2017.

WHO. **Guideline on when to start antiretroviral therapy and on preexposure prophylaxis for HIV**, 2015.

APENDICE A - ARTIGO VERSÃO LÍNGUA INGLESA

HIV-1 Secondary Antiretroviral Drug Resistance and Genotypic Profile of People Living with HIV/AIDS in Northeastern Brazil

Marcela Vieira Freire, Ana Maria Salustiano Cavalcanti, Sirleide Pereira da Silva Vera Magalhães da Silveira.

Rua Capitão Sampaio Xavier, n 205 – Graças – Recife /PE – CEP:52050-217
marcelavieiraf@gmail.com

ABSTRACT

BACKGROUND The HIV epidemic reaches about 36.7 million people around the world (UNAIDS, 2017), of whom 54% are unaware that they are infected. The early use of antiretroviral therapy (ART) in people living with HIV/AIDS (PLHA) has been identified as a key factor in improving quality of life, reducing mortality and preserving the immune status of PLHA (LUNDGREN, 2015).

OBJECTIVES To evaluate ART resistance and the HIV genotypic profile in Pernambuco, Northeast Brazil over the period of 2010 to 2015.

METHODS A total of 1040 results of genotyping tests developed at the Central Laboratory of Public Health from Pernambuco state were analyzed and the demographic, immunological and virological profile of these individuals, the prevalence of viral mutations and subtypes.

FINDINGS The prevalence of secondary antiretroviral drug resistance has been stabilizing in comparison to previous studies. The viral genotypic profile in this population denotes the increase in percentage of Circulating Recombinant Forms.

MAIN CONCLUSIONS Knowing evolutionary process of HIV-1 as well as the development of resistance is an essential part of the development of strategies that minimize the harmful effects of virological failure.

Key words: HIV, ART, resistance, genotypic.

Introduction

The HIV epidemic reaches about 36.7 million people worldwide¹, of which 54% are unaware that they are infected and whose treatment can be started as soon as they are diagnosed. The early use of antiretroviral therapy (ART) in people living with HIV/AIDS has been a determining factor in improving quality of life, reducing mortality, and preserving or restoring the immune status of PLHA². Despite therapeutic advances, one of the main challenges of the HIV pandemic is the ability of the virus to generate high rates of mutations and develop resistance to antiretroviral therapy (ART)³ observed mostly among individuals who do not adhere correctly to ART⁴. Antiretroviral resistance should be systematically monitored as a tool to avoid the use of therapeutic regimens fated to virological failure as well as contribute to the expansion of therapeutic resources.

According to a recent Latin America and the Caribbean study, there is a global trend in increasing ARV resistance rates, notably in countries that base their therapeutic regimen on Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors (NRTI) and Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors (NNRTI), as occurred in Brazil until 2016⁵. In addition, Brazil has the highest incidence of HIV in Latin America, corresponding to 49% of new infections in the region or in absolute numbers, 48,000 new cases in 2016¹ of which 15.3% belong to the Northeastern Brazil⁶; among the new cases reported in the period 2007 to 2016, 53.2% are young people between 20 and 34 years of age⁶.

Thus, the high incidence of HIV and the high prevalence of young people who will use ART for a long period reinforce the importance of updating studies on secondary ART resistance. This study aimed to evaluate the prevalence of mutations capable of triggering virological failure to HAART in people living with HIV/AIDS in the state of Pernambuco, Northeastern Brazil and analyze the genotypic profile of HIV in this state.

Materials and Methods

The study recovered the genotyping tests carried out at the Central Public Health Laboratory of the state of Pernambuco (LACEN-PE) from patients failing antiretroviral therapy in the state of Pernambuco over the period of 2010 to 2015.

The genotyping tests of pregnant women, of people under 18 years of age and coming from other states were excluded so that secondary ART resistance could be

obtained strictly in the state of Pernambuco, since pre-treatment genotyping is recommended in minors of 18 years and women diagnosed HIV positive during pregnancy ⁷.

The samples received by LACEN-PE in these period from patients failing antiretroviral therapy followed at outpatient clinics in the state of Pernambuco were analyzed according to the *Trugene Siemens* method. This technique performs the extraction and purification of viral RNA, followed by the reverse transcription (RT) reaction and polymerase chain reaction (PCR), CLIP sequencing reaction and polyacrylamide gel electrophoresis, sequencing of Transcriptase regions Reverse and Protease in the HIV-1 pol gene. Patients who fulfilled the inclusion criteria had their reports searched in the LACEN-PE database by retrieving the printed results or locating records of the genomic sequences and performing a new analysis according to the Stanford 2017 program. Data obtained were tabulated according to the following tables through the SPSS version 23 data tabulation program SPSS.

Ethics

The research was approved by the Ethics Committee of the Health Sciences Center UFPE according to opinion No. 2.495.693.

Results

A total of 1040 genotyping tests were analyzed according to the inclusion criterias showed demographic, immunological and virological profile of these individuals, as well as the prevalence of viral mutations and subtypes over the period 2010-2015. Demographic data show that 35.1% of the PLHA who underwent the genotyping test were in the age range of 40 to 49 years, 28.6% were aged between 30 and 39 years; 60.1% are male, while 39.9% are female, and the referred source was 95.8% of the Metropolitan Region of Recife (Table I). As for the immunological and virological data, a high percentage of people with reduced CD4 + T lymphocytes were observed, totaling 18.6% of those with CD4 + ≤ 100 cells / mm³ and 18.6% with CD4 + cells between 101 and 200 cells / mm³, as well as 12.3% of the people had high viral load (Table I).

Among the 1040 tests performed with the results obtained through the reports filed in LACEN-PE, 23.8% of the samples were not amplified, that is, they had insufficient viral load to perform the test by the available method - the TRUGENE SIEMENS protocol or the reference laboratory - and were excluded from the other

analyzes (Table III). Thus, the total number of samples considered in analysis of mutation was 792, of which 86.1% had at least one type of mutation capable of generating resistance according to table IAS-2017 (Table III).

The number of mutations for each class of drugs, 75.9% of the samples had at least one mutation for the Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors (NRTI). NRTI also had the highest prevalence of 4 or more mutations (14.4%) among the classes of ART studied (Table IV).

The number of samples with mutations considering the presence of these for each class of drugs shows the combination NRTI + NNRTI has the highest vulnerability to the mutations secondary to ARV (42.6%) and a significant percentage of the samples have mutations for the three classes of drugs analyzed (9.7%) (Table V)

The prevalence of mutations associated with resistance according to Table IAS-2017 showed that the M184V mutation was present in 91.7% of the samples with resistance to NRTI, followed by the T215Y/F mutation observed in 33.3% of these samples. The most prevalent mutation associated with the class of Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors (NNRTIs) was K103N - present in 73.1% of the samples - followed by P225H (21.1%), as shown in Graph II.

Considering the Major mutations associated with Protease Inhibitors, that is, mutations capable of generating resistance, the most prevalent mutation was V82A/F/T/S/L, totaling 61.3% of the samples, notably V82A, which alone totaled 51.1% of the samples, followed by M46I / L mutation, which corresponded to 54% of major mutations.

The Graph IV demonstrates the tendency to stabilize the percentage of mutations associated with antiretrovirals over the years; it is also observed that the percentage of samples with mutations associated with resistance to IP evolves with significant reduction.

Regarding the distribution of percentages of viral subtypes and circulating recombinant forms (CRF), Graph V shows a high prevalence of subtypes B and F1. However, over the six years of the study, the increasing percentage of CRFs is observed.

Discussion

The current study reflects significant data from the period immediately preceding the institution of the protocol that determines the availability of ART to all PLHA, as well as the introduction of the Integrase Inhibitor in the first line of the therapeutic scheme. According to the demographic data analyzed, a high prevalence of young adults who evolved to virologic failure was identified in line with the recent epidemiological bulletin, which reported a percentage of 52.3% of new cases among young people aged 20-34 years ⁶. This data may be associated with lower adherence rates among young people due to the less stable life stage ⁸. The prevalence of men in comparison to women is also maintained in the present study, however, it is observed the increase of the percentage of women when compared to previous studies⁹, denoting the feminization of the HIV pandemic, as an example of what is occurring in Brazil, where 49.4% of PLHA are women⁶. It is also noticed a high prevalence of requested tests in the Metropolitan Region of Recife in relation to the other regions of the state reflecting the greater concentration and access to health services in the RMR, as well as the higher percentage of PLHA in this region. The immunological data showed 37.4% of the people who underwent the genotyping test presented critical CD4 + counts and were at imminent risk of unfavorable outcomes ¹⁰. However, viral load determinations indicate that over the years, there was a higher percentage of early diagnosis of virological failure in relation to previous study⁹, a possible result of the increase in PLHA care, although there are still high percentages of late diagnoses. Health inequities are the most harmful expressions of social and economic inequalities, and should be a relevant argument for changing the priority given to economic growth¹¹ and developing countries still have critical rates of late diagnosis as well as lack of care. The current study demonstrates a higher percentage of PLHA with CD4 + counts lower than 200 cel/mm³ in relation to the national study¹² according to which 1/3 of the patients studied in the period from 2001 to 2009 presented critical levels of CD4 count; it is necessary to emphasize that the socioeconomic disparities between the regions in Brazil can justify a better national average than the result of this study.

A great percentage of requested tests that were not possible to develop the genotyping test were observed, being considered 792 samples, of which 86.1% had at least one type of mutation capable of generating resistance according to table IAS-2017. The increase in viral load of 13.9% of the people occurred due to poor adherence

to ART since no mutations were observed in the samples of these individuals. Although the developing countries show higher adhesion rates in relation to the countries with the highest human development index (HDI) and gross national product (GNP), peripheral countries contradictually present lower rates of viral suppression possibly due to the presence of PLHA in failed therapeutic regimens, limited access to health services and laboratory tests as well as the use of obsolete ART¹³. Among the factors identified as most relevant to poor adherence are the abusive use of alcohol and other drugs in addition to unemployment; social stigma, depression, and lack of provision have been less reported in more recent studies¹⁴.

A higher percentage of mutations associated with resistance to NRTI when compared to the other classes shows the greater susceptibility of this class to the mutations of resistance. Among the 792 results observed, 601 had a mutation for NRTI, totaling 75.9% of the samples; in second place the NNRTI, with 61.0% of the samples with mutations and finally, corroborating with previous studies, the Protease Inhibitors that have the greatest genetic barrier, evidencing Major mutations in 22.5% of the samples. There was, therefore, a decrease in the percentage of mutations observed in the three drug classes⁹; it is observed that the previous study quantified primary and secondary mutations while the method used in the current study identified mutations capable of generating resistance associated with antiretrovirals: the main mutations. There was already a tendency of reduction of resistance associated with NRTI and PI in the period from 2001 to 2009, although the percentage of mutations associated with resistance to NRTI remained higher in relation to the other classes. The reduction of resistance associated with Protease Inhibitors was directly influenced by the gradual association of PI (Lopinavir, Atazanavir) with ritonavir over the years¹² and the availability of this drug in thermostable presentation since 2014; thus, numerous mutations are required for a substantial impact on the virological response of the PI associated with ritonavir ¹⁵.

A higher prevalence was observed in the combination of NRTI and NNRTI mutations (42.6%), notably the first-line regimen in use in Brazil until December 2016⁶, in consonance with the Latin American and Caribbean study⁵. Simultaneous resistance to the three classes (NRTI, NNRTI and IP) was identified in 11.2% of the total samples with mutations, a result lower than that obtained in the previous study⁹.

The most frequent mutation associated with resistance to NRTI was the codon 184, M184V, present in 91.7% of the samples; this mutation induces resistance to

Abacavir (except when isolated), Lamivudine and Emtricitabine and has an ambiguous action since its presence delays the appearance of thymidine-associated mutations (TAM); this effect, however, is counteracted by the accumulation of TAM mutations¹⁵. Among the mutations associated with multidrug resistance low percentages of the Q151M mutation and the codon 69 insertion were obtained in 0.5% and 1.2%, respectively.

The most prevalent mutation associated to NNRTI class resistance was K103N, that may induce resistance to Efavirenz and Nevirapine, widely used in Brazil. The most prevalent mutation associated to PI resistance was V82A/F/T/S/L showed in 61.3% of samples, notably V82A, related to failure of Lopinavir/ritonavir (LPV/r) regimen. Although there is evidence that 7 to 8 mutations associated with resistance to PIs are necessary for loss of therapeutic choice¹⁵, the presence of I47A (1.1% prevalence in the samples) and possibly I47V (8.4%) -, V32I (8.4%) and L76V (9.6%) substantially increase LPV/r resistance. Among mutations related to resistance to Atazanavir/ritonavir(ATV/r), a high percentage of M46IL (54%), I50L (19.6%), I84V (9.3%) and N88S (7.3%) were observed, significantly higher in relation to LPV/r resistance inducers. Based on the recent replacement recommendation of the antiretroviral regimen LPV/r by ATV/r in Brazil¹⁶, a high number of people using the new regimen is expected, thus, enlarge the monitoring of these mutations is necessary.

In agreement with a national study¹² from 2009 to 2011 there was a favorable increase in the CD4+ count of patients taking ART and 77.1% of these patients had a viral load below 400 copies/ml, the current study demonstrated the stabilization of secondary ART resistance percentage. This results is corroborated by the international study on the global, regional and national incidence and mortality of HIV, malaria and Tuberculosis which showed a 2.3% reduction in the mortality rate of PLHA in Brazil (2000 to 2013) ¹⁷.

The evolution of the viral subtypes demonstrates the significant genetic variability of HIV-1 and its correlation with the epidemiological data in the Northeastern, a region that has been presenting a linear tendency of incidence growth¹⁰. Throughout the studied it is notably in the year 2015 the presence of a higher percentage of Circulating Recombinant Forms (CRF) in relation to previous years is corroborated by numerous studies in the Northeastern. According to Delatorre, *et al*¹⁸, samples from 140 patients from Alagoas, Bahia, Ceará and Piauí showed that subtype B is the most prevalent (72%), followed by F1 (6%), C (5%) and D (1%); the remaining 16% showed

recombinant structures of which BF1 totaled 11%, BC 4%, BCF1 (1%), CRF02_AG like (1%). These results reveal the complex variability of HIV-1 and its ability to generate recombinant forms, in agreement of studies with sequencing of the HIV-1 gag, pol and env regions using the full-length genome technique that showed high frequency of BF1 in the Northeastern: 21% in 2011 and 27% in 2016 ^{19,20,21}. The update of the prevalence of recombinant forms, mainly BF1, through the full-length genome technique is necessary since there are disagreements regarding the percentage estimated according to the technique used. In addition, the analysis of the evolution of recombinant BF1 subtype notably in the Northeastern becomes relevant to public health in view of the rapid progression to AIDS in people infected with this subtype ²².

Monitoring the ART resistance as well as actions that minimize the factors associated with the development of resistance mutations thus become a major challenge in combating the HIV epidemic, notably increasing access to services, genotyping and adherence actions. Identifying mechanisms related to genetic variability and recognizing the process of evolution of viral subtypes and their relation with the development of resistance are part of this process that requires joint actions among researchers, users and health managers.

Acknowledgements

We are grateful to all the participants for their cooperation which made this study possible. We also thank the LACEN-PE and the PPG Medicina Tropical UFPE.

Table I - Distribution of the demographic, immunological and virological data of the 1040 genotyping tests evaluated in Pernambuco 2010-2015

TOTAL: n (%)	1040 (100,0)
Age : Media ± DP (Median)	42,70 ± 10,42 (42,00)
Age Range: n (%)	
18 a 29	93 (8,9)
30 a 39	297 (28,6)
40 a 49	365 (35,1)
50 a 59	188 (18,1)
60 a 89	57 (5,5)
Uninformed	40 (3,8)
Gender: n (%)	
Male	625 (60,1)
Female	415 (39,9)
CD4+: n (%)	
≤ 100	194 (18,7)
101 a 200	194 (18,7)
201 a 500	442 (42,5)
> 500	181 (17,4)
Uninformed	29 (2,8)
Viral Load: n (%)	
< 10.000	427 (41,1)
10.000 a 100.000	346 (33,3)
> 100.000	128 (12,3)
Uninformed	139 (13,4)
Origin: n (%)	
Metropolitan Region of Recife	996 (95,8)
Zona da Mata	2 (0,2)
Agrete	9 (0,9)
Sertão	33 (3,2)

Table II - Percentage distribution of rescued reports/year. Pernambuco, 2010 to 2015.

TOTAL: n (%)	1040 (100,0)
Year of occurrence : n (%)	
2010	178 (17,1)
2011	129 (12,4)
2012	199 (19,1)
2013	182 (17,5)
2014	106 (10,2)
2015	246 (23,7)

Table III - Percentage of samples with mutations and non-amplified samples.

Group: n (%)	1040
Mutation	682 (86,1)
No Mutation	110 (13,9)
Total	792 (100,0)
Non-amplified samples	248 (23,8)

Table IV - Prevalence of mutations for each class of drugs.

Classification according to the number of mutations – NRTI n (%) ¹	
None	191 (24,1)
1	275 (34,7)
2 - 3	212 (26,8)
4 or more	114 (14,4)
Classification according to the number of mutations – NNRTI n (%) ¹	
None	309 (39,0)
1	170 (21,5)
2 - 3	250 (31,6)
4 or more	63 (8,0)
Classification according to the number of mutations - PI n (%) ¹	
None	614 (77,5)
1	61 (7,7)
2 - 3	62 (7,8)
4 or more	55 (6,9)

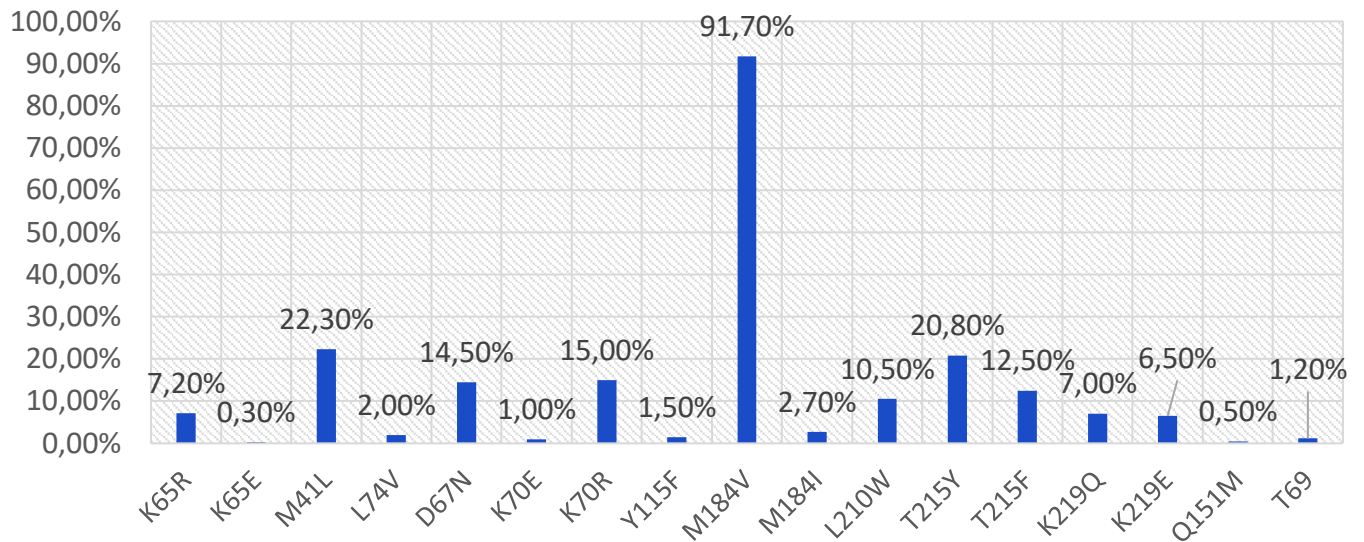
(1) Percentage values were obtained based on the total number of 792 patients with or without mutation (non-amplified samples were excluded)

Tabela V – Prevalência de mutações para cada classe de ARV e associações.

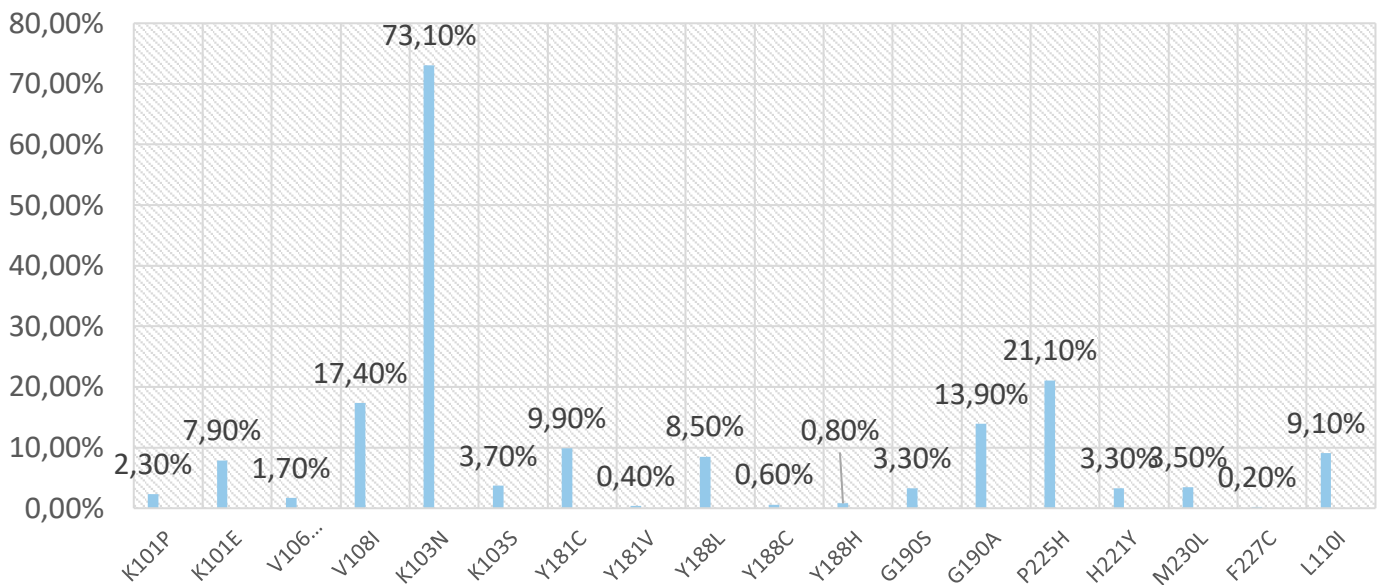
Combined mutations: n (%) (1)	
Sem mutação	110 (13,9)
NRTI	100 (12,6)
NRTI + NNRTI	337 (42,6)
NRTI + PI	87 (11,0)
NNRTI	67 (8,5)
NNRTI + PI	2 (0,3)
PI	12 (1,5)
NRTI + NNRTI + PI	77 (9,7)

(1) Percentage values were obtained based on the total number of 792 patients with or without mutation (non-amplified samples were excluded)

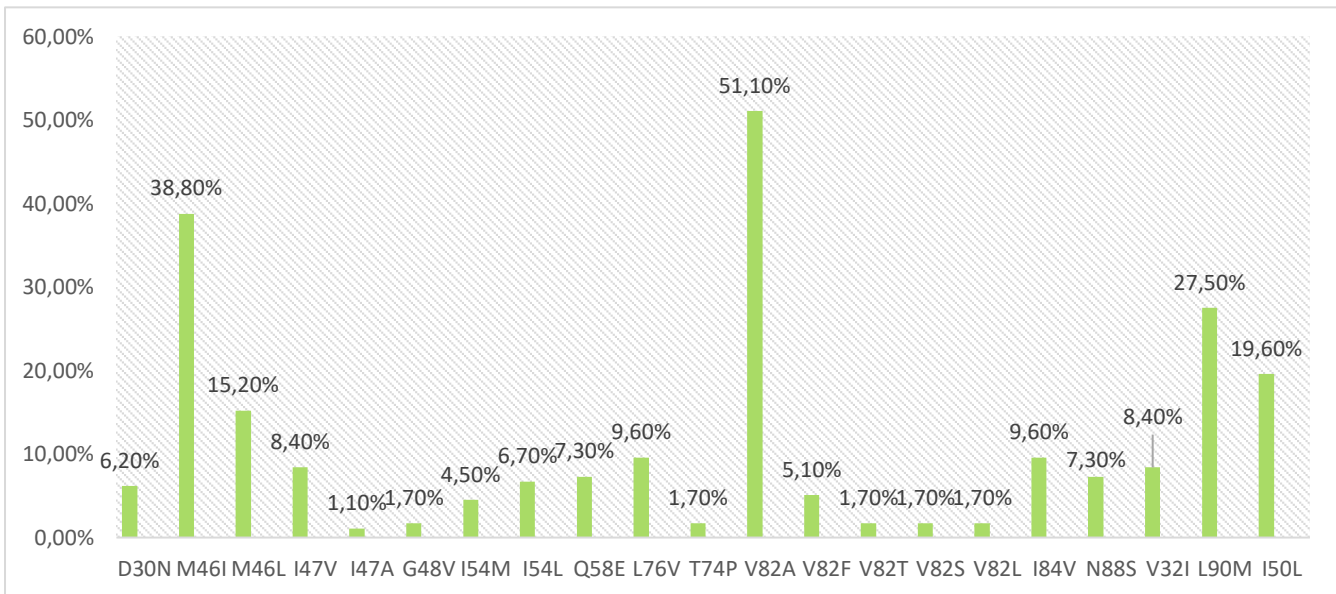
Graph I - Percentage distribution of mutations related to Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors (NRTI) -Pernambuco, 2010 to 2015



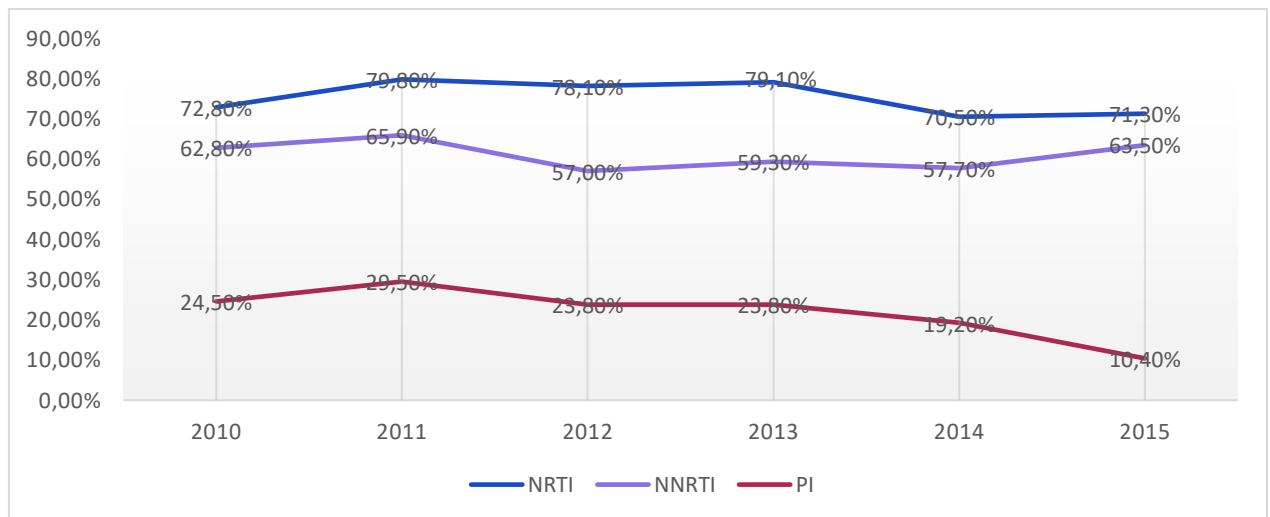
Graph II - Percentage distribution of mutations related to Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors (NNRTI), Pernambuco, 2010 to 2015



Graph III - Percentage distribution of Major mutations related to Protease Inhibitors (PI)- Pernambuco, 2010 to 2015

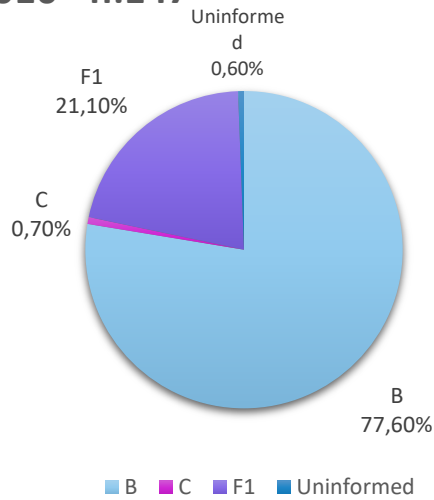


Graph IV - Distribution of the percentage of samples with mutations associated to the mutation classes - Pernambuco - 2010 to 2015.

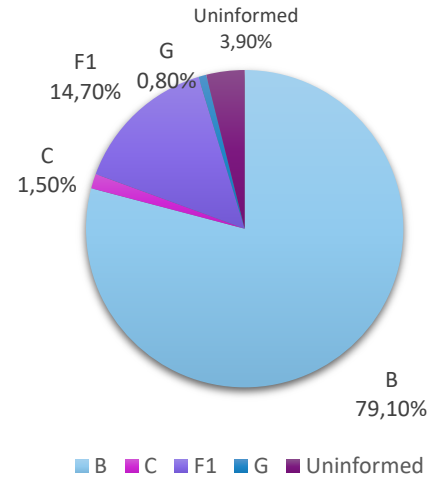


Graph V - Evolution of the percentage distribution of HIV-1 viral subtypes and CRFs. Pernambuco, 2010 to 2015.

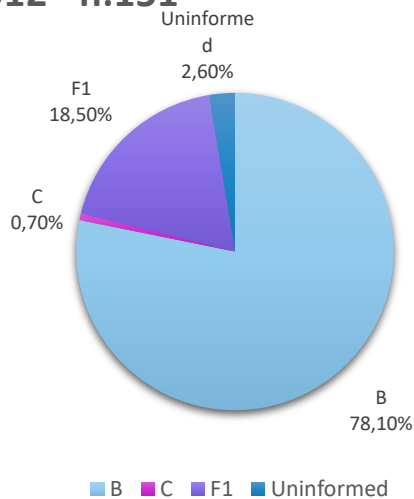
2010 - n:147



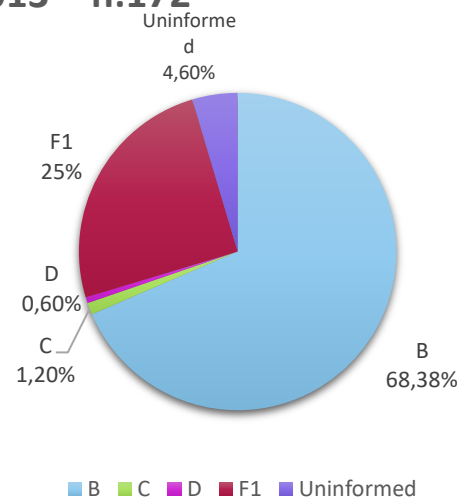
2011 - n:129



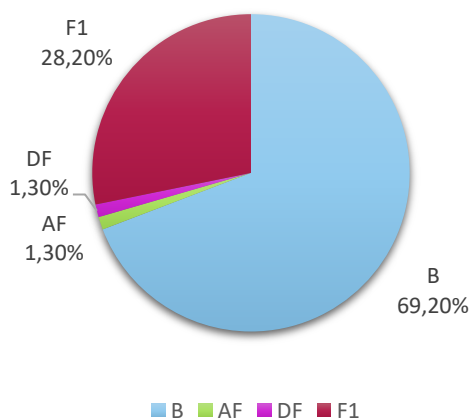
2012 - n:151



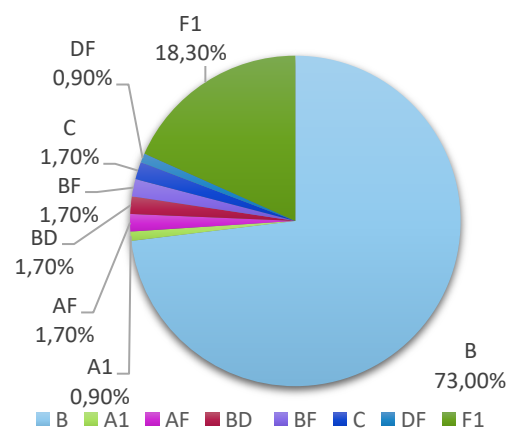
2013 - n:172



2014 - n:78



2015 - n:115



References

- 1- UNAIDS. Ending AIDS: progress towards the 90-90-90 targets. 2017
- 2- LUNDGREN, J. D. et al. Initiation of antiretroviral therapy in early asymptomatic HIV infection- START. New England Journal of Medicine, Copenhagen, v. 373, n. 9, p.795-807, 27 ago. 2015.
- 3- HIVDB, HIV drug resistance database. Available at <<https://hivdb.stanford.edu>> accessed on: September 12, 2016
- 4- DIAZ, R.S. Guia para Manuseio de Resistência Antirretroviral. 1. ed. São Paulo: Permanyer Brasil, 2011
- 5- AVILA-RIOS, S. et al. Surveillance of HIV Transmitted Drug resistance in Latin America and the Caribbean: A Systematic Review and Meta-Analysis. PloS One, 2016.
- 6- BRASIL. Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico 2016. Brasília, 2016.
- 7- BRASIL. Ministério da Saúde. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Manejo da infecção pelo HIV em adultos. Brasília, 2015.
- 8- SABIN, CA. et al. Response to combination antiretroviral therapy: variation by age. AIDS. 2008.
- 9- CAVALCANTI, A.M.S. Resistência secundária aos anti-retrovirais em indivíduos com AIDS e prevalência de subtipos do HIV-1 no Nordeste do Brasil: 2002 a 2005. Dissertação de Mestrado – Medicina Tropical, UFPE, Recife. <<https://repositorio.ufpe.br/handle/123456789/7430>> accessed on: September 15, 2016
- 10- BRASIL.Ministério da Saúde. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Manejo da infecção pelo HIV em adultos. Brasília, 2017.
- 11- MARMOT, M. The health gap: the challenge of an unequal world. The Lancet, Vol 386. 2015
- 12- DIAZ, R.S. et al. The Virological and Immunological Characteristics of the HIV-1-Infected Population in Brazil: From Initial Diagnosis to Impact of Antiretroviral Use. Plos One, 2015.
- 13- COSTA, J.D.M. et al Adherence to antiretroviral therapy for HIV/AIDS in Latin America and the Caribbean: Systematic review and meta-analysis. Journal of the International AIDS Society, 2018.

- 14- NACHEGA, JB. et al. Association between antiretroviral therapy adherence and employment status: systematic review and meta-analysis. *Bull World Health Organ*, 2015.
- 15- IAS – USA -2017. Topics in Antiviral Medicine. < <https://www.iasusa.org/sites/default/files/2017-drug-resistance-mutations-hiv-1-figure.pdf> > > accessed on: September 15, 2016.
- 16- BRASIL. Ministério da Saúde. Nota Informativa nº 059, de 2017/DDAHV/SVS/MS, Brasília, 2017.
- 17- MURRAY, C.J.L. et al. Global, regional, and national incidence and mortality for HIV, tuberculosis, and malaria during 1990–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *The Lancet*, 2014; 1005-1070.
- 18- DELATORRE, et al. HIV-1 Genetic Diversity in Northeastern Brazil: high prevalence of non-B subtypes. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 2017; 33(7):639-647
- 19- MONTEIRO-CUNHA, J.P, et al. Lack of high-level resistance mutations in HIV Type 1 BF recombinant strains circulating in northeast Brazil, *AIDS Res Hum Retroviruse*, 2011; 27(6):623-31
- 20- PESSÔA, R. et al. Ultra-Deep Sequencing of HIV-1 near Full-Length and Partial Proviral Genomes Reveals High Genetic Diversity among Brazilian Blood Donors. *PLoS One*, 2016; 11(3): e0152499
- 21- SANTOS, L.A. et al. Detection of Distinct Human Immunodeficiency Virus Type 1 Circulating Recombinant Forms in Northeast Brazil. *Journal of Medical Virology*, 2011; 83:2066–2072.
- 22- LEITE, TC. et al. Impact of HIV-1 Subtypes on AIDS Progression in a Brazilian Cohort. *AIDS Res Hum Retroviruses*. Jan 2017; 33(1):41- 48.

MUTATIONS IN THE PROTEASE GENE ASSOCIATED WITH RESISTANCE TO PROTEASE INHIBITORS^{a,c,f}

Atazanavir +/- ritonavir	L	G	K	L	V	L	E	M	M	G	I	F	I	D	I	I	A	G	V	I	I	N	L
	10	16	20	24	32	33	34	36	46	48	50	53	54	60	62	64	71	73	82	84	85	88	90
	I	E	R	I	I	I	Q	I	I	V	L	L	L	E	V	L	V	C	A	V	V	V	S
	F		M		F		V	L	L		Y	V	M			M	T	S	A	T	V	S	M
	V		I	T	V			V					A			V	T	L	F				L
	C			V															I				L
Darunavir/ ritonavir	V				V	L			I		I						T	L			I		L
	11				32	33			47		50	54					74	76			84		89
	I				I	F			V		V	M	L				P	V			V		V
Fosamprenavir/ ritonavir	L				V				M	I	I	I					G	L	V	I		L	
	10				32				46	47	50	54					73	76		82	84	90	
	F				I				I	V	V	L					S	V		A	V	M	
	I								L			V	M							F			
	R																		S				
	V																		T				
Indinavir/ ritonavir*	L	K	L		V			M	M		I						A	G	L	V	V	I	L
	10	20	24		32			36	46		54						71	73	76	77	82	84	90
	I	M	I		I			I	I		V						V	S	V	I	A	V	M
	R								L								T	A		F			
	V																			T			
Lopinavir/ ritonavir*	L	K	L		V	L			M	I	I	F	I				A	G	L		V	I	L
	10	20	24		32	33			46	47	50	53	54			63	71	73	76		82	84	90
	F	M	I		I	F			I	V	V	L	V			L	V	S	V	A	V	M	
	I								L	A			L			P	T			F			
	R																			T			
	V																			S			
Nelfinavir**	L				D			M	M								A		V	V	I	N	L
	10				30			36	46								71		77	82	84	88	90
	F				N			I	I								V		I	A	V	D	M
	I								L								T		I	F			
																			S	T			
Saquinavir/ ritonavir*	L								G		I						A	G	V	V	I	I	L
	10				24				48		54					62	71	73	77	82	84	90	
	I				I				V		V	L				V	S		I	A	V	M	
	R																			F			
	V																T			T			
																				S			
Tipranavir/ ritonavir	L				L		M		K	M	I		I	Q		H		T		V	N	I	L
	10				33		36		43	46	47		54	58		69		74		82	83	84	89
	V				F		I		T	L	V		A	E		K		P		L	D	V	I
							V					M				R				T		M	
												V											

MUTATIONS IN THE ENVELOPE GENE ASSOCIATED WITH RESISTANCE TO ENTRY INHIBITORS

Enfuvirtide ^a	G 36 D S	I 37 V	V 38 A M E	Q 39 R	Q 40 H	N 42 T	N 43 D	
Maraviroc ^a	See User Note							

MUTATIONS IN THE INTEGRASE GENE ASSOCIATED WITH RESISTANCE TO INTEGRASE STRAND TRANSFER INHIBITORS²

Dolutegravir ^{a,b}						F 121 Y	E 138 A K	G 140 A S	Q 148 H K R	N 155 H		R 263 K
Elvitegravir ^{a,b}	T 66 I A K			E 92 Q G	T 97 A	F 121 Y			S 147 G H K R	Q 148 H	N 155 H	R 263 K
Raltegravir ^{a,c}		L 74 M		E 92 Q	T 97 A	F 121 Y	E 138 A K	G 140 A S	Y 143 R H C	Q 148 H K R	N 155 H	R 263 K

ANEXO B - AUTORIZAÇÃO DO USO DE DADOS LACEN-PE



SECRETARIA DE SAÚDE DO ESTADO DE PERNAMBUCO – SES
SECRETARIA EXECUTIVA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE
LABORATÓRIO CENTRAL DE SAÚDE PÚBLICA
“Dr. Milton Bezerra Sobral” – LACEN PE



Ofício nº. 2136 / 2016

Recife, 26 de Dezembro de 2016.

Prezada Senhora,

Em atenção a solicitação de autorização do uso de dados disponíveis no Banco de Dados do LACEN PE, e de acordo com a Gerência de Diagnóstico Laboratorial para Controle e Prevenção de Doenças - GDLCPD e da Coordenação de Diagnóstico de Doenças Virais - CDDV, comunicamos nossa concordância e encaminhamos nosso PARECER para realização do projeto de pesquisa intitulado **“RESISTÊNCIA SECUNDÁRIA AOS ANTIRRETROVIRAIS E PERFIL GENOTÍPICO VIRAL EM PESSOAS VIVENDO COM HIV/AIDS NO ESTADO DE PERNAMBUCO ENTRE OS ANOS 2010 E 2015”** apresentado pela aluna **Marcela Vieira Freire**, da Pós Graduação em Medicina tropical do CCS/UFPE.

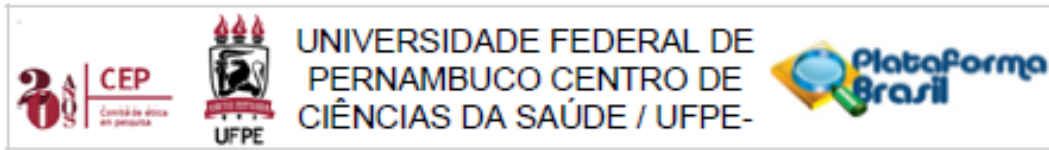
Colocamo-nos à disposição para esclarecimentos necessários.

Atenciosamente,


Ovidio Alencar Araripe Neto
Diretor Geral de Laboratórios Públicos

Professora Drª Vera Magalhães
Mestrado em Medicina Tropical - Centro de Ciências da Saúde - CCS
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

ANEXO C - PARCER DO CEP – CCS/UFPE



Continuação do Parecer: 2.495.893

resultados e conclusão.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos foram considerados adequados.

Recomendações:

S/Recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado.

Considerações Finais a critério do CEP:

O Relatório Final foi analisado e APROVADO pelo colegiado do CEP.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Envio de Relatório Final	Relatorio_final_Marcela_Vieira.pdf	06/02/2018 01:31:01	MARCELA VIEIRA FREIRE	Postado

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RECIFE, 15 de Fevereiro de 2018

Assinado por:
LUCIANO TAVARES MONTENEGRO
(Coordenador)

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde
Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.740-600
UF: PE Município: RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 E-mail: cepccs@ufpe.br