

GABRIELA BASTOS CABRAL

Avaliação da resposta à terapia antirretroviral de resgate
contendo antagonista do correceptor CCR5 em pessoas
vivendo com HIV/AIDS

São Paulo
2014

GABRIELA BASTOS CABRAL

Avaliação da resposta à terapia antirretroviral de resgate
contendo antagonista do correceptor CCR5 em pessoas
vivendo com HIV/AIDS

Defesa de dissertação
apresentado ao Programa de Pós-
Graduação em Ciências da
Coordenadoria de Controle de
Doenças da Secretaria de Estado
da Saúde de São Paulo, para a
obtenção do Título de Mestre em
Ciências.

Área de Concentração:
Pesquisas Laboratoriais em
Saúde Pública

Orientador: Prof. Dr. Luis
Fernando de Macedo Brígido

São Paulo
2014

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pelo Centro de Documentação – Coordenadoria de Controle de Doenças/SES-SP

©reprodução autorizada pelo autor, desde que citada a fonte

Cabral, Gabriela Bastos

Avaliação da resposta à terapia antirretroviral de resgate contendo antagonista do correceptor CCR5 em pessoas vivendo com HIV/AIDS / Gabriela Bastos Cabral - São Paulo, 2014.

Dissertação (mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo.

Área de concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública
Orientador: Luis Fernando de Macedo Brígido

1. HIV 2. Antirretrovirais 3. Tropismo viral

SES/CCD/CD-293/14

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Silvânia Bastos e Roberto Cabral por todo o carinho, dedicação e por me ensinarem a importância da disciplina com os estudos e com a profissão que escolhi seguir.

Aos meus irmãos Diego Cabral e Tony Cabral por todo o apoio e cumplicidade.

Ao meu orientador Prof. Luis Fernando de Macedo Brígido por todo o incentivo, apoio e conhecimento tão importantes para o desenvolvimento desta pesquisa.

A Marisa Hong minha orientadora do Programa de Aprimoramento Profissional realizado na antiga Seção de Sorologia por todo o carinho e por ser exemplo de profissional.

Aos funcionários do Núcleo de Doenças Sanguíneas e Sexuais por todo o apoio.

A todo o grupo do Laboratório de Retrovírus, aqui além de colegas de trabalho fiz amigos que tornaram meus dias mais agradáveis e foram indispensáveis para a realização deste trabalho. Em especial: a Duda, Fábio e Gisele pela amizade e apoio na execução com as amostras. Agradeço muito as meninas Denise, Luana, Paula e Jaqueline pela parceria e colaboração de todas para o desenvolvimento deste trabalho, vocês foram essenciais, não só para realização deste trabalho, mas principalmente pela amizade. Meninas, muito obrigada pelas risadas que demos durante todo este tempo!

Ao João Leandro por todo o apoio na elaboração deste trabalho, amizade e principalmente por toda a sua alegria que fizeram os meus dias mais felizes.

RESUMO

O presente estudo apresenta um novo algoritmo de ferramentas de bioinformática capaz de determinar de forma robusta o tropismo do HIV analisando sequências da região V3 do envelope viral. O critério designado “Critério IAL” emprega as ferramentas regra 11/25, PSSM e Geno2pheno opção clonal e clínica e foi comparado com o ensaio de fenotipagem Trofile em 25 pacientes. A análise do tropismo viral usando a genotipagem da V3 e o Critério IAL foi empregada em 157 pacientes do Programa Estadual de Aids de São Paulo, que necessitavam de terapia de resgate, dos anos de 2008 a 2012. Foram detectados, 89 pacientes com tropismo HIV para o correceptor CCR5 (R5) e 68 CXCR4 (X4). Com base nestes resultados foi estabelecido o esquema terapêutico pelo médico e comissão estadual, e indicado antagonista do CCR5 (maraviroque–MQV) para alguns pacientes. Em 73 casos (41R5 e 32X4) foi possível obter o desfecho clínico, levando em consideração dados virológicos e imunológicos. Foi calculada a pontuação de drogas ativas usando análise de sequências da região da polimerase viral (protease e transcriptase reversa) e o sistema de interpretação do algoritmo *HIV Drug Resistance Database*. A mediana dos valores de idade e tempo de tratamento destes pacientes foi de 44 e 12 anos, respectivamente. Sendo utilizados em média nove esquemas terapêuticos. Para análise dos resultados, os pacientes foram agrupados de acordo com o tropismo viral e uso de MQV em: Grupo 1 (n=16, R5comMQV), Grupo 2 (n=25, R5semMQV) e Grupo 3 (n=32, X4). A análise dos resultados obtidos revelou que após a terapia de resgate a viremia plasmática tornou-se indetectável em 94%, 80% e 58% dos pacientes dos Grupos 1, 2 e 3 respectivamente, com diferença estatisticamente significativa para o Grupo 1 (p=0.03). Houve aumento de células T CD4+ de mais de 100 células/mm³ de sangue quando comparado ao *baseline* em 76% dos pacientes: 86% do Grupo 1, 75% do Grupo 2 e 69% do Grupo 3. O grupo 1 apresentou o menor nadir e o maior aumento de células T CD4, embora sem

significância estatística. Não houve diferença na pontuação de drogas entre os Grupos 1 e 2 (2,75 – 2,38), mas quando foi retirado o MQV da análise, houve queda da pontuação do Grupo 1 com valores semelhantes ao Grupo 3 (1,75–2). Concluindo, o Critério IAL para determinar o tropismo HIV se mostrou mais sensível e específico que as ferramentas de bioinformática isoladamente e com sensibilidade e especificidade semelhantes ao ensaio de imunofenotipagem, sendo considerado útil na indicação do melhor esquema terapêutico de resgate ao paciente. O estudo longitudinal com MQV mostrou ser esta uma boa opção terapêutica em pacientes com vírus R5.

Palavras chave: HIV, terapia antirretroviral, Maraviroque, tropismo.

ABSTRACT

HI-1 viral tropism is an important phenotypic characteristic may be classified as CCR5 tropic, CXCR4 tropic or dual tropic. As phenotypic assays are complex and expensive, genotypic prediction has been largely used. This study presents a new bioinformatics algorithm capable of robustly determining the tropism of HIV analyzing sequences of V3 region of the viral envelope tools. The criterion, called "Criterion IAL" employs the tools rule 11/25, PSSM and Geno2pheno clonal clinical and option that were compared with the Trofile phenotyping test in 25 patients. The analysis of viral tropism using the V3 genotyping and IAL Criterion was used in 157 patients with advance disease in Sao Paulo from 2008 to 2012. CCR5 HIV tropism (R5) was predicted for 89 patients and X4 in 68. Based on these results, the therapeutic regimen was established by the physician and state commission. In 73 cases (41R5 and 32X4) it was possible to obtain the clinical outcome, including virological and immunological data. Scores of salvage regimen active drugs was calculated using sequence analysis of the viral polymerase (reverse transcriptase and protease) region using the interpretation of HIV Drug Resistance Database algorithm system. The median values of age and duration of treatment of these patients was 44 and 12 years, respectively, with an average of nine previous regimens. Patients were grouped according to the viral tropism and use of MQV as: Group 1 (n=16, R5usingMQV), Group 2 (n=25, R5noMQV) and Group 3 (n=32, X4). The results obtained showed that, after salvage therapy, plasma viremia became undetectable in 94 %, 80 % and 58% of patients in Groups 1, 2 and 3 respectively, with a statistically significant higher suppression in Group 1 ($p=0.03$). There was an increase of more than 100 cells/mm³ of blood CD4 cells when compared to baseline in 76% of patients: 86% of group 1, 75% in group 2 and 69 % of Group 3. Group 1 had the lowest nadir and the highest increase of CD4 + cells, although without statistical significance. There was no difference in the scores of drugs between Groups 1 and 2 (2.25 - 3), but when MQV was removed from the analysis, there was a drop in the scores of

Group 1 with values similar to Group 3 (1.25-2). In conclusion, the IAL criterion to determine HIV tropism was more sensitive and specific than the tools of bioinformatics alone and showing comparable results to that of the phenotype, and its use to predict viral tropism allowed the use MQV for some R5 patients. Its use as part of salvage therapy showed a good therapeutic response suggesting that the test was useful in predicting CCR5 antagonist drug activity.

Keywords: HIV, antiretroviral therapy, Maraviroc, Tropism.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg	Micrograma (10^{-6} Grama)
µL	Microlitro (10^{-6} Litro)
3TC	Lamivudina
ABC	Abacavir
AIDS	<i>Acquired Immune Deficiency Syndrome</i>
ARV	Antirretroviral
ATV	Atazanavir
AZT	Zidovudina
CD4	Linfócito T auxiliar
CD8	Linfócito T citotóxico
CDC	<i>Center for Disease Control</i>
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
cel/mm ³	Células por milímetro cúbico
CRF	<i>Circulating Recombinant Forms</i>
CV	Carga viral
D4T	Estavudina
DDI	Didanosina
ddNTP	Dideoxirribonucleosídeo trifosfatados
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNase	Desoxirribonuclease
dNTP	Deoxirribonucleosídeo trifosfatado

DRV	Darunavir
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ácido etilenediaminetetracético
EFV	Efavirenz
ENV	Envelope viral
ETV	Etravirina
EVG	Elvitegravir
FPR	<i>False Positive Rate</i>
FPV	Fosemprenavir
FTC	Emtrecitabina
GAG	Grupo Específico de Antígenos
gp	Glicoproteína
GSS	<i>Genotypic Score Susceptibility</i>
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
IDV	Indinavir
IN	Integrase
INI	Inibidor de integrase
ITRN	Inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeos e nucleotídeos.
ITRNN	Inibidores da transcriptase reversa não análogos de nucleosídeos.
IP	Antirretroviral da classe dos inibidores da protease
LPV	Lopinavir
LPV/r	Lopinavir associado a ritonavir

LTR	Seqüências Terminais Longas Repetidas
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
mL	Mililitro (10 ⁻³ Litro)
MQV	Maraviroque
NC	Antirretroviral de novas classes de medicamentos.
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NEF	Fator de regulação negativa
NFV	Nelfinavir
ng	Nanograma (10 ⁻⁹ Grama)
NVP	Nevirapina
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cell</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase
POL	Polimerase
PSSM	<i>Position-specific scoring matrices</i>
PT	Protease
RAL	Raltegravir
REGA	<i>Rega Institute for Medical Research</i>
REV	Regulador da expressão de proteínas virais
RNA	Ácido ribonucléico
RNAse	Ribonuclease
RT	<i>Reverse transcriptase</i>
RT-PCR	Retrotranscrição e Reação em Cadeia da Polimerase
Sisgeno	Sistema de Controle de Exames de Genotipagem
SQV	Saquinavir

T-20	Enfuvirtida
TARV	Terapia antirretroviral
TAT	<i>Trans-ativador</i> transcricional
TBE	Tris, Ácido Bórico, EDTA
TDF	Tenofovir
TPV	Tipranavir
TR	Terapia de resgate
UNAIDS	<i>Joint United Nations Programme on HIV/AIDS</i>
VIF	Fator de infectividade viral
Vírus R5	Vírus com tropismo pelo correceptor CCR5
Vírus X4	Vírus com tropismo pelo correceptor CXCR4
VPR	Proteína viral R
VPU	Proteína viral U

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática da organização genômica do HIV-1.	22
Figura 2: Etapas da replicação do HIV-1	23
Figura 3: Representação esquemática da entrada do HIV na célula alvo.	30
Figura 4: Representação tridimensional da interação da região V3 da glicoproteína gp120 do envelope viral com o correceptor de quimiocina da célula alvo.	31
Figura 5: Representação esquemática do tropismo do HIV e o uso dos correceptores CXCR4 e CCR5 presentes nas células alvo.	31
Figura 6: Evolução do tropismo viral do HIV, de acordo com o tempo de infecção.	32
Figura 7: Esquema molecular do antagonista CCR5, maraviroque.	34
Figura 8: Representação esquemática do local de ação do maraviroque no correceptor CCR5 presente na membrana da célula alvo para infecção pelo HIV.	35
Figura 9: Ilustração da tecnologia do tropismo fenotípico do HIV frente células alvo que expressam o correceptor CXCR4 e CCR5.	41
Figura 10: Aminoácidos da região V3 do envelope viral de HIV; consenso de vírus B obtido pelo site geno2pheno coreceptor.	43
Figura 11: Representação esquemática do estudo.	49
Figura 12: Ferramentas de análise de predição utilizadas para a predição do laudo de tropismo.	55
Figura 13: Fluxograma de dados para avaliação de desfecho terapêutico.	58

Figura 14: Aumento de células T CD4 obtido pelo grupo R5comMQV na primeira avaliação.	71
Figura 15: Variações nas contagens de células T CD4 obtido pelo grupo R5comMQV no período observado.	71
Figura 16: Aumento de células T CD4 obtido pelo grupo R5semMQV na primeira avaliação.	76
Figura 17: Variações nas contagens de células T CD4 no grupo R5semMQV no período observado.	76
Figura 18: Aumento de células T CD4 obtido pelo grupo X4 na primeira avaliação.	82
Figura 19: Variações nas contagens de células T CD4 obtidas pelo grupo X4 durante o período observado.	82
Figura 20: Classificação do GSS relacionando os três grupos avaliados.	87
Figura 21: Variações obtidas nas contagens de células T CD4, de acordo com o tempo observado por grupo.	89
Figura 22: Aumento de células T CD4 obtido na primeira avaliação (semana 12-32) dos 3 grupos.	89

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Principais antirretrovirais das classes dos ITRN, ITRNN e IP.	29
Tabela 2: Descrição dos protocolos de reações utilizados para amplificação da região V3 do envelope viral.	51
Tabela 3: Descrição dos protocolos de reações utilizados para amplificação da região da polimerase do HIV.	52
Tabela 4: <i>Primers</i> empregados nas reações de sequenciamento das regiões V3 do envelope viral e da polimerase do HIV.	53
Tabela 5: Reagentes empregados na reação de sequenciamento das regiões: V3 do envelope viral, protease e transcriptase reversa do HIV.	54
Tabela 6: Dados demográficos e clínicos na entrada dos pacientes envolvidos no estudo.	61
Tabela 7: Dados demográficos e clínicos dos pacientes com resultado pareado de Trofile ESTA e genotropismo.	62
Tabela 8: Resultados de determinação do tropismo, de acordo com os diferentes algoritmos de predição, avaliados individualmente.	63
Tabela 9: Resultados de grau de concordância, sensibilidade e especificidade dos diversos algoritmos de predição, de acordo com o Trofile ESTA.	64
Tabela 10: Dados demográficos e clínicos dos pacientes avaliados quanto ao desfecho terapêutico no momento do envio do laudo ao médico “baseline”.	65

Tabela 11: Informações de uso de ARVs, de acordo, com a classe de medicamento, nos diferentes períodos de tratamento avaliados nos pacientes do grupo R5comMQV.	66
Tabela 12: Pontuação do GSS do esquema “background” dos pacientes R5comMQV. As notas foram estratificadas em 4 escalas, e a porcentagem de sucesso virológico após uso de terapia de resgate.	67
Tabela 13: Esquema terapêutico de “baseline” e de resgate do grupo R5comMQV.	69
Tabela 14: Parâmetros imunológicos dos pacientes do grupo R5comMQV.	70
Tabela 15: Informações de uso de ARVs, de acordo, com a classe de medicamento, nos diferentes períodos de tratamento avaliados em pacientes do grupo R5MQV.	72
Tabela 16: Pontuação do GSS do esquema “background” dos pacientes R5semMQV.	73
Tabela 17: Esquema terapêutico de “baseline” e de resgate do grupo R5 e que não utilizaram maraviroque.	74
Tabela 18: Parâmetros imunológicos dos pacientes do grupo R5semMQV.	75
Tabela 19: Informações de uso de ARVs, de acordo, com a classe de medicamento, nos diferentes períodos de tratamento avaliados, do grupo X4.	77
Tabela 20: Notas do GSS do esquema de “background” dos pacientes X4.	79
Tabela 21: Esquema terapêutico de “baseline” e de resgate do grupo X4.	80
Tabela 22: Parâmetros Imunológicos dos pacientes do grupo X4.	81

Tabela 23: Informações de tratamento após envio do laudo de acordo com os grupos avaliados. 83

Tabela 24: Informações do uso de ARVs de acordo com os períodos de tratamento avaliados e os três grupos estudados. 85

Tabela 25: Comparação de sucesso virológico obtido pelos pacientes, de acordo com os grupos avaliados. 86

Tabela 26: Parâmetros imunológicos dos três grupos avaliados quanto ao desfecho terapêutico. 88

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

Anexo 2: Aprovação do Comitê de Ética

Anexo 3: Concordance of HIV-1 tropism phenotype to predictions using web-based analysis of V3 sequences: Composite algorithms may be needed to properly assess viral tropism

ÍNDICE

1. Introdução	21
1.1 Classificação e morfologia	21
1.2 Estrutura genômica e ciclo replicativo	21
1.3 Epidemia	24
1.3.1 Epidemia no Brasil	25
1.4 Terapia antirretroviral	26
1.5 Antagonista de CCR5	30
1.5.1 Função fisiológica dos correceptores	33
1.5.2 Maraviroque	34
1.5.3 Estudos clínicos com maraviroque	35
1.5.4 Benefício imunológico do maraviroque	37
1.5.5 Mecanismos de resistência do maraviroque	38
1.5.6 Metabolismo, interações farmacológicas e posologia do maraviroque	39
1.5.7 Prescrição do maraviroque no Brasil	40
1.5.8 Teste de tropismo para utilização do maraviroque	40
1.5.9 Validação das ferramentas de predição genotípicas	45
2 Objetivos	48
2.1 Objetivo geral	48
2.2 Objetivos específicos	48
3 Material e Métodos	49
3.1 População do estudo	49
3.2 Coletas do material biológico	50

3.3 Extração do RNA	50
3.4 Quantificação da carga viral e contagem de células T CD4	50
3.5 Reação em cadeia da polimerase (PCR) da região do envelope e polimerase do HIV	50
3.5.1 Sequenciamento dos produtos amplificados das regiões do envelope, protease e transcriptase reversa do HIV.	53
3.6 Predição genotípica do tropismo viral	54
3.6.1 Predição do tropismo genotípico realizado na análise comparativa gerado pelo laboratório do IAL com o Trofile	56
3.7 Avaliação de desfecho terapêutico	57
3.7.1 Análise da resposta virológica dos pacientes após início do tratamento de resgate.	57
3.8 Análise da resposta imunológica dos pacientes após início de tratamento de resgate	59
3.9 Pontuação de drogas ativas do esquema terapêutico de resgate - <i>Genotypic Score Susceptibility (GSS)</i>	59
3.9.1 Análise Estatística	60
4. Resultados	61
4.1 População de estudo	61
4.2 Análise de comparativa do ensaio genotípico do IAL com o ensaio fenotípico Trofile	61
4.3 Análise de desfecho terapêutico	65
4.3.1 Parâmetros virológicos dos pacientes do grupo R5comMQV (n=16).	65
4.3.2 Parâmetros imunológicos dos pacientes do grupo R5comMQV n=16	70

4.3.3 Parâmetros virológicos dos pacientes do grupo R5semMQV n=25	72
4.3.4 Parâmetros imunológicos dos pacientes do grupo (R5semMQV) n=25	75
4.3.5 Parâmetros virológicos dos pacientes de grupo X4 n=32	77
4.3.6 Parâmetros Imunológicos dos pacientes do grupo X4 n=32	81
4.4 Comparação dos três grupos de estudo, avaliados quanto ao desfecho terapêutico	83
4.4.1 Comparação do tratamento de resgate dos grupos analisados	83
4.4.2 Avaliação do esquema terapêutico dos diferentes grupos, de acordo com o <i>baseline</i> e a terapia de resgate.	84
4.4.3 Sucesso Viroológico por grupo	86
4.4.4 Pontuação do GSS dos 3 grupos avaliados	86
4.4.5 Benefício imunológicos dos três grupos avaliados	88
5. Discussão	90
6. Conclusão	96
7. Referências Bibliográficas	97
8. Anexos	
8.1 Aprovação Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Adolfo Lutz	
8.2 Trabalhos publicados	

1. INTRODUÇÃO

1.1. Classificação e morfologia

O Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) é um vírus com genoma composto por duas fitas simples de RNA, pertencente ao gênero *Lentivirus* e à família *Retroviridae*. Existem dois tipos do vírus da Imunodeficiência Humana, o HIV-1 e o HIV-2, sendo a maioria das infecções ocasionada pelo tipo 1. A caracterização genética de vários isolados do HIV-1 permitiu a identificação de quatro grupos: M (major), O (outlier), N (non M, non O) e mais recentemente o grupo P (putative) (Hahn et al., 2000; Plantier et al., 2009). O grupo M é o mais difundido mundialmente, com aproximadamente 35 milhões de pessoas infectadas, sendo subdividido em subtipos de A-K e várias formas de recombinantes inter-subtipos (Korber et al., 2000).

A partícula do HIV apresenta forma esférica, com diâmetro aproximado de 100-120 nanômetros. Em sua superfície encontra-se o envelope viral, oriundo da célula hospedeira, constituído de glicoproteínas de superfície (SU ou gp120) e glicoproteína transmembrana (TM ou gp 41) (McCune et al., 1988), produtos da clivagem de uma glicoproteína precursora de 160kDa (kilodaltons).

Abaixo do envelope, encontra-se um segundo envoltório, a matriz (p17), protegendo o capsídeo viral. A proteína p24 forma o nucleocapsídeo viral que contém em seu interior as duas cópias de RNA genômico (ácido ribonucléico) de fita simples e as enzimas que irão atuar na replicação viral denominadas transcriptase reversa (p66), RNase-H (p51), protease (p10) e integrase (p31) (Gelderblom et al., 1987).

1.2 Estrutura genômica e ciclo replicativo

O genoma do HIV mede cerca de 9,8Kb e contém 9 genes classificados em estruturais, regulatórios e acessórios. O gene *gag* (codifica as proteínas do core viral), *pol* [codifica as enzimas virais protease (PT) e transcriptase reversa (TR), integrase (IN)] e *env* (codifica as glicoproteínas,

gp120 e gp41 do envelope) são denominados genes estruturais (Frankel & Young, 1998).

Os genes *tat* e *rev* são denominados regulatórios, pois controlam a regulação da expressão dos genes estruturais e quatro genes acessórios, *nef*, *vif*, *vpr* e *vpu* (HIV-1) / *vpx* (HIV-2) que participam da montagem e liberação do vírus do interior da célula do hospedeiro (figura 1).

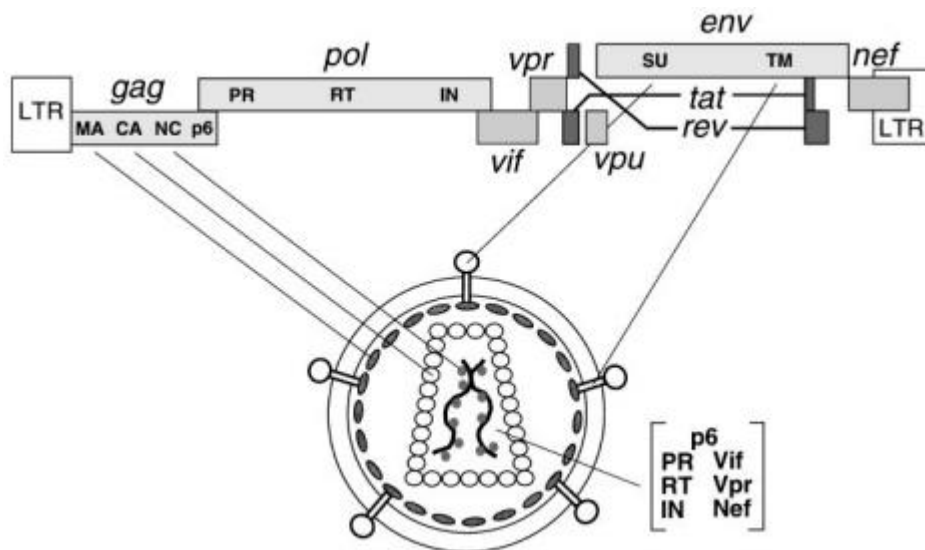


Figura 1: Representação esquemática da organização genômica do HIV-1 (Fonte: Frankel & Young, 1998).

O ciclo replicativo do HIV se inicia com a ligação da partícula viral através da gp120 a receptores CD4 específicos, encontrados na superfície da célula alvo (Klatzmann et al., 1984, Orloff et al., 1991) Em seguida, é necessária uma segunda ligação com os receptores de quimiocina principalmente CCR5 e CXCR4 presentes na membrana da célula alvo para que ocorra a entrada do vírus (D'Souza & Harden, 1996; Clapham & McKnight, 2002). A gp 41 promove a fusão do envelope viral à membrana da célula hospedeira.

O material genético do vírus é introduzido no citoplasma da célula, iniciando o processo de transcrição reversa mediado pela enzima, que a partir da fita molde de RNA viral, transcreve o DNA complementar (cDNA) para posterior formação de uma fita dupla de DNA. Após a transcrição, a fita

molde de RNA é degradada pela RNase-H (Bowerman et al., 1989; Panganiban & Fiore, 1988). A integrase é responsável pela integração do cDNA ao genoma da célula hospedeira, que passa a ser chamado de próvirus (Varmus & Swanstrom, 1985, Whitcomb & Hughes, 1992).

O RNA genômico é produzido a partir deste DNA integrado ao genoma da célula hospedeira e os genes regulatórios, *tat* e *rev* modulam esse processo (Marciniak et al., 1990). No citoplasma, as proteínas do capsídeo e do envelope viral são produzidas e a maturação das mesmas ocorre pela ação da protease. A etapa resultante no processo de maturação ocorre pela clivagem do vírion imaturo da membrana celular, o qual é envolvido pela bicamada fosfolipídica (Göttlinger et al., 1991). Esse processo resulta em um vírion maduro e infeccioso (Campbel & Hope, 2008) (Figura 2).

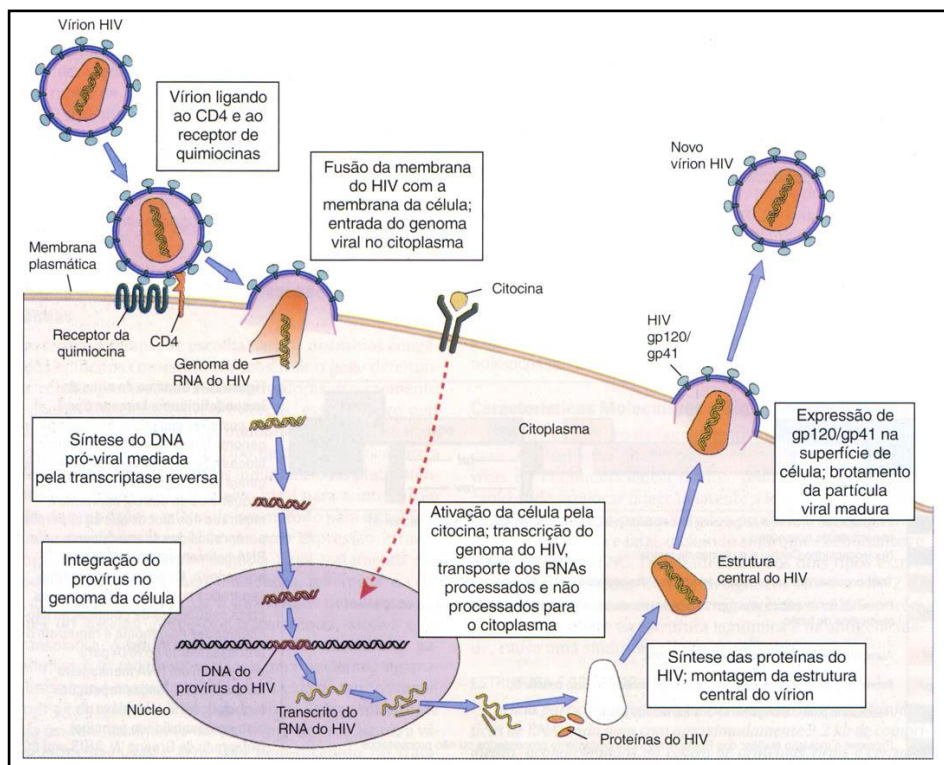


Figura 2 : Etapas da replicação do HIV-1 (Abbas & Lichtman, 2005).

1.3 Epidemia

Dados globais apresentados pelo Programa Conjunto das Nações Unidas em HIV/aids (UNAIDS) estimam que atualmente 34 milhões de pessoas vivam com HIV/aids (PVH/aids), sendo o local mais afetado a África subsaariana. Estima-se que 2,5 milhões de pessoas foram infectadas no ano de 2011, isto é, 20% menos que em 2001, e foram registrados 1,7 milhões de óbitos devido à aids neste mesmo ano, representando um declínio de 24% comparado com o ano de 2005. O mesmo ocorreu com as taxas de transmissão vertical que caíram para 24% quando comparadas com o ano 2009, totalizando 330.000 crianças infectadas (UNAIDS, 2012).

A queda encontrada na incidência da infecção global foi beneficiada pelos países que aumentaram os esforços nos programas de prevenção e tratamento, isto é, prevenção leva a mudança de comportamento e tratamento diminui a carga viral, ambos contribuindo para diminuir o risco de novas infecções (UNAIDS, 2012).

No entanto, a prevalência da infecção em determinadas populações-chave como trabalhadores do sexo, homens que fazem sexo com homens e usuários de drogas endovenosas permanecem elevadas, e conter a infecção nessas populações específicas torna-se um desafio por parte dos órgãos competentes (UNAIDS global report, 2012).

O controle da infecção pelo HIV tornou-se um dos objetivos a serem atingidos para o desenvolvimento do milênio. Portanto, foi instituído em 2011 pela organização das Nações Unidas (ONU) uma Declaração Política sobre o HIV/aids, que estabelece 10 metas a serem cumpridas por parte dos Estados Membros, inclusive o Brasil, para enfrentar o HIV, cujo prazo foi estabelecido para 2015 (UNAIDS, 2011).

Basicamente, as metas preconizam reduzir as taxas de transmissão do HIV em 50% dos casos, tanto pela via sexual quanto em usuários de drogas, assim como, reduzir a mortalidade devido à tuberculose em indivíduos infectados, assim como eliminar os casos de transmissão vertical. Outra

meta é aumentar o acesso à terapia antirretroviral para elevar o número de pessoas em tratamento (UNAIDS, 2012)

1.3.1 Epidemia no Brasil

O Brasil registrou 656.701 casos da infecção pelo HIV desde 1980 até 2012, sendo 65,4% (397.662) em homens e 34,6% (210.538) em mulheres, com taxa de incidência de 20,1 casos por 100 mil habitantes. A maioria dos casos está localizada na região sudeste (Boletim Epidemiológico MS, 2012).

A epidemia do HIV no Brasil apresenta-se concentrada em determinadas populações-chave. A taxa de prevalência da infecção na população de 15 a 49 anos é estimada em 0,3% a 0,6%. (Unaid report 2012; Szwarcwald et al., 2008). Esse número se eleva de: trabalhadores do sexo, homens que fazem sexo com homens e usuários de drogas endovenosas, onde a prevalência da infecção é estimada, respectivamente, em 4,9%, 10,5% e 5,9% (Bastos; Kerr; Szwarcwald, 2009).

A busca por novos casos de aids permanece um desafio no Brasil. Estima-se que 530 mil pessoas vivam com HIV/aids no país e dessas, 135 mil não sabem ou nunca fizeram o teste para o diagnóstico da infecção (Ministério da Saúde – Departamento de DST, Aids e Hepatites virais).

Segundo a UNAIDS, menos de 25% dos homens que fazem sexo com homens realizaram o exame de diagnóstico do HIV no Brasil, e a mesma taxa de testagem foi encontrada para a população de usuários de drogas endovenosas. Portanto, é necessário criar métodos específicos que sejam direcionadas para o diagnóstico, principalmente nessas populações (Unaid Global report, 2012).

O tratamento dos indivíduos infectados pelo HIV no Brasil é oferecido gratuitamente pelo Sistema Único de Saúde (SUS), onde o tratamento é disponível, com diferentes drogas antirretrovirais (Ministério da Saúde – Departamento de DST, Aids e Hepatites virais).

1.4 Terapia antirretroviral

O tratamento dos indivíduos infectados não tem como finalidade a erradicação da infecção pelo HIV, mas melhorar a qualidade e a expectativa de vida dos indivíduos que vivem com HIV/Aids. O objetivo é impedir a replicação do vírus e o sucesso é atingido através da supressão da carga viral plasmática (Ministério da Saúde, 2013).

O acesso aos antirretrovirais (ARVs) por parte dos indivíduos infectados foi o fator responsável pelo controle da epidemia. No ano de 2012, estimou-se que 9,7 milhões de pessoas estavam em tratamento em todo o mundo. Desde 2011, o acesso aos ARVs aumentou em 1,7 milhões de indivíduos e a meta estabelecida para 2015 é aumentar para 15 milhões de pessoas em tratamento (WHO, 2013).

No Brasil, 217 mil pessoas têm acesso aos ARVs (www.aids.gov.br). No entanto, de acordo com o relatório brasileiro, que fornece informações atualizadas sobre a epidemia do HIV, elaborado pela UNAIDS juntamente com o Ministério da Saúde em junho de 2013, registra uma estimativa diferente, onde 313.175 indivíduos estão em tratamento antirretroviral (UNAIDS_BRASIL).

O sucesso da cobertura do tratamento se deve no Brasil aos esforços do Ministério da Saúde, que desde 1996 quando foi publicada a Lei 9.313, se tornou um dos únicos países a garantir gratuitamente acesso aos antirretrovirais para os pacientes infectados pelo HIV, através do SUS (Ministério da Saúde, 2013).

O momento propício para o início da terapia antirretroviral é uma das questões mais relevantes no acompanhamento clínico dos pacientes, e diversos esforços são dispensados para elucidar essa questão. Atualmente, existe uma tendência global para início de tratamento mais precocemente (WHO, 2013). A contagem de células T CD4 é o indicador laboratorial mais importante para definir o início do tratamento antirretroviral, pois estabelece o risco de progressão para aids e morte (Ministério da Saúde, 2013).

As recomendações recentes para início de tratamento da Organização Mundial de Saúde (*World Health Organization – WHO*), publicada em 2013, contempla o uso de tratamento antirretroviral (TARV) em um número maior de pessoas. Basicamente, se recomenda o início do tratamento em indivíduos com contagem de células T CD4 < 500 células/mm³ de sangue e o início imediato do tratamento em mulheres grávidas infectadas com HIV, indivíduos que mantenham relações com parceiros soro discordantes e co-infectados com tuberculose e hepatite B. Recomenda ainda tratamento para crianças menores do que cinco anos vivendo com HIV, independente do valor das células CD4. Estimativas prospectivas do uso do novo *guideline* demonstram que pelo menos três milhões de mortes e aproximadamente 3,5 milhões de novos casos poderão ser evitados em 2025 (WHO, 2013).

Atualmente no Brasil, o Ministério da Saúde recomenda início do tratamento em todos os indivíduos sintomáticos e também em assintomáticos com contagem de CD4 < 500 células/mm³. Além disso, foram contemplados casais em relação soro discordantes (ou seja, um parceiro com sorologia negativa e o outro com sorologia positiva para o HIV) e todas as gestantes independentemente da contagem de CD4 (Ministério da Saúde, 2013).

Os pacientes em tratamento são acompanhados no serviço ambulatorial através dos parâmetros laboratoriais de carga viral e contagem de células T CD4+. A periodicidade do acompanhamento clínico varia de acordo com a fase do tratamento. Os pacientes adaptados ao uso de TARV são acompanhados no serviço em intervalo médio de quatro meses. O resultado dos exames de carga viral e CD4 dos pacientes são alimentados em plataformas específicas do Ministério da Saúde (Ministério da Saúde, 2013).

Os pacientes que apresentarem durante o acompanhamento clínico carga viral plasmática detectável, após seis meses do início ou modificação do esquema de TARV, são caracterizados como falha virológica. O surgimento deste fenômeno pode ser consequência de má adesão ao

tratamento, resistência viral ou baixa potência do regime de tratamento (Ministério da Saúde, 2013).

Após a detecção da falha virológica, é recomendada a realização do exame de genotipagem do HIV, disponível no SUS pela Rede Nacional de Genotipagem, como ferramenta de detecção de resistência aos ARVs. Após a análise do teste, um novo esquema de TARV é prescrito, sendo denominado como terapia de resgate (TR) (Ministério da Saúde, 2013).

Atualmente, o arsenal terapêutico disponível no Brasil compreende 22 ARVs, os quais são distribuídos em diferentes classes de acordo com a fase do ciclo celular viral que interferem. As classes de ARVs estão divididas em: inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeos e nucleotídeos (ITRN), Inibidores da transcriptase reversa não análogos de nucleosídeos (ITRNN), inibidores da protease (IP), inibidores da integrase (INI), inibidores de fusão e os antagonista de CCR5 (Levy, 2010).

Os ITRNs, moléculas chamadas análogos de nucleosídeos, atuam na enzima transcriptase reversa, incorporando-se à cadeia de DNA que o vírus sintetiza. Essa incorporação torna essa cadeia defeituosa, impedindo que o HIV replique adequadamente. Os ITRNNs, não análogos de nucleosídeos, são medicamentos que bloqueiam diretamente a ação da transcriptase reversa e a replicação do vírus (Levy, 2010).

Os ARVs da classe dos IPs agem na enzima protease viral e impedem a maturação da partícula viral. São moléculas que mimetizam o substrato natural da enzima e bloqueiam a ação da enzima no momento da sua ligação no sitio catalítico da enzima. Os IPs possuem uma barreira genética maior quando comparados aos ITRN e em especial aos ITRNNs, pois em geral necessitam de um acúmulo de mutações para a perda da susceptibilidade (Levy, 2010). A tabela 1 exemplifica os ARVs descritos acima.

Tabela 1: Principais antirretrovirais das classes dos ITRN, ITRNN e IP.

ITRN	ITRNN	IP
Zidovudina (AZT)	Nevirapina (NVP)	Atazanavir (ATV)
Didanosina (DDI)	Efavirenz (EFV)	Darunavir (DRV)
Estavudina (D4T)	Etravirina (ETV)	Fosamprenavir (FPV)
Lamivudina (3TC)		Indinavir (IDV)
Abacavir (ABC)		Lopinavir (LPV)
Emtrecitabina (FTC)		Nelfinavir (NFV)
Tenofovir (TDF)		Saquinavir (SQV)
		Tipranavir (TPV)
		Ritonavir (RTV)

Os inibidores da integrase (INIs) impossibilitam a inserção do cDNA viral no genoma humano e são designados como inibidores de transferência de fita. O Raltegravir (RAL) é o medicamento disponível desta classe, usado principalmente em indivíduos multifalhados (Levy, 2010).

Os inibidores de fusão agem na gp41 impedindo a fusão da membrana viral com a célula do hospedeiro. O Enfuvirtida (T-20) é o único medicamento licenciado para uso clínico, sua administração é por via subcutânea, o que dificulta sua adesão. Os antagonistas de CCR5 impedem a entrada do vírus através do bloqueio do correceptor celular (Levy, 2010).

Os medicamentos das classes de ITRN, ITRNN e IP são preconizados pelo Ministério da Saúde como medicamentos de primeira linha para início de TARV pelos pacientes. Em contrapartida, os medicamentos da classe dos inibidores de fusão, inibidores de integrase e antagonistas de CCR5 são preconizados para uso em terapia de resgate (Ministério da Saúde, 2013).

1.5 Antagonista de CCR5

Os antagonistas de CCR5 são medicamentos de uma nova classe, sendo o único ARV dentre todos os desenvolvidos até o momento que não age diretamente na enzima viral. A interrupção da infecção ocorre através do bloqueio do correceptor de quimiocina presente na membrana celular do hospedeiro (MacArthur & Novak, 2008).

O HIV entra na célula através da ligação inicial da gp120 do vírus com o receptor CD4 da célula alvo. Uma segunda ligação com o correceptor de quimiocina é essencial, pois induz uma mudança conformacional na gp41 do vírus (figura 4). Em seguida, ocorre a fusão da membrana viral com a célula hospedeira e a liberação do material genético do vírus dentro do citoplasma (Alkhatib et al., 1996; Briz et al, 2006). Sabe-se que a região V3 da gp120 é a principal forma de interação com o correceptor de quimiocina (figura 5). Portanto, a predição do tropismo pode ser realizada a partir da sequência genética desta região (O'Brien et al., 1990).

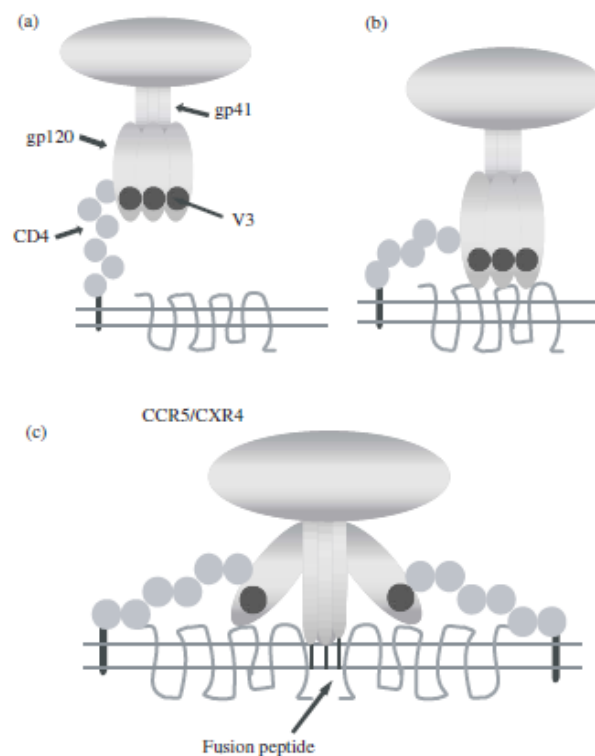


Figura 3: Representação esquemática da entrada do HIV na célula alvo (Briz et al., 2006).

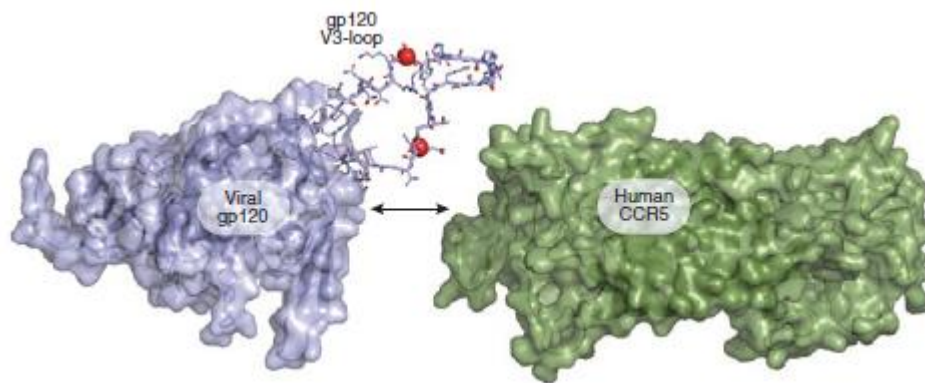


Figura 4: Representação tridimensional da interação da região V3 da glicoproteína gp120 do envelope viral com o correceptor de quimiocina da célula alvo (Lengauer et al., 2007).

O HIV tem tropismo principalmente pelos correceptores CCR5 ou CXCR4 para infectar a célula alvo, sendo chamado respectivamente, de vírus R5 ou X4. Existem também indivíduos que hospedam vírus classificados como duo-trópicos, isto é, que conseguem infectar a célula alvo através de ambos os correceptores. Esse fenômeno acontece tanto quando os indivíduos hospedam as duas populações virais misturadas (R5 e X4), ou quando apresentam uma população viral que tem afinidade por ambos os correceptores. (Berger et al., 1998). A figura abaixo exemplifica a classificação do tropismo do HIV.

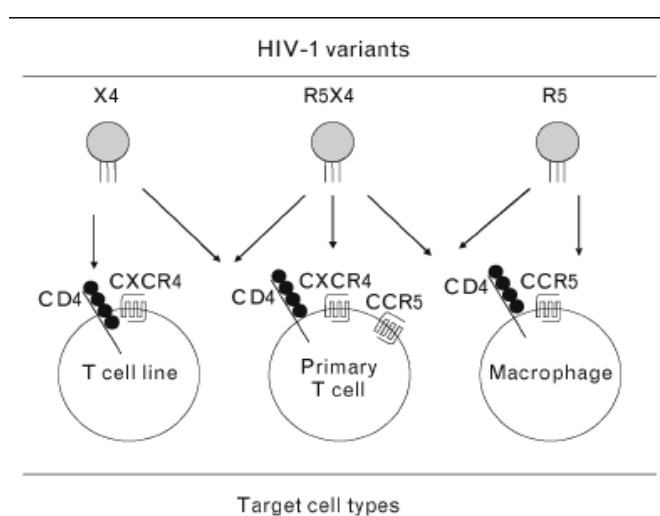


Figura 5: Representação esquemática do tropismo do HIV e o uso dos correceptores CXCR4 e CCR5 presentes nas células alvo (Alkhatib et al., 2009).

Os vírus R5 são frequentemente encontrados em infecções primárias e são mais eficientes em infectar novos indivíduos que os vírus X4 (Schuitemaker et al., 1991). No entanto, durante o curso da infecção, por volta de 50% dos indivíduos infectados evoluem para a troca do tropismo viral e a infecção ocorre preferencialmente através do correceptor CXCR4 do que pelo CCR5 (Berger et al., 1999; Verhofstede et al., 2012).

Após o surgimento dos vírus com tropismo pelo correceptor CXCR4, na grande maioria dos casos, as variantes R5 permanecem coexistindo simultaneamente no mesmo indivíduo (Koot et al., 1996). O aparecimento de vírus X4 é frequentemente encontrado em estágios mais avançados da infecção. Os indivíduos durante esta fase apresentam menor valor de células T CD4 e progressão mais rápida para eventos de aids (Fouchier et al., 1996; Goetz, et al., 2009;). A figura abaixo mostra a evolução do tropismo de acordo com o tempo de infecção.

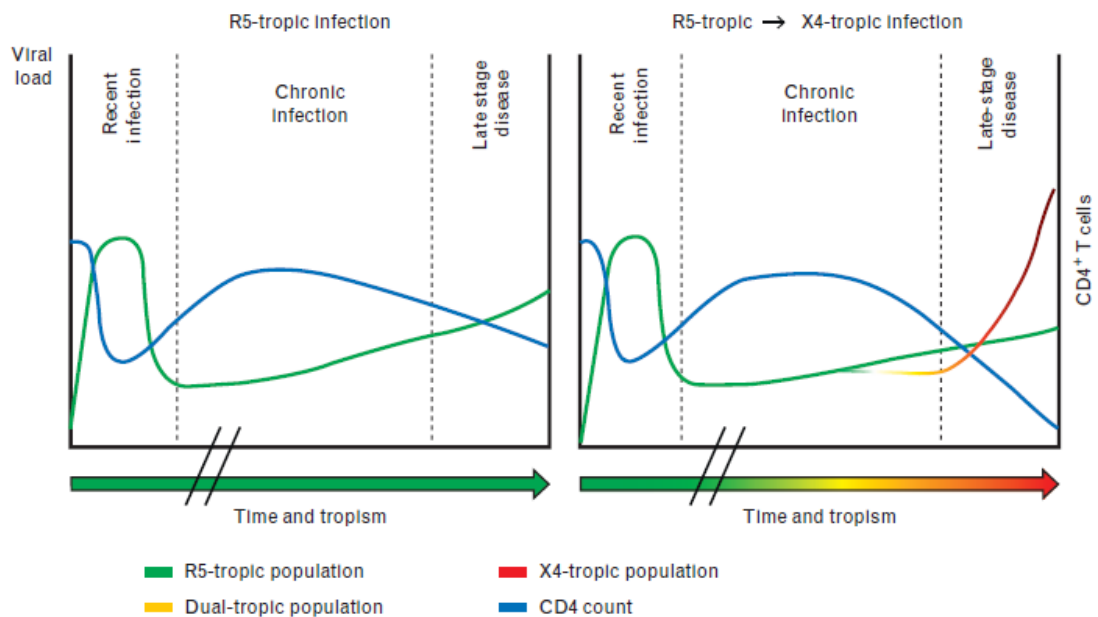


Figura 6: Evolução do tropismo viral do HIV, de acordo com o tempo de infecção (Verhofstede et al., 2012).

O mecanismo da evolução do tropismo R5 para X4 não está totalmente elucidado e não se sabe corretamente se a presença da variante

X4 na fase mais avançada da infecção pelo HIV tem uma associação causal, devido à patogenicidade desta variante em induzir a progressão para AIDS, ou simplesmente uma consequência da progressão da doença (Connor et al., 1997).

1.5.1 Função fisiológica dos correceptores

Os correceptores CXCR4 e CCR5 presentes na célula hospedeira são receptores de quimiocinas pertencentes a uma família de receptores acoplados à proteína G (Allen et al., 2007). A estrutura molecular de CCR5 consiste em 3 loops extracelulares (ECL1, ECL2 e ECL3), uma porção N terminal, responsável pela ligação da quimiocina e 3 loops intracelulares, além da porção C terminal. A porção C é responsável pela transdução do sinal de ativação e expressão dos diversos sinais nas células envolvidas no recrutamento dos leucócitos, angiogênese e inflamação (Viola & Luster, 2008).

O correceptor CCR5 está presente na membrana de diversas células incluindo os linfócitos T, macrófagos e células dendríticas. Já o correceptor CXCR4 está presente na membrana principalmente dos linfócitos T (Lee et al., 1999).

Alguns indivíduos podem apresentar uma mutação no gene que codifica a expressão do correceptor CCR5, e quando presente interfere na progressão da infecção do HIV. A mutação em homozigose, chamada de deleção do delta 32, confere ausência da expressão desta proteína e os indivíduos são resistentes à infecção pelo HIV, além de apresentarem ativação imune reduzida (Liu et al., 1996; Huang et al., 1996). Em heterozigose foi observado que os indivíduos apresentam progressão mais lenta da doença, menor decréscimo das células CD4 e menor valor de carga viral plasmática (de Roda Husman et al., 1997).

1.5.2 Maraviroque

A descoberta do correceptor CCR5 e o efeito benéfico apresentado pelos indivíduos infectados pelo HIV com deleção para esse gene despertou o interesse dos pesquisadores e de empresas farmacêuticas em descobrir compostos que mimetizassem os ligantes naturais dos correceptores de CCR5 (Gillian et al., 2011). Nesse sentido, foi desenvolvido pela Pfizer o medicamento maraviroque (MQV), Celsentri, que atua como antagonista de CCR5, e até o momento é o único medicamento desta classe que possui aprovação pelo FDA (*Food and Drug Administration*) e ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) para uso clínico. O medicamento só é efetivo em vírus R5, portanto para sua prescrição é necessário um teste de tropismo que identifique apenas variantes R5. A figura 8 mostra a estrutura molecular do antagonista de CCR5.

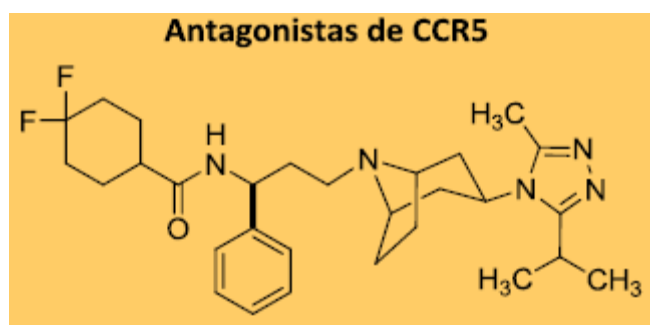


Figura 7: Esquema molecular do antagonista CCR5, maraviroque (Fonte: Miranda et al., 2010).

O MQV é um inibidor alostérico do correceptor CCR5. Após se ligar na porção transmembrânica do correceptor, uma alteração estrutural na porção extracelular (ECL2) é induzida, a qual se liga no loop V3 da gp120 do vírus. Esta alteração estrutural da porção ECL2 do correceptor torna a molécula irreconhecível pela gp120 do vírus, impedindo a entrada do vírus na célula. A figura 9 ilustra o local de ação do MQV (Westby & Ryst, 2005).

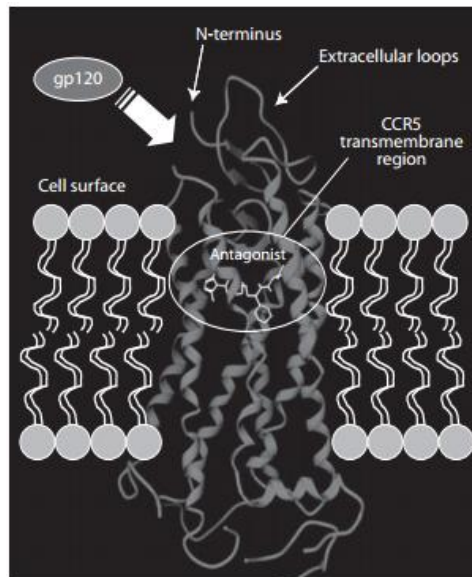


Figura 8: Representação esquemática do local de ação do maraviroque no correceptor CCR5 presente na membrana da célula alvo para infecção pelo HIV (Fonte: Westby & Ryst, 2005).

1.5.3 Estudos clínicos com maraviroque

O MQV teve aprovação para uso clínico como parte do esquema terapêutico em indivíduos adultos experimentados e virgens de tratamento (*naïves*), com licença concedida pelo FDA em 2007 e 2009, respectivamente (www.fda.gov).

A aprovação pelo FDA do MQV em indivíduos experimentados foi baseada no estudo feito em 63 pacientes infectados pelo HIV, todos classificados com tropismo R5, e que receberam o MQV por 10 dias como monoterapia. Foi observado que os pacientes que receberam o MQV reduziram a carga viral em 1 log de cópias/mL, concluindo que houve efeito antiviral do medicamento (Fätkenheuer et al., 2005).

Em seguida, foram desenvolvidos em paralelo dois grandes estudos multicêntricos, duplo-cego, controlados com placebo e de fase 3 para avaliar eficácia e a tolerância do MQV, denominados *Maraviroc versus Optimized Therapy in Viremic Antiretroviral Treatment-Experienced Patients* (MOTIVATE 1 e 2). O MOTIVATE 1 foi realizado no Canadá e Estados

Unidos e o MOTIVATE 2 foi realizado na Austrália, Europa e Estados Unidos (Gulick et al., 2008).

Durante o estudo, foram avaliados 1049 pacientes. Todos apresentavam carga viral acima de 5000 cópias/mL e já haviam utilizados ARVs das classes de ITRN, ITRNN e IP. Em seguida, foi administrado um regime de tratamento com MQV, 1 ou 2 vezes ao dia, juntamente com outros ARVs, escolhidos através do histórico de tratamento e pelo teste de resistência, chamado de terapia otimizada (OBT). Após 48 semanas de tratamento, foi observado que os pacientes que utilizaram o MQV, independentemente da dose, diminuíram significativamente a carga viral, comparados com o grupo placebo. Ao final do estudo, concluiu-se que o efeito do MQV no controle da carga viral, em indivíduos adultos experimentados (Gulick et al., 2008).

A aprovação do uso clínico do MQV em pacientes virgens de tratamento foi baseada no estudo *Maraviroc versus Efavirenz in Treatment-Naive Patients* (MERIT). Neste estudo, foi comparada a utilização do maraviroque (MQV) e do efavirenz (EFV), juntamente com zidovudina (AZT) e Lamivudina (3TC) como primeiro esquema terapêutico. Todos os indivíduos foram classificados com tropismo R5 (Cooper et al., 2010).

No total, foram avaliados 721 pacientes, 360 utilizaram o MQV no esquema terapêutico com duas doses diárias, e 361 utilizaram o EFV. Após 48 semanas de uso, ambos os grupos apresentaram resultados similares. Foi observado que 65% dos pacientes do grupo MQV apresentaram carga viral abaixo de 50 cópias/mL e para o grupo EFV esta taxa foi de 69% (Cooper et al., 2010).

O uso do MQV em indivíduos duo-trópicos, ou seja, que apresentam 2 populações virais R5 e X4 misturadas, demonstrou-se ineficaz. O estudo clínico MERIT descrito acima, corrobora essa informação. Em uma primeira análise foi observado que os pacientes do grupo com MQV apresentaram falha virológica maior, comparado ao grupo que usou EFV. No entanto, os pacientes foram re-analizados quanto ao tropismo, através do uso de um teste mais sensível. Em seguida, foi observado que os pacientes com falha

virológica na verdade apresentavam vírus com tropismo CXCR4 (Cooper et al., 2010).

Outro estudo elaborado para avaliar a eficácia do MQV em indivíduos classificados com tropismo viral duo-trópico também demonstrou a ineficiência do antagonista de CCR5 nesta população. No estudo, foram avaliados 167 pacientes classificados com tropismo duo-trópico, todos com doença avançada, multiexperimentados e com carga viral acima de 5.000 cópias/mL. Os pacientes selecionados receberam a TARV com MQV administrado 1 ou 2 vezes ao dia, juntamente com terapia otimizada, e um segundo grupo não usou MQV (grupo placebo). Após 24 semanas de tratamento, observou-se que os dois grupos de pacientes apresentaram resposta virológica semelhante, com queda de aproximadamente um log na carga viral, comparado com o *baseline*. Portanto, o uso do MQV demonstrou-se exclusivamente eficiente em pacientes com vírus R5 (Saag et al., 2009).

1.5.4 Benefício imunológico do maraviroque

O MQV além da atividade antiviral descrita foi relacionado com benefícios imunológicos. Foi observado que o uso deste ARV aumenta o número de células T CD4, considerado o principal marcador imunológico para avaliar a progressão da doença. Os estudos MOTIVATE 1- 2 e o estudo MERIT, descritos previamente, demonstraram que os pacientes apresentaram valor significativamente superior de células T CD4 ao final do estudo comparados com os grupos controles (Gulick et al., 2008; Cooper et al., 2010). Além disso, outros estudos demonstraram que os indivíduos em uso de MQV apresentam ativação celular diminuída (Westrop et al., 2012; Wilkin et al., 2012).

1.5.5 Mecanismos de resistência do maraviroque

Embora o MQV atue no correceptor da célula hospedeira e não diretamente na enzima viral, o mecanismo de resistência e a falha virológica podem ocorrer. O primeiro mecanismo indica o surgimento de variantes X4 como fator preponderante, sendo este a principal forma descrita de falha virológica. Sabe-se que a maioria das infecções se origina de um vírus R5, e que em 50 % dos casos, variantes X4 podem emergir. Como descrito previamente, o MQV só é efetivo em variantes virais R5, portanto a evolução de variantes X4 pode levar à resistência ao medicamento (Moore & Kuritzkes, 2009).

Nesse contexto, indivíduos em tratamento com MQV, onde o teste de tropismo não foi sensível o suficiente para detectar variantes minoritárias X4, podem induzir a falha virológica. Como demonstrado no trabalho MOTIVATE, os pacientes que mostraram falha terapêutica tiveram troca de tropismo R5 para X4, basicamente pela emergência de variantes minoritárias X4 não detectados no início do tratamento (Fätkenheuer et al., 2008). O estudo MERIT, descrito previamente, também mostrou falha virológica nos pacientes, onde o teste de tropismo não detectou variantes minoritárias X4, previamente ao início do tratamento com MQV (Cooper et al., 2010).

O segundo mecanismo de resistência relacionado ao uso do MQV, pode estar relacionado ao aparecimento de mutações na gp120 do vírus, fazendo com que ele consiga reconhecer e se ligar no correceptor da célula alvo, mesmo com a alteração estrutural ocorrida devido à ligação do antagonista de CCR5 (Westby et al., 2007; Moore & Kuritzkes, 2009).

O aparecimento de mutações na região V3 e também em outras regiões dentro do envelope têm sido sugerido como o responsável por esse processo. No entanto, é difícil estabelecer o padrão das mutações devido à heterogeneidade dos casos e à escassez de trabalhos *in vivo* (Tilton et al., 2010).

1.5.6 Metabolismo, interações farmacológicas e posologia do maraviroque

O MQV deve ser administrado por via oral, cada comprimido contém 150 mg ou 300 mg da droga e a dose varia de acordo com as interações medicamentosas do paciente. De acordo com o fabricante (Pfizer), o MQV é metabolizado no fígado através das enzimas do sistema do citocromo P450, principalmente pela enzima CYP3A. A administração concomitante desta droga com medicamentos que induzem ou inibem a ação da CYP3A4 podem influenciar no perfil farmacocinético do MQV, e interferir na eficácia do tratamento com o antagonista de CCR5 (www.viivhealthcare.com).

As reações adversas descritas com o uso do MQV segundo o fabricante (Pfizer) variam desde efeitos secundários frequentes (exemplos: náuseas, fadiga, diarreia e cefaleia), pouco frequentes (exemplos: pneumonia, espasmos e mialgia) e raros (exemplos: mielotoxicidade, dor no peito e alguns tipos de cancro) (www.viivhealthcare.com).

Os estudos clínicos MOTIVATE e MERIT concluíram que o antagonista de CCR5 apresenta baixa toxicidade e é bem tolerado pelos pacientes. No estudo MOTIVATE, os efeitos adversos foram considerados incomuns. Nos diferentes grupos avaliados, não houve diferença estatística entre a taxa de descontinuação da terapia devido a efeitos adversos. A reclamação mais frequente dos pacientes, quando relatada, foi cefaleia (Gulick et al., 2008).

No estudo MERIT, a taxa de incidência de efeitos adversos foi similar entre os grupos de pacientes que utilizaram MQV e o grupo que utilizou EFV. No grupo MQV, a reclamação mais comum foi bronquite e nasofaringite e no grupo EFV as reclamações mais frequentes foram diarreia, cefaleia, fadiga, tosse, dor abdominal e inflamações cutâneas (Cooper et al., 2010).

1.5.7 Prescrição do maraviroque no Brasil

No Brasil, o MQV foi incluído como um antirretroviral disponível para o manejo de pacientes em tratamento do HIV desde 23 de outubro de 2012, de acordo com a portaria número 44 da Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos do Ministério da Saúde (SCTIE-MS) e foi ofertado pelo SUS para uso, a partir de maio de 2013.

A Comissão Técnica Assessora para Terapia Antirretroviral em Adultos Infectados pelo HIV propôs a incorporação do MQV para pacientes multiexperimentados, com objetivo de oferecer novas classes de ARVs para pacientes em uso de esquemas contendo ARVs de terceira linha (darunavir, etravirine, enfuvirtide e raltegravir) em falha terapêutica. Nesse contexto, é preconizada sua utilização em indivíduos com indicação de tratamento de resgate, onde não é possível estruturar um esquema com pelo menos dois ARVs ativos, de primeira e segunda linha (Ministério da Saúde).

Segundo a Nota Técnica nº 172/2013, do Ministério da Saúde, o MQV deve ser indicado aos pacientes em falha terapêutica confirmada (carga viral acima de 1000 cópias/mL após 6 meses do início do esquema atual), e nos pacientes falhados a pelo menos um antirretroviral das classes de ITRN, ITRNN e IP, confirmado através de um teste de genotipagem. Deve-se também realizar um teste de tropismo genotípico (genotropismo) que identifique vírus R5 até no máximo, três meses antes do uso do maraviroque (Ministério da Saúde, 2013).

1.5.8 Teste de tropismo para utilização do maraviroque

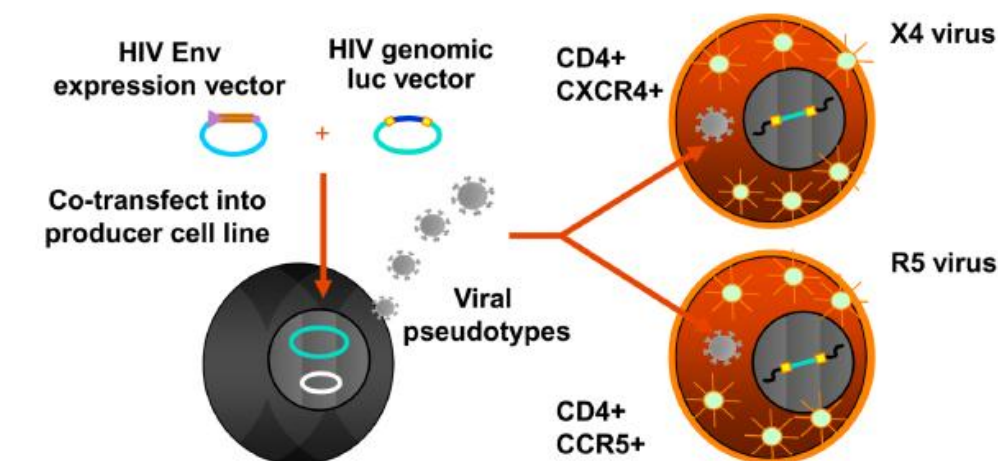
Como citado anteriormente, a prescrição do MQV só deve ser realizada mediante o resultado de um teste de tropismo validado e sensível que detecte a presença de variantes virais R5 (Pfizer).

Nesse sentido, o teste de tropismo fenotípico Monogram Trofile™, realizado pelo laboratório Monogram Biosciences em São Francisco – Califórnia – Estados Unidos (EUA) é o teste considerado padrão ouro. O

Trofile™ é o único teste de tropismo validado com aprovação obtida em 2004, pelo CLIA (*Clinical Laboratory Improvement Amendments*), órgão responsável por fiscalizar os procedimentos laboratoriais realizados nos Estados Unidos (Whitcomb et al., 2007) .

O Trofile™ é um ensaio fenotípico baseado em uma tecnologia de vírus recombinante em que um pseudovírus é gerado. Resumidamente, 2 plasmídeos são gerados, um apresenta genes do envelope derivados da população viral do paciente analisado e o segundo apresenta os genes da região polimerase e gag do HIV, além de um gene repórter de luciferase. Os plasmídeos são transfectados numa linhagem celular de produção. Em seguida, os vírus resultantes são testados frente a duas populações celulares que expressam o correceptor CCR5 e outra o CXCR4. A infecção é quantificada pela atividade da luciferase presente nas células-alvo. (Whitcomb et al., 2007).

O teste fenotípico Trofile™ identifica individualmente o tropismo viral dos pacientes com populações virais R5, X4 ou a combinação de ambos, chamado *dual-mixed* (DM), ou duo-trópicos (Figura 09).



Adapted from Whitcomb J, et al. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51:566-575.

Figura 9: Ilustração da tecnologia do tropismo fenotípico do HIV frente células alvo que expressam o correceptor CXCR4 e CCR5 (Fonte: Moore & Kuritzkesb, 2009).

Sabe-se que o HIV se organiza na forma de quasispecies, isto é, vírus distintos, porém relacionados. Portanto, é importante avaliar a sensibilidade do ensaio de tropismo em detectar populações virais minoritárias. Nesse sentido, o primeiro ensaio desenvolvido, chamado original Trofile™ ou OTA (*original tropism assay*), apresentava sensibilidade para detectar populações virais minoritárias X4 de 10% (Whitcomb et al., 2007).

A fim de refinar a sensibilidade do método, em 2008 a Monogram Biosciences desenvolveu um ensaio de tropismo chamado, *Trofile™ enhanced sensitivity tropism assay* (ESTA) com 100% de sensibilidade para detectar 0.3 % de populações virais minoritárias com tropismo CXCR4 (Reeves et al., 2009).

O ensaio fenotípico *Trofile™* foi utilizado para a determinação do tropismo dos principais estudos clínicos (MOTIVATE/MERIT) realizados para avaliar a resposta clínica dos pacientes após utilização do MQV, demonstrando boa concordância com a resposta virológica dos pacientes estudados (Cooper et al., 2010 ; Gulick et al., 2008).

No entanto, o teste apresenta algumas limitações técnicas como não pode ser realizado em amostras de pacientes com carga viral abaixo de 1000 cópias/mL, e inicialmente não poderia ser realizado em amostras de DNA proviral. Além disso, é um teste dispendioso, as amostras devem ser enviadas aos EUA (único laboratório validado) e, portanto acarreta uma demora na obtenção dos resultados. Essas limitações dificultam a utilização do ensaio em larga escala, principalmente nos países em desenvolvimento (Rose et.al, 2009).

Em alternativa aos ensaios fenotípicos, foram desenvolvidos ensaios genotípicos para avaliar o tropismo, denominados genotropismo. O ensaio é baseado na amplificação e sequenciamento convencional da região V3 do envelope viral. Sabe-se que mutações localizadas principalmente nesta região em vírus R5 poderiam explicar a troca do tropismo do correceptor CCR5 para CXCR4 (De jong et al., 1992).

A partir da sequência V3, formada em geral por 35 aminoácidos, diversos algoritmos de interpretação foram desenvolvidos para prever o

tropismo viral (Sierra et al., 2007). A figura abaixo apresenta a sequência de aminoácidos pertencentes à região V3 do HIV subtipo B.

C T R P N N N T R K S I H I G P G R A F Y T T G E I I G D I R Q A H C

Figura 10: Aminoácidos da região V3 do envelope viral de HIV; consenso de vírus B obtido pelo site geno2pheno coreceptor.

A primeira forma descrita e mais comum para predição do tropismo é chamada de regra 11/25. A regra recomenda que sequências com aminoácido básico arginina (R), lisina (K) e histidina (H) presente na posição 11 e/ou 25 da região V3 sejam classificadas como vírus X4 (Korber et al., 1993).

No entanto, mutações em outras posições da V3, foram associadas com o fenótipo X4, levando a uma baixa sensibilidade da regra 11/25 na predição do tropismo (Jensen et al., 2003). De acordo com o estudo de Sing et al. 2007, esta ferramenta apresentou 59,6% de sensibilidade e 92,5% de especificidade.

Devido à baixa sensibilidade principalmente em detectar variantes minoritárias X4, o grupo da Universidade de Washington desenvolveu a ferramenta de predição de tropismo, disponível livremente na web, PSSM (*position-specific scoring matrices*) que leva em considerações outras mutações nos aminoácidos da região V3 do envelope relacionadas com o fenótipo X4 do vírus (Jensen et al., 2003).

A ferramenta PSSM indica a probabilidade de a sequência teste ser referente a um vírus R5 ou X4. Para tal, um modelo de matriz de pontuação foi desenvolvido, onde para cada sequência a ser analisada uma pontuação é calculada, considerando todos os aminoácidos da região V3. A construção do modelo foi realizada, a partir de 470 sequências V3 obtidas por clonagem de vírus classificados fenotipicamente como R5 e X4 (Jensen et al., 2003).

Outra ferramenta de bioinformática, desenvolvida com a finalidade de prever o tropismo através da sequência V3 é o *Geno2phenocorreceptor*, desenvolvida pelo Instituto Max Planck da Alemanha. Similarmente ao PSSM, esta ferramenta utiliza sequências com fenótipo conhecido de vírus

R5 e X4 como base para a construção de um modelo estatístico, *support vector machines* (SVM) (Sing et al., 2007).

O modelo permite selecionar um nível de especificidade que define o grau de conservação da análise para selecionar variantes X4. Para cada sequência avaliada uma taxa de falso positivo (FPR) é obtida e a seleção de um ponto de corte (*cutoff*) permite definir a especificidade da análise (Lengauer et al., 2007).

O geno2pheno está disponível livre na web, de fácil manuseio e a sequência avaliada deve ser submetida no formato FASTA. O resultado da análise origina um valor de falso positivo e de acordo com o nível de especificidade selecionado previamente, a ferramenta permite prever o tropismo R5 ou X4 da sequência (Lengauer et al., 2007).

A ferramenta também permite adicionar informações clínicas como valor absoluto e percentagens de células T CD4/CD8, nadir de CD4 (menor CD4 que o paciente apresentou) e também informações sobre mutação do delta 32 do correceptor CCR5, e então uma análise adicional da classificação do tropismo é realizada. No entanto, o uso de informações clínicas só foi avaliado em um grupo de pacientes virgens de tratamento (Sing et al., 2007).

Mais recentemente, a tecnologia de sequenciamento em larga escala foi utilizada para a determinação do tropismo. Essa tecnologia é mais robusta que o sequenciamento convencional e possibilita detectar para cada paciente um número maior de sequências V3, aumentando a detecção das quasispecies e possivelmente de variantes minoritárias X4. A interpretação das sequências é realizada através das ferramentas de bioinformática descritas previamente. No entanto, é uma tecnologia cara e difícil de ser implantada nos laboratórios de rotina clínica, e estudos de validação precisam ser realizados (Archer et al., 2009).

Segundo Swenson et al., (2011) essa tecnologia encontrou 84% de sensibilidade e 81% de especificidade, de acordo com o Trofile™, e utilizando como referência o sequenciamento convencional a concordância

de ambas as metodologias foi de 80% , com 64% de sensibilidade e 93% de especificidade.

1.5.9 Validação das ferramentas de predição genotípica

A fim de avaliar a eficácia dos ensaios genotípicos, estudos comparativos foram realizados utilizando o teste fenotípico como referência. A concordância entre os testes variou de acordo com a ferramenta de interpretação genotípica utilizada. Seclen et al. 2010, compararam o tropismo fenotípico e genotípico de 150 pacientes. A concordância entre as metodologias variou de 63% a 85%, dependendo da ferramenta de interpretação utilizada.

Segundo Raymond et al. 2008, ambos os testes são comparáveis em determinar o tropismo, apresentando valores de sensibilidade e especificidade para detectar variantes CXCR4 de 65% e 94% quando utilizada a regra 11/25, 69% e 97% a ferramenta PSSM e 88% e 87% a ferramenta Geno2pheno *cutoff* 10%, respectivamente.

De acordo com Garrido et al. 2008, a concordância entre os testes foi de 91.4% para a ferramenta de predição PSSM e 88.6% para a ferramenta geno2pheno.

O estudo OSCAR (*Optimizing the Susceptibility to CCR5 Antagonists Response*) comparou a ferramenta geno2pheno utilizando a zona de corte de 5% e 10% com o teste fenotípico Trofile ESTA. Para tal, 303 pacientes foram avaliados e usando a zona de corte de 5% demonstrou concordância, especificidade e sensibilidade de, 80.5%, 96% e 49%, respectivamente, e a zona de corte de 10% encontrou 77,6%, 89% e 55% para discriminar vírus R5 de X4 (Svicher et al., 2010).

Similarmente, o grupo de De Luca demonstrou acurácia, especificidade e sensibilidade com o ESTA de respectivamente 71,4%, 79,2 e 54,5% para a zona de corte de 10% e 82,9%, 95,8% e 54,5% para a zona de corte de 5,75% (Prosperi et al., 2010).

O grupo de McGovern et al., (2010) realizou o primeiro trabalho em larga escala com o objetivo de avaliar ambas as metodologias (fenotípicas/genotípicas), assim como a eficácia clínica dos pacientes expostos ao antagonista de CCR5 após o laudo genotípico de tropismo (McGovern et al., 2010).

O trabalho foi feito através de uma re-análise das amostras do estudo MOTIVATE, descrito previamente. O tropismo fenotípico utilizado foi o Trofile original (OTA) e o tropismo genotípico foi realizado através da ferramenta de predição geno2pheno, com uso de zona de corte de 5%. O estudo demonstrou concordância de 90% entre ambas metodologias, com especificidade de 92,6% e sensibilidade de 67,4% para detectar vírus CXCR4 (McGovern et al., 2010).

Foi evidenciada baixa sensibilidade das ferramentas de interpretação genotípicas em detectar variantes minoritárias CXCR4 (Low et al., 2007). Sugere-se que este problema seja devido à sensibilidade do sequenciamento convencional em detectar populações virais minoritárias, como quando estas estão presentes em menos de 20% da população viral total (Schuurman et al., 1999).

Nesse sentido, foi sugerido que o sequenciamento convencional da região V3 do vírus seja realizado em triplicata, pois aumenta a probabilidade de detectar populações minoritárias X4 e conseqüentemente, a correta classificação do tropismo (Knapp et al., 2013).

Além do que para uma classificação mais fidedigna do tropismo, sugere-se a análise das sequências V3 em mais de uma ferramenta de predição genotípica (Chueca et al., 2009).

Os ensaios genotípicos emergiram como uma possibilidade para a realização do teste de tropismo, nas rotinas clínicas em diversos laboratórios do mundo. A fim de homogeneizar os procedimentos de análise de interpretação genotípica do tropismo foi elaborado um consenso europeu com diretrizes para o uso clínico do teste de tropismo do HIV (Vandekerckhove et al., 2011).

Basicamente, o consenso europeu recomenda a utilização da ferramenta geno2pheno para interpretação do tropismo genotípico. O ensaio de tropismo deve ser realizado em triplicata, obtendo de cada paciente três sequências da região V3, e nesse caso a zona de corte recomendada para a utilização da ferramenta deve ser 10%. No entanto, se o ensaio tiver sido realizado em uma única sequência, a zona de corte recomendada deve ser 20%. No caso de amostras provenientes de DNA proviral, é recomendada a utilização da mesma forma que a descrita previamente (Vandekerckhove et al., 2011).

Como citado previamente, diversos estudos demonstraram que ambas as metodologias de determinação do tropismo (fenotípico-genotípicas) são comparáveis. No entanto, a avaliação clínica dos pacientes após exposição ao antagonista de CCR5, devido a um laudo de tropismo genotípico, validaria de forma mais fidedigna o ensaio de genotropismo.

Tendo em vista que poucos estudos foram realizados com esse propósito, e devido à necessidade de se avaliar o teste de tropismo realizado no Laboratório de Retrovírus do IAL e sua utilização na elaboração de esquemas terapêuticos em pacientes atendidos pela Rede Pública de Saúde foi conduzido o presente estudo.

2. OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

- Avaliar a predição genotípica do tropismo viral em pacientes vivendo com HIV/aids.

2.2 Objetivos específicos

- Comparar a determinação do tropismo do HIV, realizado através da predição genotípica da região do envelope viral com o ensaio fenotípico Trofile.
- Comparar o desfecho terapêutico de pacientes testados quanto ao tropismo viral em uso ou não de antagonistas de CCR5.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 População do estudo

O laboratório de retrovírus do Instituto Adolfo Lutz disponibiliza o teste de predição genotípica do tropismo viral desde o ano de 2008. Todas as amostras de pacientes que foram enviadas ao nosso laboratório com solicitação para o teste de tropismo, com indicação de falha terapêutica ou com sugestão de troca de medicamento por efeitos adversos, de março/2008 até agosto/2012 foram incluídas no estudo. Todos os pacientes assinaram o termo de consentimento livre esclarecido (TCLE).

As informações de dados demográficos dos pacientes e exames laboratoriais de contagem de células CD4+ e carga viral, além de histórico de exposição aos antirretrovirais, foram obtidas através da ficha clínica de cada paciente, preenchida pelo médico no momento do envio da amostra para o nosso laboratório, ou através do Sisgeno/Siscel. O Sisgeno (Sistema de Controle de Exames de Genotipagem), que é uma plataforma do Ministério da Saúde onde os pacientes em tratamento são cadastrados e os exames laboratoriais de CD4 e de carga viral são anotados.

No primeiro momento do estudo avaliamos a predição do tropismo realizado pelo laboratório de retrovírus, e em seguida o desfecho terapêutico dos pacientes após o envio do laudo de tropismo, como demonstrado na figura x.

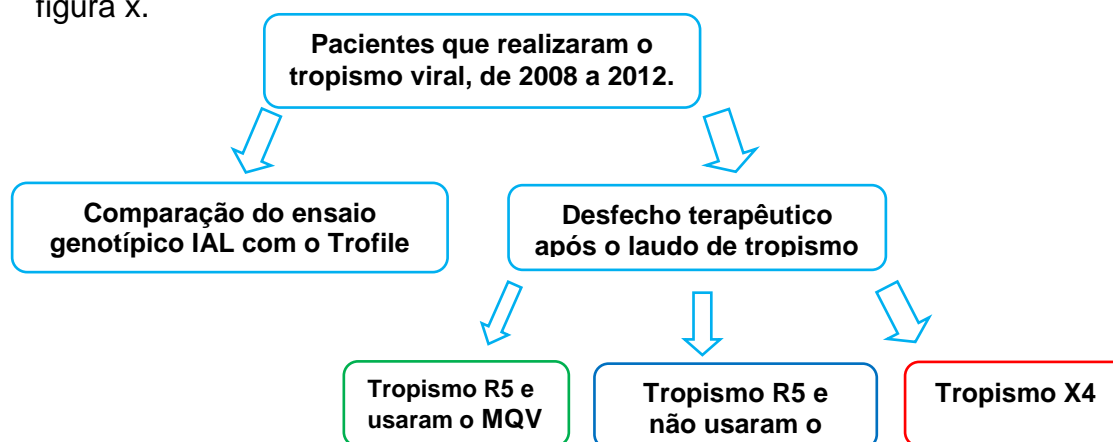


FIGURA 11: Representação esquemática do estudo.

3.2 Coletas do Material Biológico

Foram coletados dois tubos de sangue total de cada paciente com EDTA (ácido etileno diamino tetra-acético) e encaminhados para o laboratório de retrovírus do Instituto Adolfo Lutz (IAL), em no máximo 6 horas após a coleta. O material biológico foi centrifugado por 20 minutos a 2000 rpm para separação do plasma, do anel leucocitário contendo células mononucleares (PBMC) e dos eritrócitos do sangue periférico. Foram separadas alíquotas de 500ul do plasma e do PBMC em tubo *ependorf* e armazenadas em temperatura de -70°C até a realização dos procedimentos laboratoriais.

3.3 Extração do RNA

A extração do RNA viral foi realizada a partir de 140 µl do plasma utilizando o QIAmp Viral RNA Mini Kit (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante. O material extraído foi armazenado a -70°C até a realização dos procedimentos laboratoriais.

3.4 Quantificação da carga viral e contagem de células T CD4

A quantificação da carga viral (CV) foi realizada a partir do método bDNA (Versant 3,0 Siemens, Erlanged, Alemanha). A contagem de células CD4 foi realizada por citometria de fluxo (FACS Calibur, BD, San José, CA, EUA).

3.5 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) da região do envelope e polimerase do HIV

A amplificação parcial do gene envelope (região V3) e da polimerase (protease e transcriptase reversa) do HIV, a partir do RNA extraído, foram realizadas em duas etapas (One-step RT-PCR). A primeira etapa da reação

consiste de retrotranscrição e amplificação (RT-PCR) e a segunda etapa de amplificação (nested PCR).

A partir de 2010, para a amplificação do gene envelope, realizamos a reação em triplicata, ou seja, em cada amostra foi realizada uma única extração e as reações de amplificação foram realizadas individualmente. Sendo assim, utilizamos 2,5µl do RNA extraído para a RT-PCR com volume final de 25µl para cada reação. A tabela X apresenta o protocolo de reação utilizado.

Tabela 2: Descrição dos protocolos de reações utilizados para amplificação da região V3 do envelope viral.

V3 - envelope			
PCR		nested-PCR	
Reagentes	1x / µl	Reagentes	1x / µl
H2O	15,775	Go Taq Green	15
10x PCR Buffer High Fidelity	2,5	Primer SQV3F2 10µM	1
50 mM MgSO4	1	Primer CD4R 10µM	1
10mM dNTP	0,5	Nuclease free water	5,5
0,1 mM DTT	1,25	Amostra	2,5
Inbidor Rnase (Biolabs) 40U/µl	0,25		
RT Superscript III 200 U/µl	0,1		
Taq Platinum <i>High Fidelity</i> (5U/µl)	0,125		
Primer (10 pm/µl) SQV3F1 (F)	0,5		
Primer: (10 pm/µl) CO602 (R)	0,5		
Amostra RNA extraído	2,5		
Condições de ciclagem			
	50°C - 30 min		94° C - 2 min
	94°C - ' 2 min	35 ciclos	{ 94° C - 30 seg 55° - 30 seg 72° - 1:30 min 72° - 10 min
	94°C - 15 seg		
35 ciclos	55°C - 30 seg		
	68°C 1:30min		
	68°C - 10 min		
Primers	Sequência (5' - 3')	Posição em relação HXB2	
SQV3F1	GAG CCA ATT CCC ATA CAT TAT TGT (F)	6858-6878	
CO602	TAA GTC TCT CAA GCG GTG GTA GCT GAA (R)	8520-8543	
SQV3F2	TGT GCC CCA GCT GGT TTT GCG AT (F)	6879-6898	
CD4R	GGA TCT GTC TCT GTC TCT CTC TCC A (R)	8435-8456	

Para todas as amostras, quando disponível o material, foram amplificados os genes da polimerase, constituídos pela protease (PT) e transcriptase reversa (TR), a fim de analisarmos a potência do esquema de tratamento de resgate prescrito e utilizado pelos pacientes após o envio do laudo de tropismo. Os genes da PT e RT foram amplificados utilizando o TRUGENE® HIV-1 Genotyping Assayq/OpenGene® DNA System (Siemens Healthcare Diagnostics, Tarrytown, NY) ou por metodologia *in house* de One Step RT-PCR descrita a seguir. A amplificação dos genes da protease e transcriptase reversa foram realizadas em único fragmento, como demonstrado na tabela abaixo.

Tabela 3: Descrição dos protocolos de reações utilizados para amplificação da região da polimerase do HIV.

Polimerase – PR/RT			
PCR		nested-PCR	
Reagentes	1x / µl	Reagentes	1x / µl
H2O	25,25	Go Taq Green	15
10x PCR Buffer High Fidelity	5	Primer Z216710pM	1
50 mM MgSO4	2	Primer F2 10pM	1
10mM dNTP	1,5	Nuclease free water	5,5
0,1 mM DTT	2,5	Amostra	2,5
Inbidor Rnase (Biolabs) 40U/µl	0,25		
RT Superscript III 200 U/µl	0,25		
Taq Platinum <i>High Fidelity</i> (5U/µl)	0,25		
Primer (10 pm/µl) Z2167 (F)	1,5		
Primer: (10 pm/µl) Z3429 (R)	1,5		
Amostra RNA extraído	10		
Condições de ciclagem			
	50°C - 30 min		94° C - 2 min
	94°C - 2 min		94° C - 30 seg
	94°C - 15 seg	35 ciclos	55° - 30 seg
	55°C - 30 seg		72° - 1:30 min
	68°C-1:30min		72° - 10 min
	68°C - 10 min		
	35 ciclos		
Primers	Sequência (5' - 3')	Posição em relação HXB2	
Z2167	CCAGAAGAGAGCTTCAGGT (F)	2164-2182	
Z3429	GTGCTTTGGTTCCTCTAAGG (R)	3395-3414	
F2	GTATGTCATTGACAGTCCAGC (R)	3321-3301	

Os produtos do *Nested* PCR do gene parcial do envelope e polimerase foram quantificados por gel de agarose a 1,3% e 1%, respectivamente, em tampão TBE (Tris/Borato/EDTA) 0,5X corado com Sybr Safe® (Life Technologie, USA) utilizando *Low DNA Mass Ladder* (Life Technologie, USA) como marcador.

3.5.1 Sequenciamento dos produtos amplificados das regiões do envelope, protease e transcriptase reversa do HIV

Os produtos amplificados por metodologia *in house* das regiões V3 do envelope, protease e transcriptase reversa viral foram sequenciados através do *Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction* – ABI Prism® (Life Technologies, USA). Para cada região amplificada foram utilizados quatro *primers* com volume final de 10µl por reação. Os *primers* utilizados e o protocolo da reação de sequenciamento estão apresentados respectivamente, na tabela x e x. As condições de ciclagem utilizadas foram 25 ciclos de 96°C por 10 segundos, 50°C por 5 segundos e 60°C por 4 minutos.

Tabela 4: *Primers* empregados nas reações de sequenciamento das regiões V3 do envelope viral e da polimerase do HIV.

Primers	Sequência (5' - 3')	Posição em relação HXB2	Descrição
V3O2F	AAT GTC AGY ACA GTA CAA TGT ACA C (F)	6948-6969	Sequenciamento – V3 env
ED33	CCTCAGCCATTACACAGGCCTGTCCAAAG (F)	6817-6845	Sequenciamento – V3 env
SQV3R1	GAA AAA TTC CCT TCC ACA ATT AAA (R)	7350-7370	Sequenciamento – V3 env
ES7	CTGTTAAATGGCAGTCTAGC (F)	7002-7021	Sequenciamento – V3 env
DP10	TTTCCCCTACTA ACTTCTGTATGTCATTGACA	2198-2223	Sequenciamento - PT
DP11	CCATTCCTGGCTTTAATTTTACTGGTA (R)	2598-2572	Sequenciamento - PT
DP16	CCTCAAATCACTCTTTGGCAAC (F)	2253-2274	Sequenciamento - PT
DP17	AAAATTTAAAGTGCAGCCAAT (R)	2549-2529	Sequenciamento - PT
F1	GTTGACTCAGATTGGTTGCAC (F)	2519-2539	Sequenciamento - RT
F2	GTATGTCATTGACAGTCCAGC (R)	3321-3301	Sequenciamento - RT
F3	TATCAGGATGGAGTTCATAAC (R)	3241-3261	Sequenciamento - RT
F4	GGATGGCCCAAAGTTAAAC (F)	25972616	Sequenciamento - RT

Posição em relação HXB2: Número de acesso em GenBank K03455.

Tabela 5: Reagentes empregados na reação de sequenciamento das regiões: V3 do envelope viral, protease e transcriptase reversa do HIV.

Mix para o sequenciamento	Regiões sequenciadas do HIV		
	V3 do envelope	Protease	Trasncriptase Reversa
Kit Big Dye™ Terminator (Applied Biosystems)	0,5µl	0,5µl	0,5µl
2,5x Buffer Sequencing (Applied Biosystems)	4µl	4µl	4µl
H2O DNase e RNase free	-	2,4µl	2,4µl
Primers	4µl	1,6µl	1,6µl
Produto amplificado (nanograma)	1,5µl (3-10ng)	1,5µl (10-20ng)	1,5µl (10-20ng)

Os produtos das reações de sequenciamento dos genes do envelope, da protease e da transcriptase reversa foram purificados e precipitados utilizando etanol e acetado de sódio de acordo com o protocolo recomendado pela Life Technologies. Após a etapa de precipitação adicionou-se 10µL de Formamida HiDi (Life Technologies, USA) para cada amostra, em seguida foram desnaturadas em termociclador a 95°C por 3 minutos e imediatamente resfriadas em gelo para serem sequenciadas em analisador automático ABI 3130XL Genetic Analyzer (Life Technologies, USA).

3.6 Predição genotípica do tropismo viral

Os dados dos cromatogramas foram analisados utilizando o *software Sequencher* 4.6. As sequências foram editadas manualmente e um consenso foi gerado com base em duas ou mais sequências de nucleotídeos, incluindo nucleotídeos ambíguos (misturas). Os eletroferogramas foram reavaliados, quando necessários, através do *Sequencher* e descartados em casos onde foram encontrados problemas de qualidade, como picos sobrepostos por toda a sequência consenso, impossibilitando a correta interpretação dos nucleotídeos.

As sequências foram analisadas pelas ferramentas REGA e NCBI para obtenção dos subtipos e alinhamento da sequência obtida com a sequência do HXB2 (REGA.<http://bioafrica.mrc.ac.za:8080/rega-genotype-3.0.2/hiv/typingtool> \ NCBI.<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genotyping/formpage.cgi>). Após a avaliação da sequência, foi possível determinar o início da região codificante da alça V3 do gene envelope.

Com base na sequência V3, o laudo de tropismo desde o ano de 2008 foi feito através da análise de diversas ferramentas de predição genotípica. Por não existir até então, um algoritmo de predição aceito pela comunidade científica, que descrevesse a melhor e mais correta forma de uso de uma ferramenta de predição, ficou decidido avaliar e comparar os resultados da submissão da mesma sequência em diversas ferramentas de bioinformática, para um respaldo maior na elaboração do laudo de tropismo.

A forma mais básica de análise foi feita através da regra 11/25 em que a presença de aminoácidos básicos (Arginina - R, Histidina – H, ou Lisina – K) nas posições 11 e/ou 25 na composição de aminoácidos da alça V3 são indicativos de vírus X4.

Em seguida, a sequência foi submetida ao site de predição *WebPSSM – Position Specific Scoring Matrix* (uma ferramenta bioinformática que utiliza uma matriz para analisar os aminoácidos da região V3) e prediz o uso do correceptor CXCR4/CCR5. Além disso, foram analisados os resultados das predições elaborados pela ferramenta de bioinformática *Geno2pheno correceptor (g2p)* URL: <http://correceptor.bioinf.mpi-sb.mpg.de/cgi-bin/correceptor.pl>, através da submissão das sequências V3 em formato FASTA. Para cada sequência analisada pelo site foi obtido um valor de FPR (*false positive rate*), que indica a probabilidade de classificar um vírus R5 falsamente como X4. Esta ferramenta pode gerar dois laudos: clonal (baseado na sequência genética) e clínico (leva em conta também, valores de CD4 e carga viral disponíveis do paciente). A maior dificuldade no uso desta ferramenta é a escolha de um ponto de corte mais adequado de FPR para a predição correta do tropismo.

Os laudos de tropismo foram elaborados através da análise dos resultados obtidos das diversas ferramentas de predição genotípica utilizadas. A figuraX abaixo exemplifica as ferramentas de bioinformática avaliadas para elaboração do laudo.

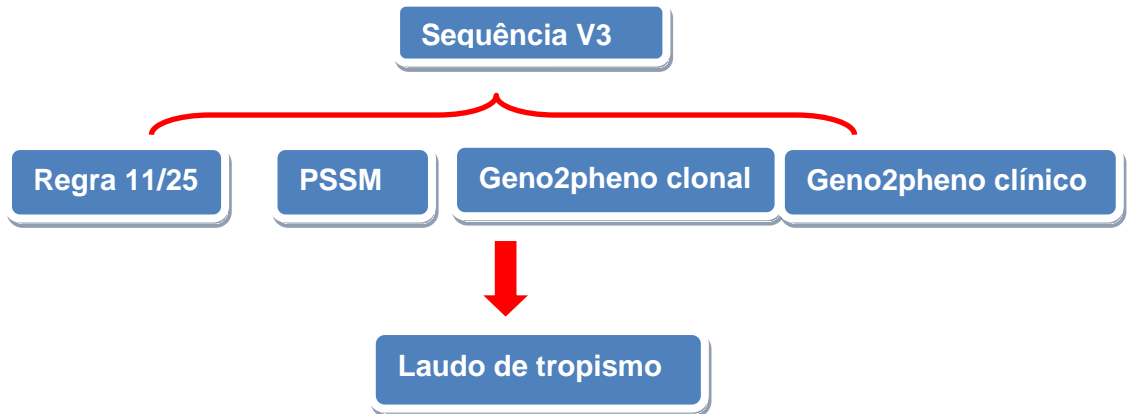


Figura 12: Ferramentas de análise de predição utilizadas para a predição do laudo de tropismo de HIV pelo laboratório de retrovírus do IAL (critério IAL).

3.6.1 Predição do tropismo genotípico realizado no laboratório do IAL para comparação com o Trofile

Em um subgrupo de amostras foi enviado simultaneamente um tubo de sangue total coletado com EDTA para o laboratório de Retrovírus do IAL e para o laboratório dos EUA para ser realizado o tropismo fenotípico (Trofile).

A predição do tropismo genotípico foi realizada como citado previamente. Exceto pela ferramenta geno2pheno(correceptor) que foi avaliada de 3 formas: uma clonal e 2 clínicas, que considera o valor de CD4 da amostra no momento da coleta e outra através do Nadir (CD4 mais baixo da vida do paciente) que é o preconizado pelo site.

3.7 Avaliação de desfecho terapêutico

A avaliação do desfecho terapêutico dos pacientes, com relação à conduta médica após o envio do laudo de tropismo foi realizada pela consulta dos prontuários de cada paciente e pelo preenchimento dos dados pelo próprio médico. Os ARVs utilizados no tratamento de resgate foram anotados.

Em seguida, foi observada a resposta virológica dos pacientes ao novo esquema, e naqueles que obtiveram sucesso virológico foi avaliada a resposta imunológica. Para tanto, os valores de carga viral e de células CD4+ foram acompanhados e o tempo de tratamento variou entre os pacientes, devido à data de entrada de cada amostra no laboratório e a coleta do desfecho terapêutico.

O acompanhamento dos exames de carga viral e CD4 dos pacientes foram realizados através da consulta do Sisgeno/Siscel. Portanto, quando disponíveis as informações de carga viral e CD4, foi possível correlacionar os mesmos com o tempo de tratamento de resgate dos pacientes.

Para as amostras dos pacientes que entraram no laboratório em 2008/2009/2010, as informações de desfecho terapêutico foram obtidas em 2010 e para as amostras de 2010/2011/2012 foram obtidas em 2012 e 2013.

Para critério de análise, a população do estudo foi dividida em três grupos, conforme o laudo de tropismo enviado e a utilização do maraviroque. Sendo considerado grupo 1, os pacientes que receberam o laudo de correceptor CCR5 e usaram o maraviroque (R5_{MQV}); grupo 2, os pacientes que também receberam laudo de CCR5 e não usaram o maraviroque (R5_{semMQV}) e grupo 3, os pacientes que receberam laudo de correceptor CXCR4 (X4).

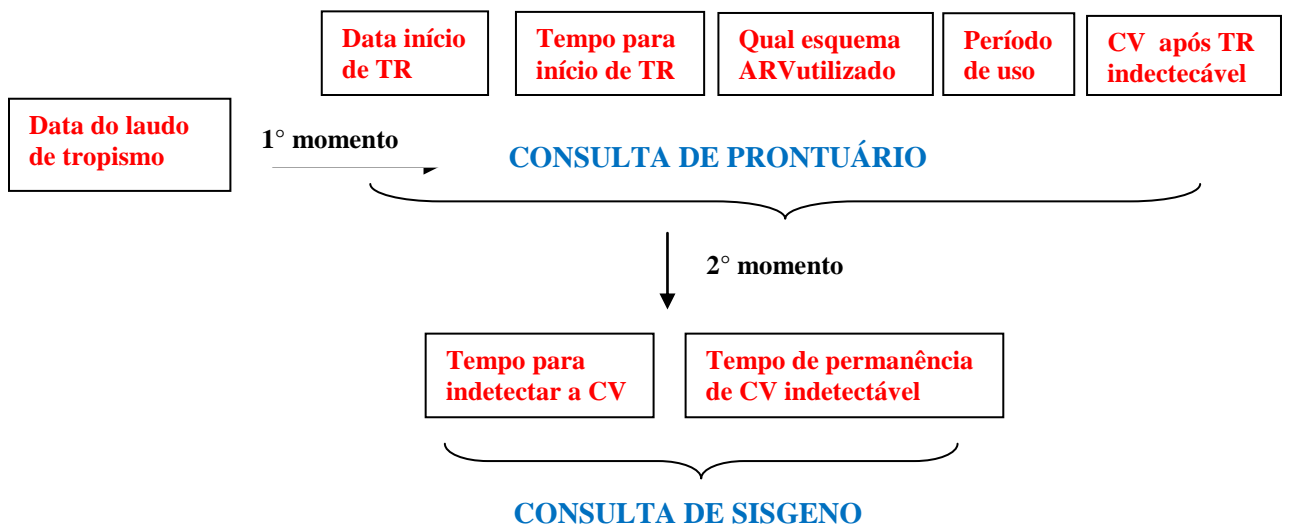
3.7.1 Análise da resposta virológica dos pacientes após início do tratamento de resgate

A análise da resposta virológica se baseou na observação da carga viral dos pacientes que iniciaram tratamento de resgate após envio do laudo

de tropismo. Foi considerada boa resposta virológica o paciente que apresentou carga viral plasmática indetectável após início de terapia de resgate (TR), e destes foi avaliado através do Sisgeno a permanência do sucesso virológico.

Portanto, foram calculados quando disponíveis as informações de carga viral, o tempo que o paciente permaneceu com carga viral indetectável. No entanto, para os pacientes que apresentaram alguma carga viral detectável ao longo do acompanhamento foi considerada esta data para o cálculo de permanência de sucesso virológico.

A partir da consulta do Sisgeno/Siscel ou análise dos prontuários, os tempos em meses que cada paciente demorou a iniciar o tratamento de resgate após a emissão do laudo de tropismo, e o tempo que os mesmos levaram para resultar em carga viral indetectável após início de TR foram calculados. O fluxograma abaixo apresenta como foram obtidos os dados de desfecho terapêutico.



As informações de tempo foram calculadas em meses

Figura 13: Fluxograma de dados para avaliação de desfecho terapêutico.

3.8 Análise da resposta imunológica dos pacientes após início de tratamento de resgate

A análise de resposta imunológica foi realizada apenas nos pacientes com sucesso virológico após início de TR. O aumento de células T CD4+ durante o acompanhamento foi observado em dois momentos, primeiramente foi considerado a primeira contagem após a 12ª semana em TR, e a última contagem que obtivemos do paciente na plataforma Sisgeno/Sicel. Outro aspecto avaliado foram os pacientes que após o sucesso virológico conseguiram aumentar mais de 100 células CD4/mm³, desde o início de TR até o final do acompanhamento em plataforma Sisgeno/Sicel.

3.9 Pontuação de drogas ativas do esquema terapêutico de resgate - *Genotypic Score Susceptibility (GSS)*

A potência do esquema de tratamento foi realizada de acordo com o sistema de interpretação do algoritmo *HIV Drug Resistance Database* <http://sierra2.stanford.edu/sierra/servlet/JSierra> através da submissão das sequências de nucleotídeos dos genes da transcriptase reversa e protease do HIV. O site origina informações de susceptibilidade e resistência para cada ARV disponível. A pontuação do esquema terapêutico de resgate de cada paciente foi calculada de acordo com os cinco níveis possíveis de susceptibilidade e resistência sugeridos pelo site. A contabilização foi realizada da seguinte forma: 1 ponto se o ARV apresentou susceptibilidade; 0,75 *potencial low level* de resistência; 0,5 *low level* de resistência; 0,25 *intermediate level* de resistência e 0 *high level* de resistência, obtendo no final um resumo da pontuação do esquema terapêutico utilizado pelos pacientes.

3.9.1 Análise Estatística

Os dados demográficos, clínicos, laboratoriais e moleculares dos pacientes incluídos neste estudo foram plotados em banco de dados Epiinfo6 (CDC).

As análises estatísticas foram realizadas utilizando os programas EpiInfo 6 (CCD) e GraphPad software, assumindo um valor de significância $p < 0.05$. Variáveis contínuas foram realizadas por Testes t (Mann Whitney) e para análise entre mais de dois grupos foram feitas utilizando ANOVA e o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn's Multiple Comparison. Os resultados foram expressos em medianas e percentis 25th e 75th (IQR).

4. Resultados

4.1 População de estudo

No período do estudo foram realizados testes de predição genotípica do tropismo do HIV-1 para 157 pacientes em falha virológica ao tratamento antirretroviral. Destes, 57% (89/157) foram classificadas como CCR5 para o teste de correceptor viral e 43% (68/157) como CXCR4. Do total de pacientes testados, em 73 foi possível também avaliar o desfecho terapêutico. Desses, 41 (56%) pacientes foram classificados como tropismo viral CCR5 e 32 (44%) como CXCR4. Em 25 pacientes, foi possível realizar o teste de tropismo fenotípico (Trofile). A tabela abaixo apresenta os dados demográficos e clínicos da população que realizou o exame de tropismo, e também daquelas que foram avaliados quanto ao desfecho terapêutico.

Tabela 6: Dados demográficos e clínicos dos pacientes envolvidos no estudo.

	Total de testes feitos no laboratório (n=157)	Análise Desfecho Terapêutico (n=73)	Laudo CCR5 (n=41)	Laudo CXCR4 (n=32)
Idade (anos)	44	44	44	45
Sexo masculino (%)	72	71	74	66
CD4 (célis/mm ³)	263	289	287	297
Nadir CD4 (célis/mm ³)	88	82	101	41
Carga viral (log ₁₀)	3,9	3,7	3,7	3,7
Número de tratamento	9	9	9	9

4.2 Comparação do ensaio genotípico do IAL com o ensaio fenotípico Trofile

Durante o período do estudo, 25 pacientes foram incluídos para esta subanálise. O resultado dos testes de ambas as metodologias foram semelhantes, exceto uma amostra não pode ser realizado o teste de Trofile. De acordo com teste fenotípico, o tropismo X4 foi classificado em 68% dos pacientes e para o genotípico em 64%. Ambos os grupos apresentavam

dados demográficos semelhantes, exceto o grupo X4 apresentou uma população mais jovem, como apresentado na tabela 07.

Tabela 7: Dados demográficos e clínicos dos pacientes com resultado pareado de Trofile ESTA e genotropismo.

Trofile	R5	D/M/X4	Total	p
Idade (anos)	45 (41-48)	18 (13-40)	39 (15-45)	0,002
Gênero (% masculino)	0,86	0,76	0,76	1,00
Células CD4 na coleta (cél/mm³)	226 (95-277)	184 (94-372)	218 (94-327)	0,387
Células CD4 nadir (cél/mm³)	37 (17-79)	35 (27-97)	36 (23-108)	0,673
Viremia na coleta (Log10/mL)	3.43 (2.53-4.19)	4.47 (3.59-4.92)	4 (2.98-4.76)	0,257
Número de regimes	8 (7-9)	6 (5-9)	8 (5-9)	0,773
Tempo de ARV (anos)	15 (13-16)	16 (4-17)	16 (13-17)	0,119
N (%)	7 (28%)	17 (68%)	25** (100%)	

A avaliação do tropismo pela ferramenta geno2pheno(coreceptor) opção clonal, clínica através do CD4 da coleta e outra utilizando o NADIR demonstrou que a maioria dos pacientes obteve sequências com valores de taxa de falso positivo (FPR) abaixo de 20% em 15/25 (60%), 14/24 (58%) e 13/17 (77%), respectivamente. Devido à falta de informação do valor de CD4 da coleta e Nadir a análise não foi realizada em um paciente 1/25 (4%) e em 8/25 (32%), respectivamente.

O tropismo viral realizado através da análise da regra 11/25 e do PSSM classificaria como CXCR4, 10/25 (40%) e 9/22 (41%) dos pacientes, respectivamente. Em três pacientes (12%) que apresentavam mais de 3 misturas não sinônimas na sequência V3 a análise através do PSSM não pode ser realizada. A tabela 08 descreve detalhadamente cada amostra avaliada individualmente, de acordo com os diferentes algoritmos de predição.

Tabela 8: Resultados de determinação do tropismo, de acordo com os diferentes algoritmos de predição, avaliados individualmente.

Amostras	Trofile	IAL Critério	G2F clonal FPR (%)	G2F clínico cFPR (%)	G2F clínico nFPR (%)	Regra 11/25	PSSM	Net Carga	Sequencia V3
1	R5	R5	44.8	49.1	23.2	R5	R5	5	CTRPNNNTRKSIHMGWGrafyATGDIIGDIRQAHC
2	D/M	R5	48.4	12.6	12.6	R5	R5	6	CVRPNNNTRKSIHMGWGrafyATGEIIGNIRQAHC
3	R5	R5	22.3	26.3	8.2	R5	R5	(5-4)	CTRPNNNTRKGIHMG[MV]GrafyATGEIIGEIRQA[HY]C
4	D/M	X4	4.8	48.4	19	X4	X4	5	CTRPNNNTRKSIPVGSGRILYATGKLIGDIRQAYC
5	not reportable	R5	42.8	62.6	38.2	R5	R5	8	CTRPNNNTRRGIHMGPgkafyATGNIIGNIRKAHC
6	D/M	X4	0.5	0.2	0.1	X4	X4	6	CTRPNNNTIRGIRIGPGravLATERIIGDIRRAHC
7	R5	R5	20.2	19.0	4.9	R5	R5	6	CTRPNNNTRKSVHIGPGsalyTTNIIGNIRRAHC
8	D/M	X4	3.2	11.9	6.8	R5	-	-	CTRP[x]N[x]TRKSIH[x]G[x]Graf[x][x][x]G[x]VIG[x][x][x]QAHC
9	R5	R5	93.6	13.4	-	R5	R5	4	CTRLNNNTRRSIQMGWGrafyATGDIIGDIRLAHC
10	D/M	X4	7.8	71	-	R5	-	-	CARPNNNTRK[S]I[QH]MGW[RG]rafyATGDI[IV]GDIRQAHC
11	D/M	X4	14.6	14.8	-	R5	R5	4	CERPSNNTRKGIHLGPGraFFATEAIIGDIRQAHC
12	R5	R5	84.9	37.4	15.7	R5	R5	6	CTRPNNNTRKGIHMGWGRTLYATGAIIGDIRQAHC
13	D/M	X4	11.4	39.9	11.4	R5	R5	7	CTRPNNNTRKSIHMGAGrafyTNGQIIGNIRQAHC
14	R5	R5	7.9	85.7	76.4	R5	R5	5	CTRPGNNTRKGIHIGPGRGafyATDITGDIRQAHC
15	X4	X4	20.8	1.8	1.5	R5	X4	8	CTRPDYAHKSINMLWGRRFhatGALKGNIKHL
16	R5	R5	57	51.4	8.8	R5	R5	5	CTRPSNNTRRSIHMAAGrALYTTDIIGDIRQAHC
17	D/M	X4	2.5	13	13	X4	X4	8	CTRLNNLTRRSIRIGPGGAWYAAGRIVGKIRPAHC
18	X4	X4	0.7	0.1	-	X4	X4	6	CTRPNNNTRKRVTMGpgrVWYTTGEIVGDIKRAHC
19	X4	X4	21.5	1.8	-	X4	-	-	CTRPNNNTRKS[x]HLGW[x]RT[x][x][x]T[x][x]IIGDI[x][x]A[x]C
20	X4	X4	15.6	15	-	R5	R5	4	CTRPNNNTRRSITIGPGrAFYGTDIIGDIRQAHC
21	X4	X4	1.8	17	-	X4	X4	9	CTRPNNNTRKSIHIGLGHAFR[TA]TEKIIGNIRKAHC
22	X4	X4	0	-	-	X4	X4	8	CTRPGNKTGKRIRIGHIGPGRTFYtTEKIRDIRQAHC
23	D/M	X4	18.3	23.2	23.2	X4	R5	(7-5)	CTRPNNNTRKGIHIGPGRsfyATG[KE]IIGDIRQAHC
24	D/M	X4	1.7	0.4	0	X4	X4	6	CSRPNNNTRKGISIGPGrAVYATEKIIGNIRQAHC
25	D/M	X4	0.1	0	0.4	X4	X4	7	CTRPHNNTRKRLYSSRWRTLYATE[IV]I[GV]GDIRQAHC

A comparação dos resultados de tropismo (Trofile e genotropismo), tendo o Trofile como referência, demonstrou que a concordância geral das ferramentas de predição avaliadas variou de 50% (Geno2pheno10clinicalNadir) para 95,8 % (critério IAL).

A sensibilidade e especificidade para a detecção de X4 variou de acordo com a ferramenta genotípica utilizada, sendo a menor sensibilidade de 37,5% quando foi utilizado o Geno2pheno10clinicalCollection. Entretanto, a especificidade foi adequada para a maioria dos algoritmos incluindo a regra 11/25, Motivate, Geno2pheno10clinicalcollection, PSSM e critério IAL. A tabela 09 mostra o grau de concordância, sensibilidade e especificidade dos diversos algoritmos de predição, tendo como referencia o Trofile (ESTA) (Cabral et al., 2012-anexo1).

Tabela 9: Resultados de grau de concordância, sensibilidade e especificidade dos diversos algoritmos de predição, de acordo com o Trofile ESTA

Algoritmos Genotípicos	Concordância (%)	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)
Regra 11/25	70,8	59	100
Geno2pheno_{Motivate}	66,7	53	100
Geno2pheno_{20clonal}	79,2	76	85,7
Geno2pheno_{20clínicoC}	73,9	75	71,4
Geno2pheno_{20clínicoN}	68,8	90	33,3
Geno2pheno_{10clonal}	66,7	58,8	85,7
Geno2pheno_{10clínicoC}	69,6	37,5	100
Geno2pheno_{10clínicoN}	50,0	50	50
PSSM	76,2	64	100
IAL critério	95,8	94	100

4.3 Análise de desfecho terapêutico

A população dos três grupos avaliados (R5MQV, R5semMQV e X4) apresentaram características demográficas semelhantes, exceto o grupo R5MQV apresentou o menor valor de Nadir de CD4, como apresentado na tabela 10.

Tabela 10: Dados demográficos e clínicos dos pacientes avaliados quanto ao desfecho terapêutico no momento do envio do laudo ao médico (“baseline”).

	Total (n=73)	R5 _{comMQV} (n=16)	R5 _{semMQV} (n=25)	CXCR4 (n=32)	p
Idade (anos)	44	44	43	45	0,576
Sexo masculino (%)	70	88	65	66	0,218
CD4 atual (cél/mm ³)	289	237	321	297	0,621
Nadir CD4 (cél/mm ³)	76	46	126	54	0,003
Carga viral atual (log ₁₀)	3,7	3,5	4,1	3,7	0,210
Número de tratamento	9	8	6	7	0,097
tempo de tratamento (anos)	12	12	12	12	0,678

Os resultados estão expressos em mediana e teste estatístico de Kruskal Wallis.

As análises de aspectos virológicos e imunológicos foram abordadas separadamente para cada grupo estudado.

4.3.1 Parâmetros virológicos dos pacientes do grupo R5_{comMQV} (n=16).

A análise dos dados revelou que todos os pacientes dentro deste grupo trocaram o esquema terapêutico após o envio do laudo de tropismo, com mediana de 4 meses para início de tratamento de resgate (TR). Para finalidade de melhor compreensão os pacientes deste grupo estão listados individualmente, na tabela 13. As informações de tratamento durante o *baseline* e resgate demonstraram que independente do período avaliado os pacientes utilizaram o 3TC associado ao TDF, e um ARV da classe dos IPs, sendo no *baseline* o DRV e o LPV os ARVs mais escolhidos pelos médicos para composição do esquema, e isto se alterou no tratamento de resgate,

pois todos os pacientes passaram a utilizar o DRV ($p < 0,0002$). Outro fator importante observado foi a utilização de medicamentos de novas classes, onde 81% dos pacientes fizeram uso do T20 em algum momento do tratamento, porém somente um paciente permaneceu em uso deste medicamento durante o TR. O RAL foi mais utilizado neste segundo momento, sendo usado por 69% (11/16) dos pacientes. A tabela 11 apresenta as informações resumidas de tratamento no *baseline* e resgate dos pacientes.

Tabela 11: Informações de uso de ARVs, de acordo, com a classe de medicamento, nos diferentes períodos de tratamento avaliados nos pacientes do grupo R5comMQV.

Classe de medicamentos antirretrovirais (ARV)	Informações de uso de ARVs no período avaliado	
	Baseline Pacientes - 15/16 (94%)	Terapia de Resgate Pacientes - 16/16 (100%)
ITRN (%)	100	100
ARV mais utilizado (%)	3TC/TDF - 14/15 (93)	3TC/TDF - 15/16 (94)
ITRNN (%)	2/15 (13)	1/16 (6)
ARV mais utilizado (%)	EFV - 2/2 (100)	ETV - 1/1 (100)
IP (%)	14/15 (93)	15/16 (94)
ARV mais utilizado (%)	LPV - 5/14 (36)	
ARV mais utilizado (%)	DRV - 5/14 (36)	DRV - 15/15 (100) p=0.0002
Novas classes (%)	13/15 (87)	** 16/16 (100) p=0.2
ARV mais utilizado (%)	* T20 - 9/13 (69)	T20 - 1/16 (6) p=0.0009
ARV mais utilizado (%)	* RAL - 5/13 (33)	RAL - 11/16 (69)

* Todos utilizaram o MQV associado

** Em 4 pacientes o MQV foi utilizado sem acompanhamento de T20 ou RAL

Com relação ao uso do T20 vale notar que neste grupo, quatro pacientes (nº 6,7,9 e 11 referente à tabela 13) substituíram unicamente do tratamento o medicamento T20 pelo maraviroque do esquema terapêutico. Os pacientes 6 e 9 fizeram uso do T20 como parte do esquema de tratamento de resgate por um curto período de tempo, enquanto aguardavam o laudo de tropismo e após o envio de laudo R5 a substituição pelo maraviroque foi indicada. Entretanto, os pacientes 7 e 11 utilizaram o T20 por um período maior de respectivamente, 1 e 3 anos. No entanto, após este período os pacientes não suportavam mais o uso de T20 e o

maraviroque foi utilizado. Sendo que, o paciente 11 apresentava viremia plasmática indetectável no momento da entrada da amostra no laboratório.

A avaliação de drogas ativas (GSS) neste grupo foi realizada em 94% dos pacientes (15/16). Foram usadas duas formas; a primeira considerou o maraviroque como medicamento totalmente ativo, e a segunda o mesmo não foi incluído na contagem, e a mediana obtida foi de respectivamente, 2,75 e 1,75.

Estratificando a nota do GSS observou-se que 67% dos pacientes se encontravam na escala de 1,25–2,0 (sem contabilizar um ponto do MQV). A tabela abaixo mostra a nota de GSS estratificado por quatro faixas e relaciona com a obtenção de sucesso virológico.

Tabela 12: Pontuação do GSS do esquema “background” dos pacientes R5comMQV. As notas foram estratificadas em 4 escalas, e a porcentagem de sucesso virológico após uso de terapia de resgate.

Drogas ativas (GSS) 94% pacientes (15/16) - Mediana - 1,75 (sem MQV)		
Estratificação da nota do GSS	Pacientes (%)	carga viral indetectável após TR (%)
0 - 1,0	1/15 (7)	1/1 (100)
1,25 - 2,0	10/15 (67)	10/10 (100)
2,25 - 3,0	4/15 (27)	* 3/4 (75)
3,25 - 4	0/15 (0)	n.a.

* 1 paciente com a carga viral detectável

A análise de resposta virológica do esquema terapêutico de resgate proposto revelou que 94% (15/16) dos pacientes apresentavam a carga viral indetectável, com mediana de tempo de tratamento de 3 meses após o início do uso. Exceto um paciente, foi verificado que o esquema utilizado não foi eficaz no controle da viremia, a carga viral nas semanas 11 e 18 após o início com novo esquema, apresentava respectivamente, 4,4 e 4,5 log₁₀. O esquema utilizado por esse paciente foi 3TC/TDF/DRV-r/ARAL/MRC, com pontuação de 2,5 (3,5 se incluirmos o MQV) de drogas ativas na composição.

Os pacientes que resultaram em viremia plasmática não detectável permaneceram por mediana de 35 meses (IQR 15 - 42). Foi considerada para está análise a última carga viral disponível na plataforma Sisgeno e todos os pacientes apresentaram supressão virológica até a última observação. Está análise não foi realizada no paciente 11, pois já apresentava ausência de viremia plasmática detectável no momento da entrada da amostra no laboratório. Assim como, nos pacientes 3 e 12 (tabela 13), onde houve acesso à uma única carga viral após início de novo esquema, com resultado abaixo do limite mínimo de detecção com mediana de 4 meses de tratamento.

A tabela 13 apresenta resumidamente o esquema terapêutico de “*baseline*” e de resgate, as notas obtidas pelo GSS e o sucesso virológico do esquema proposto da população estudada.

Tabela 13: Esquema terapêutico de “baseline” e de resgate do grupo R5comMQV.

Pacientes	Tratamento “baseline” (ITRN) - (ITRNN) - (IP) - (NC)	Tratamento de resgate (TR) (ITRN) - (ITRNN) - (IP) - (NC)	Susceptibilidade	Drogas ativas (MQV /Sem MQV)	Carga viral indetectável
1	(3TC/TDF) (LPV/SQV) (T20)	(3TC/TDF) (DRV/R) (RAL/MQV)	(H/I) (S) (S/S)	3,25/2,25	não
2	Sem Informação	(3TC/TDF) (DRV/R) (RAL/MQV)	(H/I) (L) (S/S)	2,75/1,75	sim
3	(3TC/TDF) (LPV) (T20)	(3TC/TDF) (DRV/R) (RAL/MQV)	(H/I) (S) (S/S)	3,25/2,25	sim
4	(3TC/TDF) (LPV/ATV) (T20)	(3TC/TDF) (DRV/R) (RAL/MQV)	(L/H) (S) (S/S)	3,5/2,5	sim
5	(AZT/3TC/TDF) (FPV)	(AZT/3TC/TDF) (RAL/MQV)	(H/H/L) (S/S)	2,5/1,5	sim
6	(AZT/3TC/TDF) (EFV) (RAL)	(3TC/TDF) (DRV/R) (MQV)	(H/I) (L) (S)	1,75/0,75	sim
7	(3TC/TDF) (LPV) (T20)	(3TC/TDF) (DRV/R) (RAL/MQV)	(H/I) (PL) (S/S)	3,0/2,0	sim
8	(AZT/3TC/TDF) (TPV) (MQV)	(3TC/TDF) (DRV/R) (MQV)	(H/L) (S) (S)	2,5/1,5	sim
9	(3TC/TDF) (DRV) (RAL/T20)	(3TC/TDF) (DRV/R) (RAL/MQV)	(H/I) (L) (S/S)	2,75/1,75	sim
10	(3TC/TDF) (ATV) (RAL)	(3TC/TDF) (DRV/R) (T20/MQV)	(H/I) (H) (S/S)	2,25/1,25	sim
11	(3TC/D4T/TDF) (DRV) RAL/T20)	(3TC/D4T/TDF) (DRV) (RAL/MQV)	(H/H/I) (I) (S/S)	2,5/1,5	sim
12	(3TC) (EFV) (DRV) (RAL)	(DDI/3TC) (ETV) (DRV) (MQV)	(PL/H) (S) (S) (S)	3,5/2,5	sim
13	(3TC/TDF) (DRV) (T20)	(3TC/TDF) (DRV/R) (RAL/MQV)	(H/I) (H) (S/S)	2,25/1,25	sim
14	(3TC/TDF) (DRV) (T20)	(3TC/TDF) (DRV/R) (MQV)	sem informação	sem informação	sim
15	(3TC/TDF) (LPV)	(3TC/TDF) (DRV/R) (RAL/MQV)	(H/L) (I) (S/S)	2,75/1,75	sim
16	(AZT/3TC/TDF) (AMP) (T20)	(3TC/TDF) (DRV/R) (RAL/MQV)	(H/I) (I) (S/S)	2,5/1,5	sim

Os pacientes 6, 7, 9 e 11 realizaram o teste de tropismo com a finalidade de alterar o T20 do esquema, devido os pacientes não suportarem seu uso. Os três primeiros permaneceram em uso de T20 durante pouco tempo, e exceto, o paciente 11 estava em uso de um regime de tratamento, contendo T20 e apresentava carga viral indetectável desde 12/01/2009. O paciente 6 levou 15,5 meses para resultar em CV indetectável; Houve uma carga viral indetectável inicial, e em seguida, aumento da viremia, com alteração de esquema e a carga viral permaneceu indetectável.

4.3.2 Parâmetros imunológicos dos pacientes do grupo R5_{comMQV} n=16

Neste grupo, a análise de benefício imunológico foi realizada em 14/16 pacientes. Foi excluído um paciente que não obteve sucesso virológico e também um que já apresentava ausência de viremia plasmática no momento da entrada da amostra no laboratório.

Observou-se que na primeira avaliação da contagem de células T CD4 após início de TR (12-32 semanas), 86% (12/14) dos pacientes avaliados aumentaram 96 células/CD4 (mediana). A figura 14 ilustra individualmente, os valores de CD4 pré-TR com o aumento obtido por eles nessa primeira análise. Quando foi avaliado o número de células T CD4 em todo o período, isto é, mediana de 26 meses de tratamento, observou-se que 86% (12/14) dos pacientes aumentaram mais de 100 células do *baseline*. É importante notar, que não necessariamente são os mesmos pacientes, onde o aumento de células T CD4 foi notado na primeira avaliação (semana 12-32 após início com TR). A tabela 14 apresenta os parâmetros imunológicos deste grupo e a figura 15 apresenta individualmente os valores de nadir e contagens de células CD4/mm³ pré e pós-início de TR.

Tabela 14: Parâmetros imunológicos dos pacientes do grupo R5_{comMQV}.

Parâmetros Imunológicos	
Nadir (CD4/mm³)	52 (IQR: 18-89)
CD4 pré TR (CD4/mm³)	234 (IQR: 152-484)
Aumento de células CD4, semana 12-32 (cels/mm³)	96
CD4 último observado após TR (CD4/mm³)	512 (IQR: 152-484)
Aumento de 100 células, a partir do CD4_{préTR} (%)	86
Tempo de tratamento observado (meses)	26

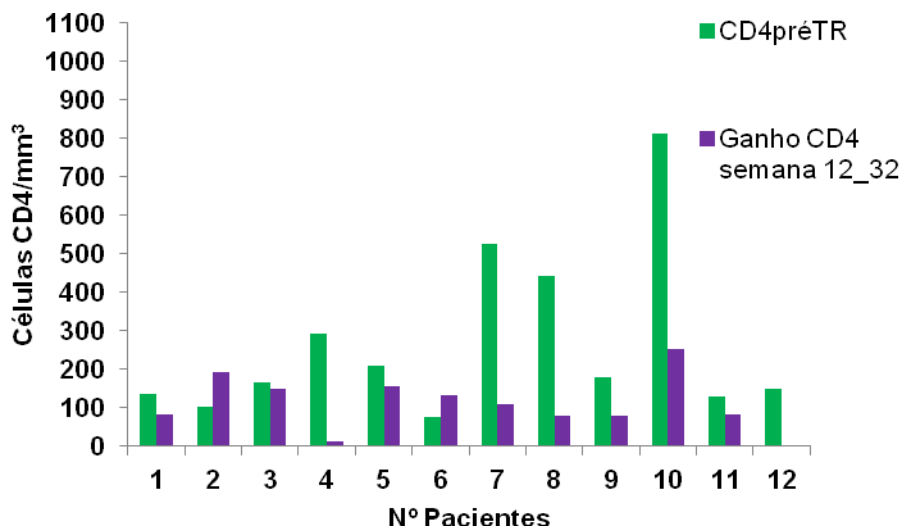


Figura 14: Aumento de células T CD4 no grupo R5MQV após início de terapia de resgate (12 a 32 semanas).

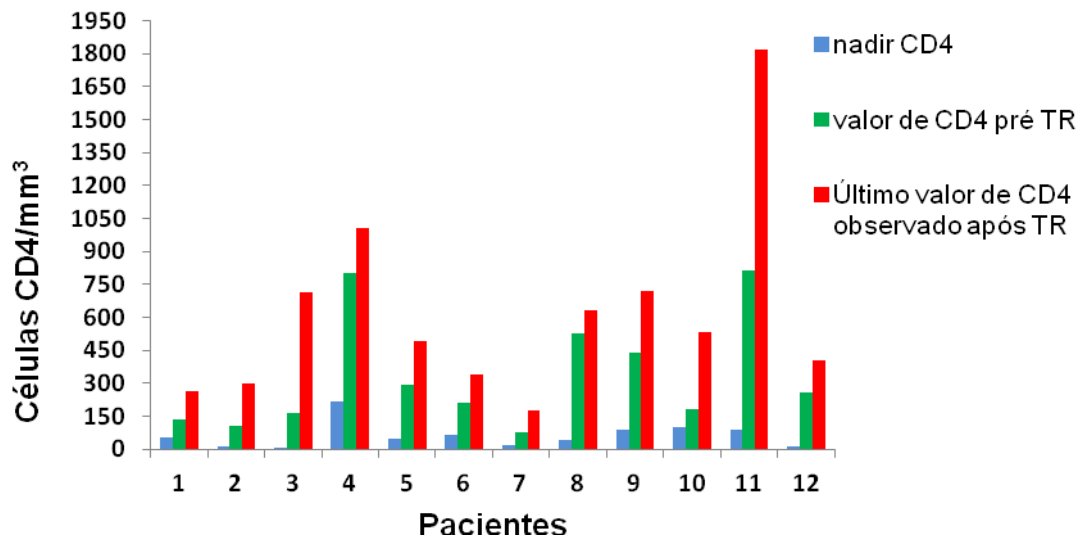


Figura 15: Variações nas contagens de células T CD4 no grupo R5comMQV após início de terapia de resgate com MQV.

4.3.3 Parâmetros virológicos dos pacientes do grupo R5_{semMQV} n=25

Após o envio do laudo de tropismo 88% (22/25) dos pacientes trocaram o esquema terapêutico após dois meses (mediana), o restante manteve o tratamento anterior.

As informações de tratamento de *baseline*, obtidas em 81% (21/26) dos pacientes, e resgate revelaram que independente do período avaliado a maioria dos pacientes fizeram uso de 3TC associado ao TDF, os ARVs da classe dos NNRTI foram utilizadas em 33% e 21% dos pacientes durante respectivamente, o *baseline* e resgate. A maioria dos pacientes independente do período avaliado fez uso de algum ARV da classe dos IPs, contudo foi observado que o DRV/r foi mais utilizado no tratamento de resgate do que no *baseline* (p=0,004), sendo usado por 60% (12/20) dos pacientes. Assim como, os medicamentos de novas classes foram mais utilizados durante o TR (p=0,002), onde 52% (12/23) dos pacientes usaram algum ARV desta classe, sendo o RAL utilizado por 67% (8/12) pacientes. A tabela 15 apresenta resumidamente as informações de tratamentos dos pacientes deste grupo.

Tabela 15: Informações de uso de ARVs, de acordo, com a classe de medicamento, nos diferentes períodos de tratamento avaliados em pacientes do grupo R5MQV.

Classe de medicamentos antirretrovirais (ARV)	Informações de uso de ARVs no período avaliado	
	“Baseline” Pacientes - 21/26 (81%)	Terapia de Resgate Pacientes - 23/26 (88%)
ITRN (%)	100	100
ARV mais utilizado (%)	3TC/TDF - 12/21 (57)	3TC/TDF (77)
ITRNN (%)	7/21 (33)	21 (5/23)
ARV mais utilizado (%)	EFV - 5/7 (71)	EFV (80)
IP (%)	15/21 (71)	87 (20/23)
ARV mais utilizado (%)	LPV - 8/15 (53)	LPV - 5/20 (25)
ARV mais utilizado (%)	DRV/r - 1/15 (6)	DRV - 12/20 (60) p=0,004
Novas classes (%)	5 (1/21)	52 (12/23) p=0,002
ARV mais utilizado (%)	T20 - 1/1 (100)	* T20 - 6/12 (50)
ARV mais utilizado (%)	-	* RAL - 10/12 (83)

* Em 4/12 (33%) pacientes que fizeram uso de ARVs de novas classes, utilizaram T20 e RAL associados no mesmo esquema.

A análise de resposta virológica do esquema terapêutico de resgate proposto revelou que 80% (20/25) dos pacientes resultaram em carga viral indetectável, com mediana de três meses de uso de novo esquema. No entanto, três destes pacientes apresentaram ausência de viremia plasmática transitoriamente, por seis meses (mediana) e, em seguida, falharam ao tratamento. Portanto, excluindo estes pacientes, a taxa de sucesso virológico cai para 68% (17/25), com ausência de viremia plasmática detectável por mediana de 34 meses (IQR 18 - 44). Esta análise não foi realizada nos pacientes 9, 15 e 24, pois houve acesso a uma única carga viral após início de novo esquema (tabela 17). Todas apresentavam resultado abaixo do limite mínimo de detecção e estavam em tratamento por mediana de três meses.

Em 88% dos pacientes (22/25), o número de drogas ativas na terapia utilizada foi calculado através do GSS com mediana de 2,38 (IQR 2 - 3). Estratificando a nota de GSS, observou-se que 59% dos pacientes se encontraram na escala de 2,25 – 3,0. A tabela 16 mostra a nota de GSS e relaciona com a obtenção de sucesso virológico.

Tabela 16: Pontuação do GSS do esquema “background” dos pacientes R5semMQV. As notas do GSS obtidos foram estratificadas em 4 faixas e a porcentagem de sucesso virológico, após uso de terapia de resgate.

Drogas ativas (GSS) 88% pacientes (22/25) - Mediana - 2,38		
Estratificação da nota do GSS	Pacientes (%)	Carga viral indetectável após TR (%)
0 - 1,0	2/22 (9)	0/3 (0)
1,25 - 2,0	6/22 (27)	4/6 (67%)
2,25 - 3,0	13/22 (59)	* 11/13 (85%)
3,25 - 4	1/22 (5)	* 1/1 (100%)

* Dois pacientes dentro deste grupo apresentaram carga viral indetectável transitoriamente.

O sucesso virológico dos pacientes foi observado em esquemas terapêuticos com nota pelo GSS acima de 2 e os três pacientes que mantiveram o tratamento anterior não diminuíram a carga viral a níveis indetectáveis. A tabela 17 apresenta resumidamente as informações de tratamento dos pacientes.

Tabela 17: Esquema terapêutico de “baseline” e de resgate do grupo R5semMQV.

Pacientes	Tratamento baseline (ITRN) - (ITRNN) - (IP) - (NC)	Tratamento de resgate (TR) (ITRN) - (ITRNN) - (IP) - (NC)	Susceptibilidade	Drogas ativas	Carga viral indetectável
1	(AZT/3TC) (EFV) (LPV)	(3TC/TDF) (DRV-r) (RAL/T20)	(H/I) (I) (S/S)	2, 5	sim
2	(AZT/3TC) (ATV)	(3TC/TDF) (EFV) (FPV-r)	(H/PL) (S) (PL)	2,5	sim
3	(3TC/TDF) (FPV)	manteve esquema anterior	(S/S) (S)	3	não
4	(AZT/3TC) (LPV)	(AZT/DDI/3TC) (DRV-r) (T20)	(H/H/H) (S) (S)	2	sim
5	(AZT/3TC/TDF) (FPV)	(3TC/TDF) (DRV-r) (T20)	(H/H) (I) (S)	1,25	não
6	(DDI/3TC/TDF) (ATV)	(3TC/TDF) (DRV-r) (RAL)	(H/I) (PL) (S)	2	sim
7	(3TC/TDF) (LPV)	(3TC/TDF) (DRV-r) (T20/RAL)	(H/I) (L) (S/S)	2,75	sim temporariamente
8	(AZT/TDF) (LPV)	(3TC/TDF) (ETV) (LPV-r) (RAL)	(H/L) (S) (H) (S)	2,5	sim
9	(3TC/D4T) (LPV)	(3TC/TDF) (DRV-r)	(H/I) (I)	0,5	não
10	(3TC/TDF) (EFV)	(AZT/3TC/TDF) (LPV-r)	(S/H/I) (S)	2,25	sim
11	(AZT/3TC) (ATV)	manteve esquema anterior	(H/H) (H)	0	não
12	(3TC/TDF) (NVP)	(3TC/TDF) (LPV-r)	(H/S) (S)	2	sim
13	Sem informação	(3TC/TDF) (DRV-r) (T20/RAL)	(H/L) (L) (S/S)	3	sim
14	(AZT/3TC/TDF) (FPV)	(3TC/TDF) (EFV) (DRV-r) (T20/RAL)	(H/L) (S) (I) (S/S)	3,75	sim
15	(3TC/TDF) (DRV-r)	(3TC/TDF) (DRV-r) (RAL)	sem informação	sem informação	sim temporariamente
16	(AZT/3TC) (LPV)	(DDI/3TC) (DRV-r) (RAL)	sem informação	sem informação	sim
17	(3TC/TDF) (LPV/r)	manteve esquema anterior	(H/S) (S)	2	não
18	(3TC/TDF) (EFV)	(AZT/3TC/TDF) (FPV-r)	(S/H/S) (S)	3	sim
19	(3TC/D4T) (NVP)	(AZT/3TC/TDF) (ATV-r)	(PL/H/L) (S)	2,25	sim
20	(AZT/3TC) (EFV)	(AZT/3TC/TDF) (LPV-r)	(I/H/S) (S)	2,25	sim
21	(AZT/3TC/TDF) (EFV)	(3TC/TDF) (DRV-r) (RAL)	(H/I) (PL) (S)	2	sim
22	(3TC/TDF) (LPV) (T20)	(3TC/TDF) (DRV-r) (RAL)	(H/L) (S) (S)	2,5	sim
23	Sem informação	(AZT/3TC) (LPV-r)	(S/S) (S)	3	sim
24	Sem informação	(AZT/3TC) (EFV)	(S/S) (S)	3	sim temporariamente
25	Sem informação	(AZT/3TC) (EFV)	sem informação	sem informação	sim

4.3.4 Parâmetros imunológicos dos pacientes do grupo (R5_{semMQV}) n=25

Neste grupo, a análise de benefício imunológico foi realizada em 16/25 pacientes. Foram excluídos os pacientes que não obtiveram sucesso virológico, os que apresentaram transitoriamente a carga viral indetectável e um paciente que não tinha o valor da contagem de células T CD4 após início de TR.

A primeira avaliação da contagem de células T CD4 (12-32 semanas), revelou que em 75% (12/16) dos pacientes houve um aumento mediano de 77 células do *baseline*, ilustrado individualmente cada caso na figura 16. Quando foi avaliado o número de células T CD4 em todo o período, isto é, mediana de 40 meses de tratamento, observou-se que 75% (12/16) dos pacientes aumentaram mais de 100 células do *baseline*. É importante notar, que não necessariamente são os mesmos pacientes, onde o aumento de células T CD4 foi notado na primeira avaliação (semana 12-32 após início com TR). A tabela 18 mostra os parâmetros imunológicos deste grupo e a figura 17 apresenta individualmente os valores de nadir e as contagens de células T CD4/mm³ pré e pós-início de TR.

Tabela 18: Parâmetros imunológicos dos pacientes do grupo R5semMQV.

Parâmetros Imunológicos	
Nadir (CD4/mm ³)	156 (IQR: 107-279)
CD4 pré TR (CD4/mm ³)	310 (IQR: 189-385)
Aumento de células CD4, semana 12-32 (cels/mm ³)	77
CD4 último observado após TR (CD4/mm ³)	544 (IQR: 457-700)
Aumento de 100 células, a partir do CD4 _{préTR} (%)	75%
Tempo de tratamento observado (meses)	40

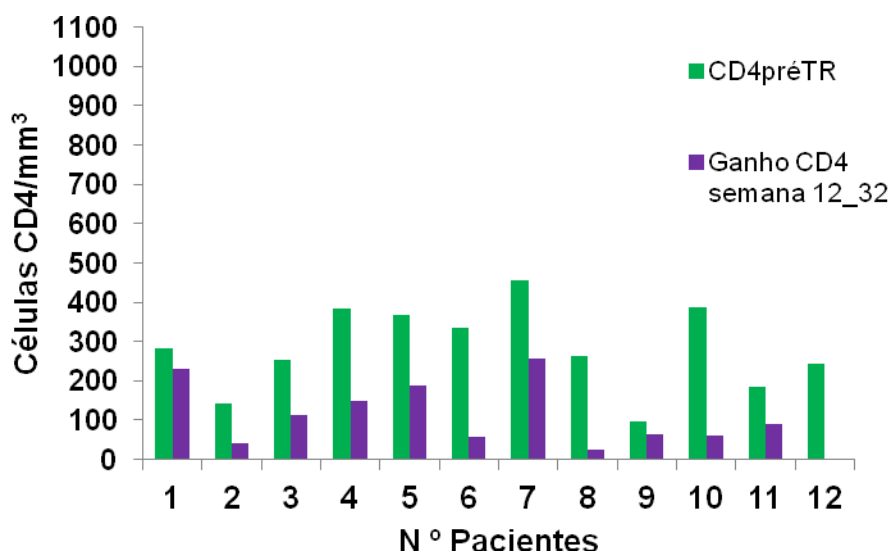


Figura 16: Aumento de células T CD4 no grupo R5semMQV após início de terapia de resgate (12 a 32 semanas).

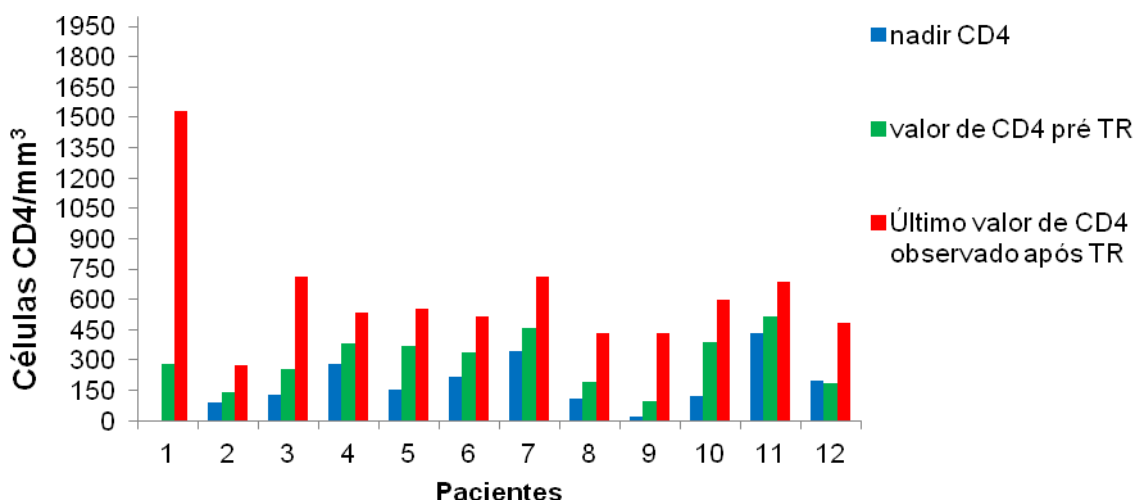


Figura 17: Variações nas contagens de células T CD4 no grupo R5semMQV após início de terapia de resgate.

4.3.5 Parâmetros virológicos dos pacientes de grupo X4 n=32

Após o envio do laudo de tropismo 75% (24/32) dos pacientes trocaram o esquema terapêutico, com mediana de 4 (IQR: 2 – 7) meses para o início de TR. Para finalidade de melhor compreensão os pacientes deste grupo estão listados individualmente, na tabela 21. É importante notar, que 9,4% (3/32) dos pacientes (casos 12, 26, 27 da tabela 21) já apresentavam ausência de viremia detectável no plasma no momento da entrada da amostra no laboratório. Destes, dois fizeram o teste de tropismo para tentar substituir o T20 pelo maraviroque, com ausência de viremia plasmática de mediana de 32 meses e um paciente apresentava efeitos adversos (EFV/Kaletra).

As informações de tratamento de *baseline*, obtidas em 88% (28/32) dos pacientes, e resgate revelaram que independente do período avaliado a maioria dos pacientes fizeram uso de 3TC associado ao TDF, os ARVs da classe dos NNRTI foram utilizadas em 15% e 13% dos pacientes durante respectivamente, o *baseline* e resgate. A maioria dos pacientes independente do período avaliado fez uso de algum ARV da classe dos IPs, contudo foi observado que o DRV/r foi mais utilizado no tratamento de resgate do que no *baseline* ($p=0,0008$), sendo usado por 70% (21/30) dos pacientes. Assim como, os medicamentos de novas classes foram mais utilizados na composição de TR, 53% (17/32) dos pacientes começaram a utilizar um ARV desta classe ($p=0,002$), onde 82% (14/17) fizeram uso de RAL. A tabela 19 apresenta resumidamente as informações de tratamentos dos pacientes deste grupo.

Tabela 19: Informações de uso de ARVs, de acordo, com a classe de medicamento, nos diferentes períodos de tratamento avaliados, do grupo X4.

Classe de medicamentos	Informações de uso de ARVs no período avaliado	
	“Baseline” Pacientes - 28/32 (88%)	Terapia de Resgate Pacientes - 32/32 (100%)
antirretrovirais (ARV)		
ITRN (%)	28/28 (100)	31/32 (97)
ARV mais utilizado (%)	3TC/TDF - 18/28 (64)	3TC/TDF - 26/31 (84)
ITRNN (%)	4/28 (14)	4/32 (9)
ARV mais utilizado (%)	NVP - 2/4 (50)	ETV - 3/4 (75)
IP (%)	25/28 (89)	30/32 (94)
ARV mais utilizado (%)	LPV - 9/25 (36)	LPV - 3/30 (10)
ARV mais utilizado (%)	DRV - 7/25 (28)	DRV - 23/30 (77) p=0,0008
Novas classes (%)	5/28 (18)	19/32 (59) p=0,002
ARV mais utilizado (%)	* T20 - 2/5 (40)	** T20 - 6/9 (32)
ARV mais utilizado (%)	* RAL - 4/5 (80)	** RAL - 17/19 (89)

* 1 paciente utilizou ambos ARVs no mesmo esquema

** 3 pacientes utilizaram ambos os ARVs no mesmo esquema

Neste grupo, a análise de resposta virológica do esquema terapêutico de resgate proposto foi avaliada em 81% (26/32) pacientes. Foram excluídos, aqueles que já estavam com supressão virológica no momento da entrada da amostra no laboratório (3/32), assim como os pacientes que não tivemos acesso a nenhuma carga viral após o início de TR (3/32).

Após início de TR 62% (16/26) dos pacientes alcançaram supressão virológica. No entanto, um paciente apresentou ausência de viremia plasmática detectável temporariamente, por mediana de 5 meses (paciente 8 da tabela 21), e excluindo este paciente da análise, a taxa de sucesso virológico cai para 58% (15/26). Observou-se que estes permaneceram com ausência de viremia plasmática detectável por mediana de 24 meses (IQR: 19 – 36).

Foi considerada para esta análise a última carga viral disponível na plataforma Sisgeno e todos os pacientes apresentaram supressão virológica até a última observação, exceto o paciente 8, que após 19 meses de sucesso virológico, apresentou uma carga viral detectável no plasma sendo

considerada esta data, para a finalidade de cálculo de duração de sucesso virológico.

A avaliação da pontuação de drogas ativas, GSS, do esquema de resgate proposto foi realizada em 81% dos pacientes (26/32), e os pacientes apresentavam pontuação mediana de 2 (IQR 1,5 – 2,25). Estratificando a nota de GSS, foi observado que 58% dos pacientes se encontravam na escala de 1,5 – 2,0. A tabela 20 mostra a nota de GSS e relaciona com a obtenção de sucesso virológico.

Tabela 20: Notas do GSS do esquema de “background” dos pacientes X4. As notas foram estratificadas e a porcentagem de sucesso virológico, após uso de terapia de resgate.

Drogas ativas (GSS) 81% pacientes (26/32) - Mediana - 2,0		
Estratificação da nota do GSS	Pacientes (%)	Carga viral indetectável após TR (%)
0 - 1,0	2/26 (8)	0/2 (0)
1,25 - 2,0	15/26 (58)	* 9/14 (64)
2,25 - 3,0	9/26 (35)	** 5/8 (63)
3,25 - 4	0/26 (0)	n.a.

* Foi considerado n=14, pois um paciente neste grupo não apresenta cv posterior ao início de TR

** Foi considerado n=8, pois um paciente neste grupo não apresenta cv posterior ao início de TR

A tabela 21 apresenta individualmente o esquema terapêutico de *baseline* e resgate, as notas obtidas pelo GSS e o sucesso virológico do esquema proposto da população estudada.

Tabela 21: Esquema terapêutico de “baseline” e de resgate do grupo X4.

Pacientes	Tratamento “baseline” (ITRN) - (ITRNN) - (IP) - (NC)	Tratamento de resgate (TR) (ITRN) - (ITRNN) - (IP) - (NC)	Susceptibilidade	Drogas ativas	Carga viral indetectável
1	(AZT/3TC/TDF) (LPV/4ip)	manteve esquema	sem informação	sem informação	sem informação
2	(D4T/TDF) (ATV)	(DDI/3TC) (DRV/r) (RAL)	(I/PL) (L) (L)	2,75	sem informação
3	(AZT/3TC/TDF) (ETV) (DRV)	(3TC/TDF) (T20/RAL)	(H) (I) (S/S)	2,25	sim
4	(3TC) (EFV) (ATV)	(3TC/TDF) (DRV/r) (RAL)	(H/PL) (L) (S)	2,25	sim
5	(3TC/TDF) (LPV)	(3TC/TDF) (DRV/r) (RAL)	(H/I) (L) (S)	1,75	sim
6	sem informação	(3TC/TDF) (DRV/r) (T20/RAL)	(H/I) (I) (S/S)	2,5	não
7	(AZT/3TC) (LPV/r)	(AZT/3TC) (ATV/r)	(H/H) (H)	0	não
8	(AZT/3TC) (LPV)	(3TC/D4T/TDF) (DRV/R) (RAL)	(H/H/I) (PL) (S)	2	sim temporariamente
9	(3TC/TDF) (FPV)	(3TC/TDF) (DRV/r) (RAL)	(L/H) (L) (S)	2	sim
10	(DDI/3TC/TDF) (ATV)	(3TC/TDF) (DRV/r) (T20)	(H/L) (L) (S)	2	sim
11	(3TC/D4T) (DRV) (T20)	(3TC/D4T) (DRV/r) (RAL)	(H/H) (I) (S)	1,25	não
12	(DDI/3TC/TDF) (LPV)	manteve esquema	sem informação	sem informação	sim previamente
13	(AZT/3TC/TDF)	(3TC/TDF) (DRV-r/ATV-r)	(H/L) (S/L)	2	Sim
14	sem informação	(AZT/3TC) (ETV) (DRV-r) (RAL)	(H/H) (S) (I) (S)	2,25	Sim
15	(3TC/TDF) (DRV) (RAL)	(3TC/TDF) (DRV/r)	(H/I) (L)	1,25	Sim
16	(3TC/TDF) (LPV)	(3TC/TDF) (RAL/T20)	(S/L) (S/S)	3,5	Não
17	(3TC/TDF) (LPV)	manteve esquema	sem informação	sem informação	Sim
18	(3TC/D4T) (NVP) (LPV)	(3TC/TDF) (NVP) (ATV-r)	(H/PL) (H) (S)	1,75	Não
19	(3TC/TDF) (DRV)	manteve esquema	(H/PL) (H)	0,75	Não
20	(DDI/3TC/TDF) (ATV)	(ETV) (DRV/r) (RAL)	sem informação	sem informação	Sim
21	(AZT/DDI/3TC) (SQV/r)	(3TC) (DRV/r) (RAL)	(H) (L) (S)	1,5	Sim
22	(3TC/TDF) (ATV-r)	(3TC/TDF) (ETV) (DRV/r) (RAL)	(H/I) (S) (H) (S)	2,25	Sim
23	(AZT/3TC/TDF) (DRV)	manteve esquema	(H/H/L) (S)	1,5	Não
24	(AZT/3TC) (ATV)	(3TC/TDF) (DRV-r) (RAL)	(H/L) (L) (S)	2	Sim
25	(3TC/TDF) (DRV)	manteve esquema	(S/S) (S)	3	Não
26	(3TC/TDF) (DRV) (T20/RAL)	manteve esquema	sem informação	sem informação	sim previamente
27	sem informação	(3TC/TDF) (ATV-r)	sem informação	sem informação	sim previamente
28	(3TC/D4T) (NVP)	(AZT/3TC/TDF) (DRV-r)	(L/H/PL) (PL)	2	sem informação
29	sem informação	(3TC/TDF) (DRV/r)	(S/PL) (S)	2,75	Sim
30	(3TC/TDF) (RAL)	(3TC/TDF) (ETV) (DRV/r) (T20)	(H/I) (I) (H) (S)	1,5	Não
31	(3TC/TDF) (SQV) (RAL/MQV)	manteve esquema	(H/L) (H) (S/O)	1,5	Não
32	(AZT/3TC) (LPV/4IP)	(3TC/TDF) (DRV/r) (RAL)	(H/H) (L) (S)	1,5	Sim

4.3.6 Parâmetros Imunológicos dos pacientes do grupo X4 n=32

Neste grupo, a análise de benefício imunológico foi realizada em 81% (13/16) pacientes. Foram excluídos os pacientes que não obtiveram sucesso virológico, que apresentaram temporariamente ausência de viremia plasmática, paciente sem informação da contagem de células T CD4 após início de TR e também o paciente que não fez alteração do esquema terapêutico após envio de laudo de tropismo realizado pelo nosso laboratório.

Observou-se que na primeira avaliação da contagem de células T CD4 após início de TR (12-32 semanas), em 69% (6/13) dos pacientes avaliados foi notado um aumento na contagem de células T CD4 de 131 células/CD4 (mediana), ilustrado individualmente cada caso na figura 18. Quando foi avaliado a contagem de células T CD4 em todo o período, isto é, mediana de 34 meses de acompanhamento, observou-se que estes 69% (9/13) aumentaram mais de 100 células CD4/mm³ do *baseline*. A tabela 22 apresenta os parâmetros imunológicos deste grupo e a figura 19 apresenta individualmente os valores de nadir e contagens de células CD4/mm³ pré e pós-início de TR.

Tabela 22: Parâmetros Imunológicos dos pacientes do grupo X4.

Parâmetros Imunológicos	
Nadir (CD4/mm³)	82 (IQR: 54-179)
CD4 pré TR (CD4/mm³)	428 (IQR: 63-498)
Aumento de células CD4, semana 12-32 (cels/mm³)	131
CD4 último observado após TR (CD4/mm³)	599 (IQR: 365-703)34
Aumento de 100 células, a partir do CD4_{preTR} (%)	69%
Tempo de tratamento observado (meses)	34

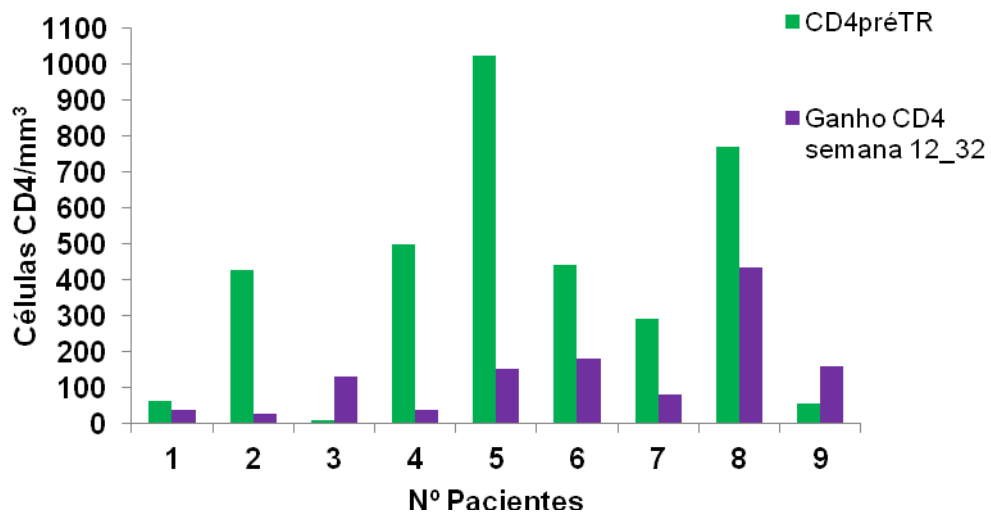


Figura 18: Aumento de células T CD4 no grupo X4 após início de terapia de resgate (12 a 32 semanas).

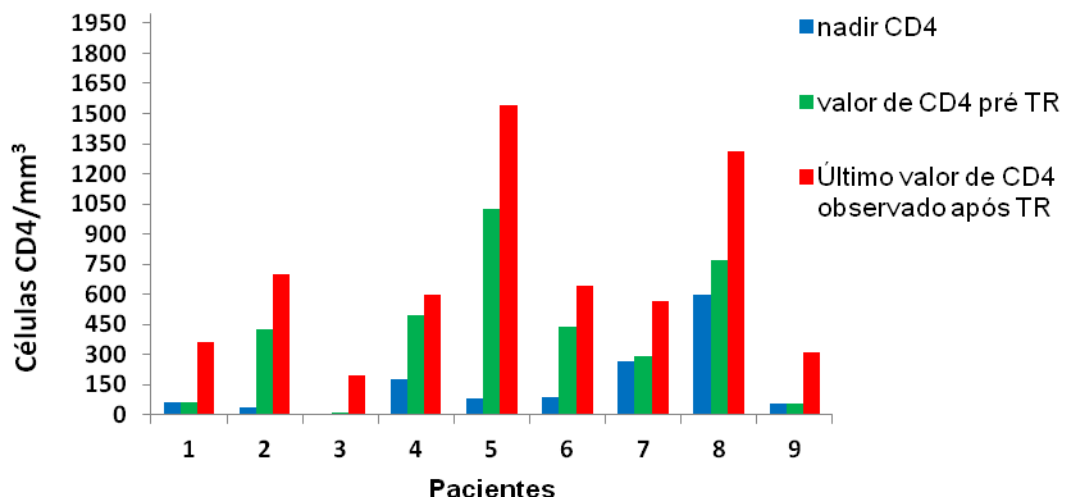


Figura 19: Variações nas contagens de células T CD4 no grupo X4 após início de terapia de resgate.

4.4 Comparação dos três grupos de estudo, avaliados quanto ao desfecho terapêutico

Os pacientes incluídos nos três grupos (n=73) iniciaram terapia de resgate em 84% dos casos avaliados, com mediana de 4 meses após o envio do laudo de tropismo. Destes, 68% (50/73) obtiveram sucesso virológico e 63% (46/73) se forem excluídos os quatro pacientes que apresentaram transitoriamente a carga viral indetectável. Em seguida, observou-se que 76% (33/43) destes pacientes ganharam mais de 100 células CD4/mm³ comparado com o *baseline*.

4.4.1 Comparação do tratamento de resgate dos grupos analisados

Os três grupo apresentam informações de tratamento semelhantes, a tabela 23 mostra resumidamente as informações de desfecho terapêutico.

Tabela 23: Informações de tratamento após envio do laudo de acordo com os grupos avaliados

Desfecho terapêutico dos pacientes após envio do laudo de tropismo	Grupo R5comMQV (n=16)	Grupo R5semMQV(n=25)	Grupo X4 (n=32)
Iniciaram TR após envio do laudo de tropismo - % (Nº Paciente)	100 (16/16)	88 (22/25)	75 (24/32)
Tempo para iniciar TR após envio do laudo (meses)	4 (IQR: 3 - 7)	2 (IQR: 1 - 7)	4 (IQR: 2 - 7)
Carga viral indetectável após TR - % (Nº Paciente)	94 (15/16)	80 (20/25) **68 (17/25)	62 (16/26) *58 (15/26)
Tempo para resultar em carga viral indetectável após início de TR (meses)	3 (IQR: 2 - 4)	3 (IQR: 2 - 5)	2 (IQR: 1 - 5)
Duração da ausência de viremia plasmática detectável (meses)	35 (IQR: 14 - 42)	33 (IQR: 6 - 40)	24 (IQR: 19-36)
% (Nº Paciente)	93 (14/15)	100 (20/20)	75 (12/16)
Pontuação do GSS (mediana)	2,75/1,75 (IQR: 2,5 - 3,25)	2,38 (IQR: 2 - 3)	2 (IQR: 1,5 - 2,25)
% (Nº Paciente)	94 (15/16)	88 (22/25)	81 (26/32)

* Excluído um paciente que apresentou temporariamente ausência de viremia plasmática

** Excluídos três pacientes que apresentaram temporariamente ausência de viremia plasmática

4.4.2 Avaliação do esquema terapêutico dos diferentes grupos, de acordo com o “*baseline*” e a terapia de resgate.

A análise do tratamento de “*baseline*” e terapia de resgate demonstraram que os três grupos utilizaram na grande maioria dos casos algum ARV da classe dos NRTI e a associação do 3TC e TDF foi o mais observado. Os ARVs da classe dos NNRTI foram pouco utilizados para os três grupos, independentemente do período observado. No entanto, os ARVs da classe dos IPs foram utilizados na maioria dos casos como opção para compor o esquema terapêutico dos três grupos avaliados, tanto no *baseline*, quanto na terapia de resgate. Além do que, o DRV/r foi o mais utilizado para compor a terapia de resgate dos três grupos avaliados. Os medicamentos de novas classes também foram mais utilizados no segundo momento para os grupos R5_{semMQV} (p=0,002) e grupo X4 (p=0,002). Já para o grupo R5_{comMQV} não houve aumento significativo de uso entre o *baseline* e o tratamento de resgate, entretanto houve diminuição do uso do T20 (p=0,0009) na terapia de resgate. A tabela 24 apresenta o tratamento de *baseline* e resgate dos grupos estudados.

Tabela 24: Informações do uso de ARVs de acordo com os períodos de tratamento avaliados e os três grupos estudados.

Classe de antirretrovirais (ARVs)	Uso de ARVs nos períodos avaliados					
	Grupo R5comMQV		Grupo R5semMQV		Grupo X4	
	Baseline Pacientes 15/16 (94%)	TR Pacientes 16/16 (100%)	Baseline Pacientes 21/26 (81%)	TR Pacientes 23/26 (88%)	Baseline Pacientes 28/32 (88%)	TR Pacientes 32/32 (100%)
NRTI (%)	100 (15/15)	100 (16/16)	100 (21/21)	100 (23/23)	28/28 (100)	31/32 (97)
ARV mais utilizado (%)	3TC/TDF - 14/15 (93)	3TC/TDF - 15/16 (94)	3TC/TDF - 12/21(57)	3TC/TDF (77)	3TC/TDF - 18/28 (64)	3TC/TDF - 26/31 (84)
NNRTI (%)	2/15 (13)	1/16 (6)	7/21 (33)	5/23 (21)	4/28 (14)	4/32 (9)
ARV mais utilizado (%)	EFV - 2/2 (100)	ETV - 1/1 (100)	EFV - 5/7 (71)	EFV (80)	NVP - 2/4 (50)	ETV - 3/4 (75)
IP (%)	14/15 (93)	15/16 (94)	15/21 (71)	87 (20/23)	25/28 (89)	30/32 (94)
ARV mais utilizado (%)	LPV - 5/14 (36)		LPV - 8/15 (53)	LPV - 5/20 (25)	LPV - 9/25 (36)	LPV - 3/30 (10)
ARV mais utilizado (%)	DRV - 5/14 (36)	DRV - 15/15 (100) p=0.0002	DRV/r - 1/15 (6)	DRV - 12/20 (60) p=0.004	DRV - 7/25 (28)	DRV - 23/30 (77) =0.0008
Novas classes (%)	13/15 (87)	16/16 (100) p=0.2	5 (1/21)	52 (12/23) p=0.002	5/28 (18)	19/32 (59) p=0.002
ARV mais utilizado (%)	T20 - 9/15 (60)	T20 - 1/16 (6) p<0.0009	T20 - 1/1 (100)	T20 - 6/12 (50)	T20 - 2/5 (40)	T20 - 6/9 (32)
ARV mais utilizado (%)	RAL- 5/15 (38)	RAL - 11/16 (69)		RAL - 10/12 (83)	RAL- 4/5 (80)	RAL - 17/19 (89)

4.4.3 Sucesso Viroológico por grupo

Os pacientes do grupo R5comMQV obtiveram uma taxa de sucesso virológico significativamente maior quando comparados com os pacientes do grupo X4 ($p=0,03$). Em relação aos pacientes do grupo R5semMQV, a diferença não atingiu significância ($p=0,06$). A análise foi feita, tanto nos pacientes que resultaram em sucesso virológico sustentado por longo período, como incluindo também os pacientes que apresentaram ausência transitória de viremia detectável. A tabela 25 mostra as comparações de sucesso virológico entre os três grupos estudados.

Tabela 25: Taxas de sucesso virológico obtido pelos pacientes, de acordo com os grupos avaliados.

	R5comMQV (n=16)	R5semMQV (n=25)	X4 (n=26)
Sucesso virológico	94% (15/16)	80% (20/25) $p=0,37$	62% (16/26) $p=0,03$
	*94% (15/16)	*68% (17/25) $p=0,06$	*58%(15/26) $p=0,015$

* excluídos os pacientes que apresentaram carga viral plasmática indetectável transitória após início de TR (Fisher two-tailed).

4.4.4 Pontuação do GSS dos grupos avaliados

A maioria dos pacientes dos grupos R5comMQV e R5semMQV se encontravam na faixa de pontuação de GSS entre 2,25-3 e dentro desta faixa foi observado sucesso virológico em 100 e 85%, respectivamente. Já para o grupo X4, a maioria dos pacientes apresentava menor mediana de pontuação de GSS, localizado entre as faixas de 1,25 – 2 com sucesso virológico observado em 63% destes casos.

No entanto, resolvemos avaliar a pontuação de GSS do tratamento de resgate dos pacientes pertencentes ao grupo R5comMQV sem considerar a pontuação do maraviroque no esquema. Tal fato indica que a pontuação dos mesmos se encontraria na grande maioria na escala de 1,25 – 2, assim como os pacientes do grupo X4. A figura 20 apresenta as notas obtidas pelo GSS de cada grupo.

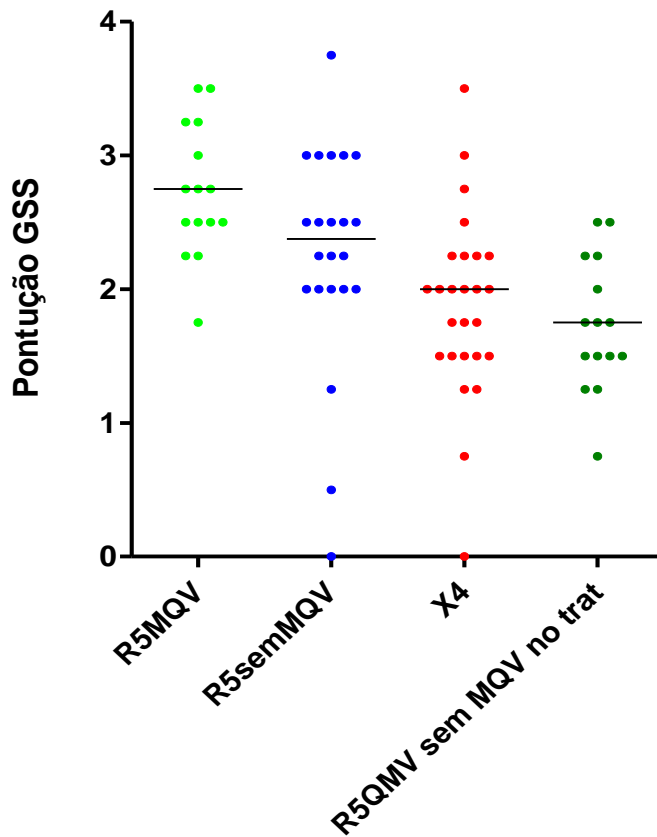


Figura 20: Classificação do GSS relacionando os pacientes dos três grupos avaliados com a mediana. Os pacientes R5comMQV estão apresentados tanto com um ponto referente ao MQV incluído na pontuação total do esquema terapêutico assim como, com apenas a pontuação dos demais medicamentos do esquema (grupo R5comMQV sem MQV no trat). A pontuação de GSS do grupo X4 é menor em relação aos grupos R5MQV e R5semMQV ($p=0,0003$). Foi observado também que a exclusão da pontuação do MQV (1 ponto) da contagem do grupo R5MQV, faz com que a pontuação deste grupo (R5MQV sem MQV no trat) se assemelhe com a do grupo X4, se tornando mais baixa ($p<0.0001$).

4.4.5 Benefício Imunológico por grupo

A análise foi realizada somente nos pacientes que obtiveram sucesso virológico após início do tratamento de resgate. Observou-se que o grupo R5comMQV apresentou menor valor de nadir ($p=0,002$) e de CD4 pré TR. Contudo, este grupo apresentou maior porcentagem de indivíduos que conseguiram aumentar mais de 100 células T CD4, ao longo do acompanhamento (86% 12/14 pacientes). A tabela 26 apresenta os parâmetros imunológicos dos três grupos estudados. A avaliação do aumento de células T CD4 na primeira avaliação (semana 12-32) não se mostrou diferente entre os grupos ($p=0,89$), apesar dos pacientes do grupo X4 terem partido de um CD4 maior como apresentado na figura 22. No entanto, se considerarmos todo o período de acompanhamento, foi observado uma tendência do grupo R5comMQV em aumentar mais o número de células T CD4 do *baseline*, como demonstrado na figura 21.

Tabela 26: Parâmetros imunológicos dos três grupos avaliados quanto ao desfecho terapêutico. Avaliação estatística foi realizada por Kruskal-Wallis test.

Parâmetros Imunológicos	R5comMQV	R5semMQV	X4
Nadir (CD4/mm ³)	52 (IQR:18-89)	156 (IQR: 107-279)	82 (IQR: 54-179) $p=0,002$
CD4 pré TR (CD4/mm ³)	234 (IQR: 151-484)	310 (IQR: 189-385)	428 (IQR: 63-498) $p=0,96$
Ganho de CD4, até a semana 12-32 (cels/mm ³)	96	77	131 $p=0,89$
CD4 último observado após TR (CD4/mm ³)	512 (IQR: 220-715)	544 (IQR: 457-700)	599 (IQR:365-703) $p=0,86$
Aumento de 100 células, a partir do CD4 _{preTR} (%)	86%	75%	69%
Tempo de tratamento observado (meses)	26	40	34

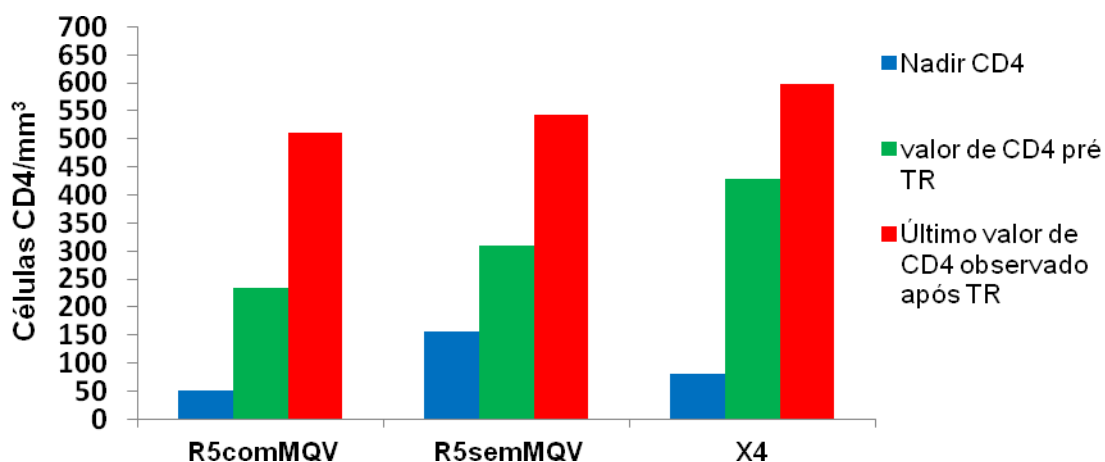


Figura 21: Evolução das contagens de CD4, de acordo com o tempo observado em cada grupo. Informações dos valores de mediana de Nadir e contagens de CD4 pré e após início de TR, de todos os pacientes pertencentes aos três grupos avaliados.

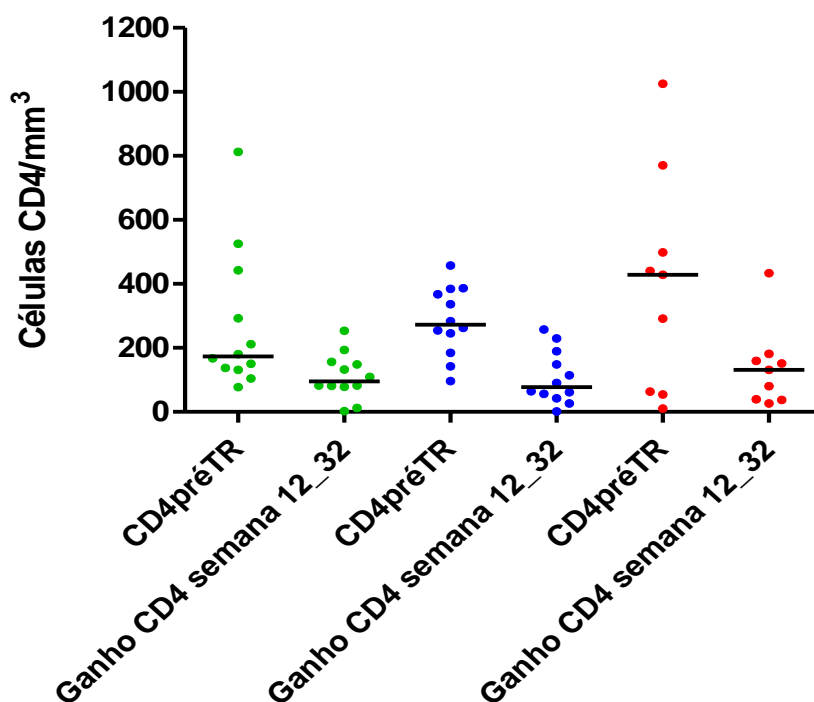


Figura 22: Aumento de células T CD4 obtido na semana 12-32 dos 3 grupos. Pontos verde, azul e vermelho correspondem respectivamente aos grupos R5comMQV, R5semMQV e X4. Em relação ao ganho de CD4 após TR (semana 12-32) não foi observada diferença estatística entre os grupos ($p=0,89$). O teste utilizado para a análise foi o ANOVA – Kruskal-Wallis test.

5. Discussão

O maraviroque é o único antagonista de CCR5 aprovado exclusivamente para uso clínico em pacientes com vírus R5-trópicos. Sua prescrição só é realizada mediante um teste de tropismo que identifique que apenas variantes virais R5 estão presentes. Nesse contexto, existem os testes fenotípicos, considerados padrão ouro, e os testes genotípicos, onde a predição do tropismo é realizada através da submissão da sequência genética da região V3 do envelope viral, em sites específicos de predição.

No Brasil, principalmente a partir de 2008, o tropismo genotípico tem sido utilizado como opção ao teste fenotípico. Entretanto, existem poucos estudos na literatura com a finalidade de avaliar a aplicação do teste de tropismo realizado nas rotinas laboratoriais convencionais, onde os pacientes apresentam perfis virológicos e imunológicos diferentes. Outros estudos descritos na literatura demonstram a avaliação do MQV em trabalhos clínicos controlados, portanto, é relevante avaliar o teste de tropismo genotípico realizado nas rotinas laboratoriais convencionais.

O presente estudo procurou avaliar o ensaio genotípico padronizado em nosso serviço de duas formas, inicialmente em uma comparação com o ensaio fenotípico realizado nos EUA e, em seguida, através da avaliação do desfecho terapêutico dos pacientes que realizaram o teste de tropismo com a finalidade de uso do antagonista de CCR5 para compor o tratamento de resgate. Nossa hipótese de trabalho é que, no caso da identificação correta do tropismo R5, o uso do antagonista como parte da terapia de resgate traria algum benefício ao paciente, aqui avaliado através da resposta imunológica e virológica dessa terapia.

Primeiramente, a análise de comparação do ensaio de predição genotípico do tropismo realizado no laboratório do IAL com o teste fenotípico demonstrou uma elevada concordância entre ambas às metodologias. No entanto, o estudo se limitou a apenas 25 casos onde foi possível ser realizado simultaneamente os ensaios. Este número reduzido de amostras se deve ao fato de ser um exame caro e também por exigir uma logística de transporte para o

exterior. Além disso, com a crescente literatura sugerindo essa comparabilidade, o investimento nessa validação perdeu um pouco sua necessidade. Nessa comparação os pacientes foram selecionados pelo próprio serviço de atendimento, e o mesmo foi o responsável pelo envio das amostras. Foi observado que a maioria dos pacientes (68%) apresentava variantes virais classificadas como X4-trópicas, provavelmente, devido ao momento tardio em que o MQV é prescrito. No Brasil, de acordo com a nota técnica 172/2013, do Ministério da Saúde, o antagonista de CCR5 deve ser utilizado como opção em esquemas de terapia antirretroviral de resgate tardio. Neste contexto, o paciente apresenta um tempo de infecção em geral longo, e isto favorece o aparecimento de variantes X4.

Nesta análise, foi observado que o grupo de pacientes com variantes X4-trópicas apresentou uma população mais jovem do que o grupo R5, contudo isso se deve a uma parceria realizada com um serviço ambulatorial infantil, uma população onde a prevalência de variantes X4 é distinta da observada entre adultos, Briz et al., 2012. Entretanto, ambos os grupos apresentavam dados demográficos semelhantes.

Diversos outros trabalhos demonstraram que o ensaio de genotropismo é comparável com o fenotípico. Contudo, o diferencial deste estudo foi a utilização de mais de uma ferramenta de interpretação genotípica para a classificação do tropismo, e em alguns casos esta combinação de critérios permitiu uma interpretação mais robusta na determinação do tropismo, como demonstrado por Chueca et al., 2009.

Posteriormente, a análise de desfecho terapêutico dos pacientes que realizaram o ensaio de tropismo no nosso serviço originou três grupos, de acordo com o tropismo e o uso do antagonista de CCR5: R5MQV, R5semQMV e X4. Foi observado que, independentemente do grupo avaliado, o tratamento de resgate foi composto pela combinação do 3TC/TDF, provavelmente devido o efeito residual característico dos ITRN. O DRV como recomendado pelo Ministério da Saúde foi o IP mais utilizado, pois é um medicamento utilizado após falha a outros IPs, devido a sua alta barreira genética. Os grupos R5semMQV e X4 passaram a utilizar medicamento de novas classes, sendo o raltegravir o principal ARV escolhido. No entanto, o grupo R5MQV já havia

utilizado um medicamento de novas classes, pois o comitê de medicamentos de alto custo recomendava o uso prévio do T20 ao antagonista de CCR5. Isto sugere que o MQV foi utilizado em pacientes com doença mais avançada, que apresentavam maiores limitações nas opções terapêuticas.

O maraviroque foi prescrito pelos médicos como parte do esquema terapêutico de resgate em 39% (16/41) dos pacientes que receberam o laudo de tropismo R5. É importante notar que essa prescrição não dependeu apenas de uma escolha por parte do médico, pois a prescrição do antagonista de CCR5 exige aprovação pelo comitê estadual de drogas de alto custo e, portanto é necessário um esforço do médico solicitante em incluir sua utilização. O estudo do grupo de Willing et al., 2012, encontrou uma taxa de prescrição do antagonista de CCR5 de 10%. Os autores observaram através da aplicação de um questionário que os médicos, apesar de dizerem confiar na eficácia do MQV, não prescreveram seu uso. O darunavir, raltegravir e a etravirine foram os medicamentos preferencialmente utilizados.

A resposta virológica após uso de tratamento de resgate demonstrou que o grupo R5MQV apresentou a melhor taxa de sucesso quando comparado com o grupo X4, mas sem significância estatística para o grupo R5semMQV. No entanto, está comparação se evidencia quando excluimos deste grupo os pacientes que apresentaram sucesso virológico por um curto período de tempo ($p=0,06$).

A pontuação do esquema de drogas (GSS) está relacionada com o sucesso do tratamento. Neste estudo, o GSS do grupo X4 foi o menor, isto pode ter contribuído pela pior resposta ao tratamento, indicando que este grupo apresentava poucas opções terapêuticas. Os pacientes já haviam utilizados diversos ARVs, inclusive medicamentos de nova geração (etravirina, darunavir) e de novas classes (raltegravir), que acabam sendo utilizados na prática como monoterapia funcional. Outro aspecto que devemos destacar é que a infecção causada pela variante X4 é teoricamente mais agressiva e com maior risco de progressão da doença.

No entanto, a pontuação do GSS dos grupos com tropismo R5MQV (2,75) e R5semMQV (2,38) não apresentou diferença. Mas, quando retirado o MQV (GSS=1) da análise, o grupo que fez uso do antagonista de CCR5 ficou com

pontuação semelhante ao grupo X4 (2,0), que alcançou a menor taxa de sucesso virológico. Isso sugere que a utilização do MQV trouxe algum benefício para o sucesso do tratamento documentado nesses pacientes.

A adesão ao tratamento é um dos fatores principais para a obtenção do sucesso virológico. Observou-se que os pacientes do grupo R5MQV apresentaram boa adesão, que pode ser devido à facilidade da composição do esquema de tratamento, ou pela conscientização destes pacientes na importância da adesão ao tratamento. Os pacientes do grupo R5semQMV, que apresentaram sucesso virológico por um determinado período utilizavam o T20, o qual pode apresentar problemas de adesão por ser de via injetável, e consequentemente reações adversas locais, como dor.

O MQV além da sua ação na supressão virológica também apresentou, nos ensaios clínicos para sua aprovação, boa resposta imunológica. Desde então, o impacto do MQV na reconstituição imune dos pacientes tem sido frequentemente relatado, porém os mecanismos responsáveis por este fenômeno não são totalmente esclarecidos. Sugere-se que o bloqueio do correceptor de CCR5 induza a inibição da apoptose e a diminuição da ativação imune, o que explicaria o aumento de células T CD4 encontrada pelos pacientes. (Cassarín et al., 2012; Genebat et al., 2010; Wilkin et al., 2010, Pulido et al., 2012).

Neste estudo, devido à heterogeneidade e tamanho amostral da população avaliada e por ser um estudo retrospectivo, os pacientes apresentavam as contagens de células T CD4 em tempos distintos. Este conjunto de fatores limita a comparação do benefício imunológico entre os grupos. Portanto, a fim de facilitar a análise, e como sugerido pelo grupo de Rosetti et al., 2013 foi avaliado o aumento de 100 células/mm³ de sangue em relação ao *baseline*.

Neste contexto, a maioria dos pacientes avaliados (75%) apresentou benefício imunológico, em especial os pacientes do grupo R5MQV. Este subgrupo apresentou a pior situação imunológica dentre todos, refletido pelo baixo valor do CD4 de nadir entre os grupos. O nadir CD4 (o menor valor de células TCD4 documentado em cada paciente) está relacionado com a capacidade de reconstituição imune, e quanto mais baixo esse nadir mais difícil

à recuperação do número de células T CD4. Contudo, mesmo em pior situação imunológica, esse subgrupo de pacientes apresentou um maior número de casos que aumentaram mais de 100 células/mm³, embora a diferença não tenha alcançado significância estatística.

Uma importante limitação das análises decorre do número pequeno de casos, associado a importante heterogeneidade na composição dos esquemas de tratamentos prévios e aqueles utilizados no resgate dessa população. Os pacientes incluídos no estudo não foram randomizados, e todos com dados disponíveis foram analisados, o que representa diferentes perfis imunológicos, de tratamento, entre outras heterogeneidades. Embora tenhamos observado uma tendência, não significativa, de maior benefício entre os que utilizaram MQV, outros estudos como demonstrado pelo grupo de Wilkin et al., 2012, não encontraram essa associação, e o uso do antagonista de CCR5 não foi relacionado com sucesso imunológico. Contudo, o alvo deste estudo eram pacientes imunologicamente distintos, ou seja, que não apresentavam recuperação imune mesmo após 6 meses de carga viral indetectável. Outro fator que pode influenciar na resposta imunológica observada são os diferentes ARVs utilizados na terapia otimizada concomitante ao MQV, onde a terapia de resgate contempla outros medicamentos como raltegravir, etravirine, enfuvirtide e darunavir, que podem influenciar na resposta imunológica, sendo importante notar que os estudos Motivate e Merit, que demonstraram o benefício imunológico com uso do MQV, não utilizavam esses ARVs (Antoniu et al., 2012).

Outro ponto a ressaltar é o fato que os pacientes sem benefício imunológico apresentavam contagem de células T CD4 inferiores a 300 células/mm³, como os três pacientes do grupo R5MQV inferiores a 200 células/mm³, talvez estes pacientes possam estar com o sistema imune muito comprometido para apresentarem um ganho expressivo de CD4, como descrito em parte pelo grupo de Wilkin et al., 2012. Portanto, muitas questões devem ser consideradas a fim de avaliar o benefício imunológico dos pacientes, principalmente o uso deste com outros medicamentos, o CD4 nadir desses pacientes, o CD4 no início da terapia de resgate, entre outros aspectos ainda

pouco claros, mas que podem potencialmente influenciar na resposta ao tratamento.

Considerando as limitações de nosso estudo, nossas análises sugerem que o MQV seja um ARV potencialmente útil para contribuir na terapia combinada, capaz de ser utilizado, e eficaz em esquemas terapêuticos de resgate tardios. Porém, devido seu uso ser indicado somente em infecção por HIV R5-trópicos seria interessante considerar sua utilização em momentos mais precoces da infecção, antes da ocorrência de variantes X4, que emergem em metade de pacientes com doença avançada.

Contudo, muitas questões estão envolvidas na limitação do seu uso, como preço desse e outros medicamentos de segunda linha, e a necessidade de um teste para sua prescrição. Podemos considerar a necessidade de um teste específico como um fator limitante para seu uso, se levarmos em conta que o raltegravir é preferencialmente utilizado nos esquemas terapêuticos de resgate, e para sua prescrição não é necessário um teste específico. É importante notar também que o uso de outras medicações de segunda linha, como o DRV e ETV também necessitam de um teste para seu uso, nesse caso um teste de resistência com perfil de mutações que aponte a necessidade do uso dessas medicações, o qual é rotineiramente realizado no momento da falha ao tratamento. Embora o teste de tropismo seja um teste relativamente novo, seu uso crescente pode trazer a necessária familiaridade com o teste e um uso mais frequente dessa e outros ARVs desta classe que venham a ser desenvolvidas.

,

6. Conclusão

A comparação do ensaio desenvolvido em nosso serviço e o teste fenotípico certificado pelo CLIA demonstrou importante concordância, sendo que a análise em mais de uma ferramenta de interpretação genotípica melhora a predição do tropismo;

O MQV foi pouco utilizado como parte do esquema terapêutico de resgate dos pacientes testados no Laboratório de Retrovírus do IAL;

O grupo dos pacientes R5 que utilizou o MQV apresentou melhor taxa de sucesso virológico e aparentemente melhor benefício imunológico do que os outros grupos;

O sucesso virológico dos pacientes que utilizaram MQV juntamente com terapia otimizada de baixa pontuação de drogas ativas (GSS) sugere que o ensaio de tropismo realizado no laboratório de Retrovírus do IAL é adequado para excluir a presença de variantes X4.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alkhatib, G. The biology of CCR5 and CXCR4. **Curr Opin HIV AIDS**. 2009; 4(2): 96-103.

Alkhatib, G.; Combadiere, C.; Broder, C.C.; Feng, Y.; Kennedy, P.E.; Murphy, P.M.; Berger, E.A. CC CKR5: a RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1. **Science**. 1996; 272(5270):1955-8.

Allen, S.J.; Crown, S.E.; Handel, T.M.; Chemokine: receptor structure, interactions, and antagonism. **Annu Rev Immunol**. 2007; 25: 787–820.

Archer, J.; Braverman, M.S.; Taillon, B.E.; Desany, B.; James, I.; Harrigan, P.R.; Lewis, M.; Robertson, D.L. Detection of low-frequency pretherapy chemokine (CXC motif) receptor 4 (CXCR4)-using HIV-1 with ultra-deep pyrosequencing. **AIDS**. 2009; 23(10): 1209-18.

Antoniou, T.; Smith, G.; Su, D.; Raboud, J.M.; Lee, D.; Kovacs, C.; Brunetta, J.; Fletcher, D.; Crouzat, F.; Loutfy, M. Immunologic effectiveness of maraviroc- and raltegravir-containing regimens (R+M+) versus raltegravir-based regimens that do not include maraviroc (R+M-). **J Int Assoc Physicians AIDS Care**. 2012; 11(3):192-7.

Bastos, F. I. Taxas de infecção de HIV e sífilis e inventário de conhecimento, atitudes e práticas de risco relacionadas às infecções sexualmente transmissíveis entre usuários de drogas em 10 municípios brasileiros. Relatório técnico entregue ao Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais, 2009.

Berger, E.A.; Doms, R.W.; Fenyo, E.M.; Korber, T.M.; Littman, D.R.; Moore, J.P.; Sattentau, Q. J.; Schuitemaker, H.; Sodroski, J.; Weiss, R. A. A new classification for HIV-1. **Nature**. 1998; 391(6664): 240.

Berger, E.A.; Murphy, P.M.; Farber, J.M. Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. **Annu Rev Immunol.** 1999; 17:657–700.

Boletim Epidemiológico–AIDS/DST. Ministério da Saúde - Secretaria de Vigilância em Saúde - Programa Nacional de DST e AIDS, ano IX,nº1, 2012.

Bowerman, B.; Brown, P.O.; Bishop, J.M; Varmus, H.E. A nucleoprotein complex mediates the integration of retroviral DNA. **Genes Dev.** 1989; 3:469-478.

Briz, V.; García, D.; Méndez-Lagares, G.; Ruiz-Mateos, E.; de Mulder, M.; Moreno-Pérez, D.; Navarro, M.L.; León-Leal, J.A.; de José, M.I.; Ramos, J.T.; Mellado, M.J.; González-Tomé, M.I.; Leal, M.; Muñoz-Fernández, M.A. High prevalence of X4/DM-tropic variants in children and adolescents infected with HIV-1 by vertical transmission. **Pediatr Infect Dis J.** 2012; 31(10): 1048-52.

Briz, V.; Poveda, E.; Soriano, V. HIV entry inhibitors: mechanisms of action and resistance pathways. **J Antimicrob Chemother.** 2006; 57(4): 619-27.

Cabral, G.B.; Ferreira, J.L.; Coelho, L.P.; Fonsi, M.; Estevam, D.L.; Cavalcanti, J.S.; Brigido, L.F. Concordance of HIV type 1 tropism phenotype to predictions using web-based analysis of V3 sequences: composite algorithms may be needed to properly assess viral tropism. **AIDS Res Hum Retroviruses.** 2012; 28(7): 734-8.

Campbell, E.M.; Hope, T.J. Live cell imaging of the HIV-1 life cycle. **Trends in Microbiology.** 2008; 16(12): 580-7.

Charneau, P.; Borman, A.M.; Quillent, C.; Guétard, D.; Chamaret, S.; Cohen, J.; Rémy, G.; Montagnier, L.; Clavel, F. Isolation and envelope sequence of a highly divergent HIV-1 isolate: definition of a new HIV-1 group. **Virology.** 1994; 205(1):247-53.

Chueca, N.; Garrido, C.; Alvarez, M.; Poveda, E.; de Dios Luna, J.; Zahonero, N.; Hernández-Quero, J.; Soriano, V.; Maroto, C.; de Mendoza, C.; García F. Improvement in the determination of HIV-1 tropism using the V3 gene sequence and a combination of bioinformatic tools. **J Med Virol.** 2009; 81(5): 763-7.

Clapham, P. R.; McKnight, A. Cell surface receptors, virus entry and tropism of primate lentiviruses. **J Gen Virol.** 2002; 83:1809–29.

Connor, R.I.; Sheridan, K. E.; Ceradini, D.; Choe S.; Landau N.R. Change in Coreceptor Use Correlates with Disease Progression in HIV-1 Infected Individuals. **J Exp Med.** 1997; 185: 621-8.

Cooper, D.A.; Heera, J.; Goodrich, J.; Tawadrous, M.; Saag, M.; Dejesus, E.; Clumeck, N.; Walmsley, S.; Ting, N.; Coakley, E.; Reeves, J.D.; Reyes-Teran, G.; Westby, M.; Van Der Ryst, E.; Ive, P.; Mohapi, L.; Mingrone, H.; Horban, A.; Hackman, F.; Sullivan, J.; Mayer, H. Maraviroc versus efavirenz, both in combination with zidovudine-lamivudine, for the treatment of antiretroviral-naive subjects with CCR5-tropic HIV-1 infection. **J Infect Dis.** 2010; 201(6): 803-13.

Cossarini, F.; Galli, A.; Galli, L.; Bigolomi, A.; Salpietro, S.; Vinci, C.; Torre, L.D.; Gianotti, N.; Spagnuolo, V.; Lazzarin, A.; Castagna A.; Nozza, S. Immune recovery and T cell subset analysis during effective treatment with maraviroc. **JAC.** 2012; 67: 2474-2478.

De Jong, J.J.; De Ronde, A.; Keulen, W.; Tersmette, M.; Goudsmit, J. Minimal requirements for the human immunodeficiency virus type 1 V3 domain to support the syncytium-inducing phenotype: analysis by single amino acid substitution. **J Virol.** 1992; 66(11): p. 6777-80.

de Roda Husman, A.M.; Koot, M.; Cornelissen, M.; Keet, I.P.; Brouwer, M.; Broersen, S.M.; Bakker, M.; Roos, M.T.; Prins, M.; de Wolf, F.; Coutinho, R.A.; Miedema, F.; Goudsmit, J.; Schuitemaker, H. Association between CCR5

genotype and the clinical course of HIV-1 infection. **Ann Intern Med.** 1997; 127(10): 882-90.

Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais/SVS/MS - http://www.aids.gov.br/sites/default/files/anexos/page/2010/36364/aids_no_brasil_2012_17137.pdf. Acesso em 10 de novembro de 2013.

D'Souza, M. P.; Harden, V.A. Chemokines and HIV-1 second receptors. Confluence of two fields generates optimism in AIDS research. **Nature Med.** 1996; 12: 1293-300.

Fätkenheuer, G.; Nelson, M.; Lazzarin, A.; Konourina, I.; Hoepelman, A.I.; Lampiris, H.; Hirschel, B.; Tebas, P.; Raffi, F.; Trottier, B.; Bellos, N.; Saag, M.; Cooper, D.A.; Westby, M.; Tawadrous, M.; Sullivan, J.F.; Ridgway, C.; Dunne, M.W.; Felstead, S.; Mayer, H.; van der Ryst, E. Subgroup analyses of maraviroc in previously treated R5 HIV-1 infection. **N Engl J Med.** 2008; 359(14): 1442-55.

Fätkenheuer, G.; Pozniak, A.L.; Johnson, M.A.; Plettenberg, A.; Staszewski, S.; Hoepelman, A.I.; Saag, M.S.; Goebel, F.D.; Rockstroh, J.K.; Dezube, B.J.; Jenkins, T.M.; Medhurst, C.; Sullivan, J.F.; Ridgway, C.; Abel, S.; James, I.T.; Youle, M.; van der Ryst, E. Efficacy of short-term monotherapy with maraviroc, a new CCR5 antagonist, in patients infected with HIV-1. **Nat Med.** 2005; 11: 1170-2.

Fouchier, R.A.M.; Meyaard, L.; Brouwer, M.; Hovenkamp, E.; Schuitemaker, H. Broader tropism and higher cytopathicity for CD4+ T cells of a syncytium-inducing compared to a nonsyncytium-inducing HIV-1 isolate as a mechanism for accelerated CD4(b) T cell decline in vivo. **Virology**, 1996; 219: 87-95.

Frankel, A. D.; Young, J. A. T. HIV-1: Fifteen Proteins and an RNA **Annu Rev Biochem.** 1998; 67: 1–25.

Garrido, C.; Roulet, V.; Chueca, N.; Poveda, E.; Aguilera, A.; Skrabal, K.; Zahonero, N.; Carlos, S.; García, F.; Faudon, J.L.; Soriano, V.; de Mendoza, C. Evaluation of eight different bioinformatics tools to predict viral tropism in different human immunodeficiency virus type 1 subtypes. **J Clin Microbiol.** 2008; 46(3): 887-91.

Gelderblom, H.R.; Hausmann, E.H.; Ozel, M.; Pauli, G.; Koch, M.A. Fine structure of human immunodeficiency virus (HIV) and immunolocalization of structural proteins. **Virology.** 1987; 156 (1): 171-6.

Genebat, M.; Ruiz-Mateos, E.; Pulido, I.; González-Serna, A.; García-Pergañeda, A.; Méndez, G.; Romero-Sánchez, M.C.; Ferrando-Martínez, S.; Leal, M. Long-term immunovirological effect and tolerability of a maraviroc-containing regimen in routine clinical practice. **Curr HIV Res.** 2010; 8(6):482-6.

Gilliam, B.L.; Riedel, J.D.; Redfield, R. R. Clinical use of CCR5 inhibitors in HIV and beyond. **J Transl Med.** 2011; 9.

Goetz, M.B.; Leduc, R.; Kostman, J.R.; Labriola, A.M.; Lie, Y.; Weidler, J.; Coakley, E.; Bates, M.; Luskin-Hawk, R. Relationship between HIV coreceptor tropism and disease progression in persons with untreated chronic HIV infection. **J Acquir Immune Defic Syndr,** 2009; 50(3): 259-66.

Göttlinger, H.G.; Dorfman, T.; Sodroski, J.G.; Haseltine, W.A. Effect of mutations affecting the p6 gag protein on human immunodeficiency virus particle release. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 1991; 88(8): 3195-9.

Gulick, R.M.; Lalezari, J.; Goodrich, J.; Clumeck, N.; DeJesus, E.; Horban, A.; Nadler, J.; Clotet, B.; Karlsson, A.; Wohlfeiler, M.; Montana, J.B.; McHale, M.; Sullivan, J.; Ridgway, C.; Felstead, S.; Dunne, M.W.; van der Ryst, E.; Mayer, H. Maraviroc for previously treated patients with R5 HIV-1 infection. **N Engl J Med.** 2008; 359(14): 1429-41.

Hahn, B.H.; Shaw, G.M.; De Cock, K.M.; Sharp, P.M. AIDS as a zoonosis: scientific and public health implications. **Science**. 2000; 287: 607-14.

Huang, Y.; Paxton, W.A.; Wolinsky, S.M.; Neumann, A.U.; Zhang, L.; He, T.; Kang, S.; Ceradini, D.; Jin, Z.; Yazdanbakhsh, K.; Kunstman, K.; Erickson, D.; Dragon, E.; Landau, N.R.; Phair, J.; Ho, D.D.; Koup, R.A. The role of a mutant CCR5 allele in HIV-1 transmission and disease progression. **Nat Med**. 1996; 2(11): 1240-3.

Levy, J.A.; HIV e a patogenia da Aids. Editora Unifesp, 2010. Cap. 14, 363-380

Jensen, M.A.; Li, F.; van 't Wout, A.B.; Nickle, D.C.; Shriner, D.; He, H.; McLaughlin, S.; Shankarappa, R.; Margolick, J.B.; Mullins, J.I. Improved Coreceptor Usage Prediction and Genotypic Monitoring of R5-to-X4 Transition by Motif Analysis of Human Immunodeficiency Virus Type 1 env V3 Loop Sequences. **J Virol**. 2003; 77(24): 13376–13388.

KERR, L. Comportamento, atitudes, práticas e prevalência de HIV e sífilis entre homens que fazem sexo com homens (HSH) em 10 cidades brasileiras. Relatório técnico entregue ao Departamento de DST, AIDS e Hepatites Virais, 2009.

Klatzmann, D.; Champagne, E.; Chamaret, S.; Gruest, J.; Guetard, D.; Hercend, T.; Gluckman, J.C.; Montagnier, L. T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV. **Nature**. 1984; 312: 767-8.

Knapp, D.J.; McGovern, R.A.; Dong, W.; Poon, A.F.; Swenson, L.C.; Zhong, X.; Woods, C.K.; Harrigan, P.R. Factors influencing the sensitivity and specificity of conventional sequencing in human immunodeficiency virus type 1 tropism testing. **J Clin Microbiol**. 2013; 51(2): 444-51.

Koot, M.; van 't Wout, A.B.; Kootstra, N.A.; Goede, R.E.Y.; Tersmette, M.; Schuitemaker, H. Relation between Changes in Cellular Load, Evolution of Viral

Phenotype, and the Clonal Composition of Virus Populations in the Course of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection. **J Infect Dis.** 1996; 173: 349-54.

Korber, B.; Muldoon, M.; Theiler, J., Gao, F.; Gupta R.; Lapedes, A.; Hahn, B.H.; Wolinsky, S.; Bhattacharya, T. Timing the ancestor of the HIV-1 pandemic strains. **Science.** 2000; 288: 1789– 96.

Korber, B.T.; Farber, R.M.; Wolpert, D.H.; Lapedes, A.S. Covariation of mutations in the V3 loop of human immunodeficiency virus type 1 envelope protein: an information theoretic analysis. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 1993; 90(15): 7176-80.

Lee, B.; Sharron, M.; Montaner, L.J.; Weissman, D.; Doms, R.W. Quantification of CD4, CCR5, and CXCR4 levels on lymphocyte subsets, dendritic cells, and differentially conditioned monocyte-derived macrophages. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 1999; 96: 5215-20.

Lengauer, T.; Sander, O.; Sierra, S.; Thielen, A.; Kaiser, R. Bioinformatics prediction of HIV coreceptor usage. **Nat Biotechnol.** 2007; 25(12): 1407-10.

Liu, R.; Paxton, W.A.; Choe, S.; Ceradini, D.; Martin, S.R.; Horuk, R.; MacDonald, M.E.; Stuhlmann, H.; Koup, R.A.; Landau, N.R. Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. **Cell.** 1996; 86: 367-77.

Low, A.J.; Dong, W.; Chan, D.; Sing, T.; Swanstrom, R.; Jensen, M.; Pillai, S.; Good, B.; Harrigan, P.R. Current V3 genotyping algorithms are inadequate for predicting X4 co-receptor usage in clinical isolates. **AIDS.** 2007; 21(14): F17-24.

MacArthur, R.D.; Novak, R.M. Reviews of anti-infective agents: maraviroc: the first of a new class of antiretroviral agents. **Clin Infect Dis.** 2008; 47(2): 236-41.

Marciniak, R. A.; Cainan, B. J.; Frankel, A. D.; Sharp, P. A. HIV tat protein trans-activates transcription in vitro. **Cell**. 1990; 63: 791-802.

McCune, J. M.; Rabin, B. Linda; Feinberg, M.B.; Lieberman, M.; Kosek, J.C.; Reyes, G. R.; Weissman, I.L. Endoproteolytic Cleavage of gp160 Is Required for the Activation of Human Immunodeficiency Virus. **Cell**. 1988; 53: 55-67.

McGovern, R.A.; Thielen, A.; Mo, T.; Dong, W.; Woods, C.K.; Chapman, D.; Lewis, M.; James, I.; Heera, J.; Valdez, H.; Harrigan, P.R. Population-based V3 genotypic tropism assay: a retrospective analysis using screening samples from the A4001029 and MOTIVATE studies. **AIDS**. 2010; 24(16): 2517-25.

Ministério da Saúde/SVS/PN-DSTAIDS. **PROTOCOLO CLÍNICO E DIRETRIZES TERAPÊUTICAS PARA ADULTOS VIVENDO COM HIV/AIDS**. Brasília, 2013

Miranda, A.S.; Avila, C.M.; da Silva, F.C.; Lopes, R.O. Maraviroque: uma inovação terapêutica para o tratamento da AIDS. **Ver Virtual Quim**. 2010; 2(2): 130-139.

Moore, J.P.; Kuritzkes, D.R. A pièce de resistance: how HIV-1 escapes small molecule CCR5 inhibitors. **Curr Opin HIV AIDS**. 2009; 4(2): 118–24.

Nota técnica nº 172_2013. Ministério da Saúde.
<http://www.aids.gov.br/legislacao/2013/54311>.

O'Brien, W. A.; Koyanagi, A.; Namazie, J.; Zhoa, A.; Diagne, K.; Idler, J. A.; Zack; Chen, I. S. Y. HIV-1 tropism for mononuclear phagocytes can be determined by regions of gp120 outside the CD4-binding domain. **Nature**, 1990; 348: 69-73.

Orloff, G.M.; Orloff, S.L.; Kennedy, M.S.; Maddon, P.J.; McDougal, J.S. Penetration of CD4 T cells by HIV-1. The CD4 receptor does not internalize with

HIV, and CD4-related signal transduction events are not required for entry. **J. Immunol.** 1991; 146 (8): 2578-87.

Panganiban, A.T.; Fiore, D. Ordered interstrand and intrastrand DNA transfer during reverse transcription. **Science.** 1988; 241:1064-9.

Parra, J.; Portilla, J.; Pulido, F.; Sánchez-de la Rosa, R.; Alonso-Villaverde, C.; Berenguer, J.; Blanco, J.L.; Domingo, P.; Dronda, F.; Galera, C.; Gutiérrez, F.; Kindelán, J.M.; Knobel, H.; Leal, M.; López-Aldeguer, J.; Mariño, A.; Miralles, C.; Moltó, J.; Ortega, E.; Oteo, J.A. Clinical utility of maraviroc. **Clin Drug Investig.** 2011; 31(8): 527-42.

Plantier, J. C.; Leoz M.; Dickerson, J. E.; Oliveira, F.; Cordonnier, F.; Leme'e,V.C.; Damond V. F.; Robertson, D. L.; Simon, F. A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. **Nat. Med.** 2009; 15: 871–72.

Political Declaration on HIV and AIDS: Intensifying Our Efforts to Eliminate HIV and AIDS. Geneva, UNAIDS, 2011. http://www.unaids.org/en/media/unaids/contentassets/documents/document/2011/06/20110610_un_a-res-65-277_en.pdf. Acesso em 10 de novembro de 2013.

Prosperi, M.C.; Bracciale, L.; Fabbiani, M.; Di Giambenedetto, S.; Razzolini, F.; Meini, G.; Colafigli, M.; Marzocchetti, A.; Cauda, R.; Zazzi, M.; De Luca A. Comparative determination of HIV-1 co-receptor tropism by Enhanced Sensitivity Trofile, gp120 V3-loop RNA and DNA genotyping. **Retrovirology.** 2010; 7: 56.

Pulido, I.; Machmach, K.; Romero-Sánchez, M.C.; Genebat, M.; Mendez-Lagares, G.; Ruiz-Mateos, E.; Leal, M. T-cell changes after a short-term exposure to maraviroc in HIV-infected patients are related to antiviral activity. **J Infect.** 2012; 64(4): 417-23

Raymond, S.; Delobel, P.; Mavigner, M.; Cazabat, M.; Souyris, C.; Sandres-Sauné, K.; Cuzin, L.; Marchou, B.; Massip, P.; Izopet, J. Correlation between

genotypic predictions based on V3 sequences and phenotypic determination of HIV-1 tropism. **AIDS**. 2008; 22(14): F11-6.

Reeves, J.D.; Coakley, E.; Petropoulos, C.J.; Whitcomb, J.M. An enhanced sensitivity trofile assay. **J Viral Entry**. 2009; 3(3): 94–102.

Rose, J.D.; Rhea, A.M.; Weber, J.; Quiñones-Mateu, M.E. Current tests to evaluate HIV-1 coreceptor tropism. **Curr Opin HIV AIDS**. 2009; 2: 136-42.

Rosseti, B.; Bianco, C.; Bellazzi, L.I.; Bruzzone, B.; Colao, G.; Corsi, P.; Monno, L.; Pagano, G.; Paolucci, S.; Punzi, G.; Setti, M.; Zazzi, M.; De Luca, A. Virological and Immunological response to antiretroviral regimens containing Maraviroc in HIV type 1- infected patients in clinical practice: Role of different tropism testing results and concomitant treatments. **AIDS Res Hum Retroviruses**. 2014; 1: 17-24.

Saag, M.; Goodrich, J.; Fätkenheuer, G.; Clotet, B.; Clumeck, N.; Sullivan, J.; Westby, M.; van der Ryst, E.; Mayer, H. A double-blind, placebo-controlled trial of maraviroc in treatment-experienced patients infected with non-R5 HIV-1. **J Infect Dis**. 2009; 199(11): 1638-47.

Schuitemaker, H.; Kootstra, N.A.; Goede, R.E.; Wolf, F.; Miedema, F.; Tersmette, M. Monocytotropic human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) variants detectable in all stages of HIV-1 infection lack T-cell line tropism and syncytium-inducing ability in primary T-cell culture. **J Virol**. 1991; 65: 356-63.

Schuurman R, Demeter L, Reichelderfer P, Tijnagel J, de Groot T, Boucher C. Worldwide evaluation of DNA sequencing approaches for identification of drug resistance mutations in the human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. **J Clin Microbiol**. 1999; 37(7): 2291-6.

Seclén, E.; Garrido, C.; González Mdel, M.; González-Lahoz, J.; de Mendoza, C.; Soriano, V.; Poveda, E. High sensitivity of specific genotypic tools for detection of

X4 variants in antiretroviral-experienced patients suitable to be treated with CCR5 antagonists. **J Antimicrob Chemother.** 2010; 65(7):1486-92.

Sierra, S.; Kaiser, R.; Thielen, A.; Lengauer, T. Genotypic coreceptor analysis. **Eur J Med Res.** 2007; 12(9): 453-62.

Sing, T.; Low, A.J.; Beerenwinkel, N.; Sander, O.; Cheung, P.K.; Domingues, F.S.; Buch, B.; Daumer, M.; Kaiser, R.; Lengauer, T.; Harrigan, P.R. Predicting HIV coreceptor usage on the basis of genetic and clinical covariates. **Antiviral Therapy.** 2007; (12): 1097-1106.

Svicher, V.; D'Arrigo, R.; Alteri, C.; Andreoni, M.; Angarano, G.; Antinori, A.; Antonelli, G.; Bagnarelli, P.; Baldanti, F.; Bertoli, A.; Borderi, M.; Boeri, E.; Bonn, I.; Bruzzone, B.; Callegaro, A.P.; Cammarota, R.; Canducci, F.; Ceccherini-Silberstein, F.; Clementi, M.; Monforte, A.D.; De Luca, A.; Di Biagio, A.; Di Gianbenedetto, S.; Di Perri, G.; Di Pietro, M.; Fabeni, L.; Fadda, G.; Galli, M.; Gennari, W.; Ghisetti, V.; Giacometti, A.; Gori, A.; Leoncini, F.; Maggiolo, F.; Maserati, R.; Mazzotta, F.; Micheli, V.; Meini, G.; Monno, L.; Mussini, C.; Nozza, S.; Paolucci, S.; Parisi, S.; Pecorari, M.; Pizzi, D.; Quirino, T.; Re, M.C.; Rizzardini, G.; Santangelo, R.; Soria, A.; Stazi, F.; Sterrantino, G.; Turriziani, O.; Viscoli, C.; Vullo, V.; Lazzarin, A.; Perno, C.F. Performance of genotypic tropism testing in clinical practice using the enhanced sensitivity version of Trofile as reference assay: results from the OSCAR Study Group. **New Microbiol.** 2010; 33(3): 195-206.

Swenson, L.C.; Mo, T.; Dong, W.W.; Zhong, X.; Woods, C.K.; Jensen, M.A.; Thielen, A.; Chapman, D.; Lewis, M.; James, I.; Heera, J.; Valdez, H.; Harrigan P.R. Deep Sequencing to Infer HIV-1 Co-Receptor Usage: Application to Three Clinical Trials of Maraviroc in Treatment-Experienced Patients. **J Infect Dis.** 2011; 203(2): 237-45.

Szwarcwald, C. L. Taxas de prevalência de HIV e sífilis e conhecimento, atitudes e práticas de risco relacionadas às infecções sexualmente transmissíveis nos

grupos das mulheres profissionais do sexo, no Brasil. Relatório técnico entregue ao Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais, 2009.

Szwarcwald, C.L, Barbosa, J.A.; Souza-Júnior, P.R.; Lemos, K.R.; Frias, P.G.; Luhm, K.R.; Holcman, M.M.; Esteves MA. HIV testing during pregnancy: use of secondary data to estimate 2006 test coverage and prevalence in Brazil. **Braz J Infect Dis**. 2008; 12(3): 167-72.

Tilton, J.C.; Wilen, C.B.; Didigu, C.A.; Sinha, R.; Harrison, J.E.; Agrawal-Gamse, C.; Henning, E.A.; Bushman, F.D.; Martin, J.N.; Deeks, S.G.; Doms, R.W. A maraviroc-resistant HIV-1 with narrow cross-resistance to other CCR5 antagonists depends on both N-terminal and extracellular loop domains of drug-bound CCR5. **J Virol**. 2010; 20: 10863-76.

Trofile. www.monogrambio.com acesso em 10 de novembro de 2013.

Unaid's Brasil. REVISÃO DE MEIO-TERMO DEZ METAS PARA 2015 DECLARAÇÃO DE COMPROMISSOS SOBRE HIV/A IDS. www.unaids.org.br

UNAIDS insituição política ONU:

<http://www.unaids.org/en/dataanalysis/knowyourresponse/globalaidsprogressreporting/>. Acesso em 10 de outubro de 2013).

UNAIDS Report on the Global AIDS Epidemic 2012.

<http://www.unaids.org/en/resources/publications/2012/name,76121,en.asp>.

(acesso em 10 de novembro de 2013).

UNAIDS. Global results: UNAIDS report on the global AIDS epidemic 2012.

http://www.unaids.org/en/media/unaids/contentassets/documents/epidemiology/2012/gr2012/JC2434_WorldAIDSday_results_en.pdf. (acesso em 10 de novembro

de 2013)

Viivhealthcare.<http://www.viivhealthcare.com.au/~media/Files/V/Viiv-Microsite-AU/documents/consumer-medicine-information/Celsentri%20Consumer%20Medicine%20Information.pdf> (acesso em 15/02/2014).

Vandekerckhove, L.P.; Wensing, A.M.; Kaiser, R.; Brun-Vézinet, F.; Clotet, B.; De Luca, A.; Dressler, S.; Garcia, F.; Geretti, A.M.; Klimkait, T.; Korn, K.; Masquelier, B.; Perno, C.F.; Schapiro, J.M.; Soriano, V.; Sönnnerborg, A.; Vandamme, A.M.; Verhofstede, C.; Walter, H.; Zazzi, M.; Boucher, C.A. European Consensus Group on clinical management of tropism testing. **Lancet Infect Dis**. 2011; 11(5): 394-407.

Varmus, H.E.; Swanstrom, R. Replication of retroviruses. In **RNA Tumor Viruses**. 1985: 75-134.

Verhofstede, C.; Nijhuis, M.; Vandekerckhove, L. Correlation of coreceptor usage and disease progression. **Curr Opin HIV AIDS**. 2012; 7: 432– 39.

Viola, A.; Luster, A.D. Chemokines and their receptors: drug targets in immunity and inflammation. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, 2008; 48: 171–97.

Westby, M.; Smith-Burchnell, C.; Mori, J.; Lewis, M.; Mosley, M.; Stockdale, M.; Dorr, P.; Ciaramella, G.; Perros, M. Reduced maximal inhibition in phenotypic susceptibility assays indicates that viral strains resistant to the CCR5 antagonist maraviroc utilize inhibitor-bound receptor for entry. **J. Virol**. 2007; 81: 2359–71.

Westby, M.; Ryst, V.D.E. CCR5 antagonists: host-targeted antivirals for the treatment of HIV infection. **Antiviral Chemistry & Chemotherapy**. 2005; 16: 339-54.

Westrop, S.J.; Moyle, G.; Jackson, A.; Nelson, M.; Mandalia, S.; Imami, N. CCR5 antagonism impacts vaccination response and immune profile in HIV-1 infection. **Mol Med**. 2012; 18: 1240-8.

Wilkin, T.J.; Lalama, C.M.; McKinnon, J.; Gandhi, R.T.; Lin, N.; Landay, A.; Ribaldo, H.; Fox, L.; Currier, J.S.; Mellors, J.W.; Gulick, R.; Tenorio, A.R. A pilot trial of adding maraviroc to suppressive antiretroviral therapy for suboptimal CD4⁺ T-cell recovery despite sustained virologic suppression: ACTG A5256. **J Infect Dis.** 2012; 15: 206(4): 534-42.

Wilkin, T.J.; Ribaldo, H.R.; Tenorio, A.R.; Gulick, R.M. The relationship of CCR5 antagonists to CD4⁺ T-cell gain: a meta-regression of recent clinical trials in treatment-experienced HIV-infected patients. **HIV Clin Trials.** 2010; 11(6):351-8.

Whitcomb, J.M.; Huang, W.; Fransen, S.; Limoli, K.; Toma, J.; Wrin, T.; Chappey, C.; Kiss, L.D.; Paxinos, E.E.; Petropoulos, C.J. Development and Characterization of a Novel Single-Cycle Recombinant-Virus Assay To Determine Human Immunodeficiency Virus Type 1 Coreceptor Tropism. **Antimicrobial agents and chemotherapy.** 2007; 50: 566–75.

Whitcomb, J.M.; Hughes, S.H. Retroviral reverse transcription and integration: Progress and problems. **Annu Rev Cell Bio.** 1992; 8: 275-306.

WHO. UNAIDS GLOBAL UPDATE ON HIV TREATMENT 2013: RESULTS, IMPACT AND OPPORTUNITIES, 2013.

http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/85326/1/9789241505734_eng.pdf.

Wilkin, T.J.; Lalama, C.M.; McKinnon, J.; Gandhi, R.T.; Lin, N.; Landay, A.; Ribaldo, H.; Fox, L.; Currier, J.S.; Mellors, J.W.; Gulick, R.; Tenorio, A.R. A Pilot Trial of Adding Maraviroc to Suppressive Antiretroviral Therapy for Suboptimal CD4⁺ T-Cell Recovery Despite Sustained Virologic Suppression: ACTG A5256. **J Infect Dis.** 2012; 206: 534–42.

Willing, J.H.; Wilkins, S.; Tamhane, A.; Nevin, C.R.; Mugavero, M.J.; Raper, J.L.; Napolitano, A.L.; Saag, M. S. Maraviroc Observational Study: The impact of expanded resistance testing and clinical considerations for antiretroviral regimen

selection in treatment-Experienced patients. **Aids Research and human retroviruses.** 2013; 1: 105-11.



SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENADORIA DE CONTROLE DE DOENÇAS
INSTITUTO ADOLFO LUTZ

Comitê de Ética em Pesquisa - CEPIAL

Av. Dr. Arnaldo, 355 – Sala 83 - Cerqueira César - 01246-902

Fone: 3068-2859 e-mail: cepi@ial.sp.gov.br



São Paulo, 17 de março de 2011.

Protocolo: 018/2011

Projeto de Pesquisa: “Resistência genotípica no resgate terapêutico de pacientes infectados pelo HIV com novas classes de antirretrovirais”.

Pesquisador Responsável: Luís Fernando de Macedo Brígido

Instituição: Instituto Adolfo Lutz

O Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Adolfo Lutz - CEPIAL analisou e deliberou em reunião ordinária de 17 de março de 2011, de acordo com a Resolução CNS nº 196 de 10 de outubro de 1996 e suas resoluções complementares, o projeto na categoria **APROVADO**.

Em conformidade com o item IX. 2 da Resolução CNS nº 196/96 - cabe ao pesquisador: a) desenvolver o projeto conforme delineado; b) elaborar e apresentar os relatórios parciais e final; c) apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; d) manter em arquivo, sob sua guarda, por 5 anos, os dados da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; e) encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; f) justificar, perante o CEP, interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

Os relatórios parciais deverão ser encaminhados ao CEPIAL a cada seis meses a partir do início da pesquisa.

Luz Marina Trujillo

Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos
Instituto Adolfo Lutz – CEPIAL

1ª via – coordenador

2ª via - CEPIAL

LMT/dvmp

Concordance of HIV Type 1 Tropism Phenotype to Predictions Using Web-Based Analysis of V3 Sequences: Composite Algorithms May Be Needed to Properly Assess Viral Tropism

Gabriela Bastos Cabral,¹ João Leandro de Paula Ferreira,¹ Luana Portes Osório Coelho,¹ Mylva Fonsi,² Denise Lotufo Estevam,² Jaqueline Souza Cavalcanti,¹ and Luis Fernando de Macedo Brígido¹

Abstract

Genotypic prediction of HIV-1 tropism has been considered a practical surrogate for phenotypic tests and recently an European Consensus has set up recommendations for its use in clinical practice. Twenty-five anti-retroviral-experienced patients, all heavily treated cases with a median of 16 years of antiretroviral therapy, had viral tropism determined by the Trofile assay and predicted by HIV-1 sequencing of partial *env*, followed by interpretation using web-based tools. Trofile determined 17/24 (71%) as X4 tropic or dual/mixed viruses, with one nonreportable result. The use of European consensus recommendations for single sequences (geno2pheno false-positive rates 20% cutoff) would lead to 4/24 (16.7%) misclassifications, whereas a composite algorithm misclassified 1/24 (4%). The use of the geno2pheno clinical option using CD4 T cell counts at collection was useful in resolving some discrepancies. Applying the European recommendations followed by additional web-based tools for cases around the recommended cutoff would resolve most misclassifications.

DETERMINATION OF VIRAL TROPISM is a necessary step prior to the use of CCR5 antagonists and may provide clues in HIV pathogenesis. Genotypic assays are interesting alternatives to phenotypic assays, and although different interpretations of genetic data have been suggested, this issue is still unresolved. Recently a European consensus proposed the use of genotypic data. They suggested the use of the geno2pheno clonal option, with a false-positive rate (FPR) of 20%, to predict tropism on a single population genome and a 10% cutoff is recommended to predict tropism based on replicates.¹

The evaluation of the concordance of phenotype determination of HIV-1 coreceptor usage to genotypic prediction has been an objective of different studies.²⁻⁶ The sensibility and specificity of genotype prediction are influenced by different factors including viral subtype and the prevalence of CXCR4 using variants in the population assessed.^{2,7,8} Among phenotypic assays, the Trofile is a reference. It is the only Clinical Laboratory Improvement Amendments (CLIA) certified assay, and its upgraded ESTA version has a high performance, with reported sensibility to X4 variants as low as 0.3% (http://www.trofileassay.com/what_is_trofile.html). Some aspects, however, limit its widespread use, including cost, sample

transport logistics, a number of nonassayed samples, the inability to assess cell-associated genomes, and level of viremia necessary to run the assay (1000 copies/ml).

Although the actual correlation of the genotypic prediction with clinical response should be the main objective of these tests, that is, the assays should predict the clinical usefulness of CCR5 antagonists and not just show intraassay comparability; these data are limited and complex to analyze, as therapy success depends on many factors.⁶ Therefore phenotypic assays are still important to validate genotypic predictions. In this study we compare the results of viral tropism as determined by the phenotypic Trofile ESTA assay to different genotypic tools.

Patients with virological failure on antiretroviral therapy, considering CCR5 antagonists as part of salvage therapy, were consecutively included. Two sets of patients were studied, paired samples, with two EDTA tubes obtained at the same blood drawn, at the clinical site and some additional unpaired cases, in which blood collection for the genotype assay was done before Trofile collection. Informed consent was obtained from all volunteers. V3 sequences were obtained with a nested PCR of the partial *env* genome as previously

¹Adolfo Lutz Institute, Virology Center, Retrovirus Laboratory, São Paulo, Brazil.

²Centro de Referência de Aids, São Paulo, Brazil.

described from bulk virion RNA ($n=19$) or cell DNA ($n=8$, samples 6, 7, 18, 19, 20, 21, 22, and 23).⁹ The V3 region was directly sequenced from PCR products in both directions. Fasta contigs were generated from two to four primers, with manual editing by Sequencher 4.6 software, considering nucleotide ambiguities (accession number JN 541241-65). The V3 sequence harboring nucleotide ambiguities was translated in all possible amino acids. Sequences with three or more amino acid mixtures due to nonsynonymous nucleotide ambiguities within the V3 region were not submitted to PSSM and net charge analyses. HIV-1 subtyping of partial *env* sequence was performed at NCBI and Rega websites.

The V3 sequences were interpreted according to different genotypic tropism predictions, including the 11/25 rule, which is based on the presence of arginine, histidine, or lysine at positions 11 or 25 of the V3 loop and two bioinformatics methods, PSSM (<http://ubik.microbiol.washington.edu/computing/pssm>), X4/R5 option, that analyze the composition and position of amino acids at the V3 sequence, generating a score concerning the likelihood of using the CXCR4 coreceptor and the Geno2pheno coreceptor (<http://coreceptor.bioinf.mpi-sb.mpg.de/cgi-bin/coreceptor.pl>), a statistical method based on the sequences FPRs, the likelihood of a sequence being mistakenly classified as a CXCR4.^{10,11}

Sequences FPR were obtained using both clonal and clinical options, the latter using recommended nadir CD4 T cell (TCD4) counts and also TCD4 at time of collection, along with viral load; cell counted with flow cytometry (BD, USA) and viral RNA with and B-DNA (Siemens, USA).

Tests were run blind to the other results, and both were delivered to a reference physician who could use either information to subsidize clinical management. Reports from Trofile were reported as R5, X4, or dual/mixed tropism. Our report to clinicians designated the predicted tropism as R5, X4, or possible X4, using a composite rule. Trofile results were reported as R5-tropic, X4, and dual/mixed-tropic. In this study we dichotomized the cases as X4 (including dual/mixed and possible X4) or R5.

A total of 25 patients were included in this study, mostly (76%) males, with a median age of 39 years. All patients were in virological failure under antiretroviral therapy, with a median TCD4 of 218 cells/mm³ and viral load of 10,000 copies/ml. Study cases consisted mostly of heavily treated patients, treated for a median of 16 years, having lived with HIV for a long time. The majority had a clade B envelope, with

one case clade F (Sample 21). Samples were collected from December 2008 to October 2009 for Trofile tests, with 17 cases of paired and 8 cases of unpaired samples, with collection for genotyping from 2007 to 2009. Table 1 describes patients' demographic and clinical data.

Most HIV-1 infections were of X4-tropic viruses, 17/24 (71%), using the Trofile assay, whereas the IAL criteria showed 16/25 (64%), with one nonreportable case by Trofile. The FPR geno2pheno were obtained in three options—one clonal and two clinical evaluations: (1) using the last TCD4 available at the time of tropism test collection and (2) using nadir TCD4, as recommended. Most cases showed an FPR below 20%: 15/25 (60%), 14/24 (58%), and 13/17 (77%), respectively. It should be noted that the lack of information at collection or the nadir TCD4 did not allow the use of the clinical option for 1/25 (4%) and 8/25 (32%) cases, respectively. According to the "11/25 rule" 10/25 (40%) and at PSSM 9/22 (41%) were classified as X4-tropic viruses. The net charge ranged from 4 to 9. However, three samples (12%) with more than three nonsynonymous amino acid possibilities due to nucleotide ambiguities were not evaluated by PSSM: samples 8, 10, and 19. Table 2 describes individual data of the study cases, with the V3 alignments along with the Trofile result and interpretations of major algorithms. Table 3 compares the Trofile results assuming it to be the gold standard for defining disease (X4 or dual/mixed) or "no disease," involving only the R5 viral populations, to evaluate different determination algorithms. The overall concordance between distinct genotypic tools and ESTA ranged from 50% (Geno2pheno_{10clinicalNadir}) to 95.8% (IAL criterion), with a sensitivity and specificity for the detection of X4 variants using genotypic-based algorithms, as compared to Trofile, varying according to genotypic algorithms. The lower sensitivity was 37.5% Geno2pheno_{10clinicalCollection}. However, the specificity was adequate for many algorithms, including the 11/25 rule, Motivate, Geno2pheno_{10clinicalCollection}, PSSM, and IAL criteria.

The population studied included patients with advanced disease, exposed to multiple ARV regimens that were considering the use of CCR5 antagonists as part of the salvage regimen. Therefore, this should explain the high prevalence of X4 and X4/R5 dual-tropic viruses, when compared with others studies.^{2,7} The study conclusions are limited by the small sample size and the use of a single sequence instead of replicates to predict tropism, but some points are relevant and deserve attention. The fact that the genotypic evaluation was

TABLE 1. CLINICAL AND DEMOGRAPHIC DATA OF PATIENTS INCLUDED IN THE STUDY ACCORDING TO TROFILE

	R5	DM/X4	Total
Age* (years)	45 (41–48)	18 (13–40)	39 (15–45)
Gender (% males)	86	76	76
TCD4* at collection (cells/mm ³)	226 (95–277)	184 (94–372)	218 (94–327)
Nadir TCD4* (cells/mm ³)	37 (17–79)	35 (27–97)	36 (23–108)
Viremia* at collection (log ₁₀ /ml)	3.43 (2.53–4.19)	4.47 (3.59–4.92)	4 (2.98–4.76)
Number of regimens*	8 (7–9)	6 (5–9)	8 (5–9)
Time on ARV* (years)	15 (13–16)	16 (4–17)	16 (13–17)
N (%)	7 (28)	17 (68)	25 ^a (100)

^aOne case of Trofile not reportable, reported as R5 by the IAL rule.

Patient characteristics according to Trofile result, R5 and dual/mixed or X4 tropism, including age at the time of collection, percentage of males, TCD4 counts at collection, and the nadir value, documented throughout follow-up, plasma viremia (viral load) at collection, number of different ARV combinations (regimens) used by the patient and the total time on ARV therapy in years, expressed as medians and 25th–75th IQR percentiles*, and the total number of cases in each group. ARV, antiretroviral.

TABLE 2. PROFILE AND GENOTYPIC TROPISM PREDICTION OF STUDY CASES

Samples	Trofile	IAL criteria	G2F clonal FPR (%)	G2F clinical cFPR (%)	G2F clinical nFPR (%)	Rule 11/25	PSSM	Net charge	V3 sequence
1	R5	R5	44.8	49.1	23.2	R5	R5	5	CTRPNNNTRKSIHMGWGRAFYATGDIIGDIRQAHC
2	D/M	R5	48.4	12.6	12.6	R5	R5	6	CVRPNNNTRKSIHMGWGRAFYATGEIIGNIRQAHC
3	R5	R5	22.3	26.3	8.2	R5	R5	(5-4)	CTRPNNNTRKGIHMGIMVJGRAFYATGEIIGEIRQA[HY]C
4	D/M	X4	4.8	48.4	19	X4	X4	5	CTRPNNNTRKSIPIVSGRILYATGKLGDIRQAYC
5	Not reportable	R5	42.8	62.6	38.2	R5	R5	8	CTRPNNNTRRGIHMGPKAFYATGNIIGNIRKAHC
6	D/M	X4	0.5	0.2	0.1	X4	X4	6	CTRPNNNTRIRGIRIGPGRAVLATERIIGDIRRAHC
7	R5	R5	20.2	19.0	4.9	R5	R5	6	CTRPNNNTRKSVHIGPGSALYTTNIIGNIRRAHC
8	D/M	X4	3.2	11.9	6.8	R5	R5	—	CTRP[x]N[x]TRKSIH[x]G[x]GRAFI[x]x[x]C[x]VIG[x]x[x]x]Q[A]HC
9	R5	R5	93.6	13.4	—	R5	R5	4	CTRLNNNTRRSIQMGWGRAFYATGDIIGDIRLAHC
10	D/M	X4	7.8	71	—	R5	—	—	CARPNNNTRK[S]I[Q]HJM[GW]RGRAFYATGDIIVGDIRQAHC
11	D/M	X4	14.6	14.8	—	R5	R5	4	CERPNNNTRKGIHLGPRAFFATEAIGDIRQAHC
12	R5	R5	84.9	37.4	15.7	R5	R5	6	CTRPNNNTRKGIHMGWGRITLYATGAIIGDIRQAHC
13	D/M	X4	11.4	39.9	11.4	R5	R5	7	CTRPNNNTRKSIHMGAGRAFYTNGQIIGNIRQAHC
14	R5	R5	7.9	85.7	76.4	R5	R5	5	CTRPGNNTRKGIHIGPGRGAFYATDITGDIRQAHC
15	X4	X4	20.8	1.8	1.5	X4	X4	8	CTRPDYVAHKSINMLWGRRFHATGALKGNIKHL
16	R5	R5	57	51.4	8.8	R5	R5	5	CTRPSNNTRRSIHMAAGRALYTTDIIIGDIRQAHC
17	D/M	X4	2.5	13	13	X4	X4	8	CTRLNNLTRSIRIGPGGAWYAAAGRIVGKIRPAHC
18	X4	X4	0.7	0.1	—	X4	X4	6	CTRPNNNTRKRVTMGPRVWYTTGEIVGDIKRAHC
19	X4	X4	21.5	1.8	—	X4	—	—	CTRPNNNTRKSI[HLGW]xRT[x]x]x]T[x]x]IIGDI[x]x]A[x]C
20	X4	X4	15.6	15	—	R5	R5	4	CTRPNNNTRRSITIGPGRGFYGTDIIGDIRQAHC
21	X4	X4	1.8	17	—	X4	X4	9	CTRPNNNTRKSIHIGLGHAFR[TA]TEKIIGNIRKAHC
22	X4	X4	0	—	—	X4	X4	8	CTRPGNKTGKRIRIGHIGPGRFTYTEKIRDIRQAHC
23	D/M	X4	18.3	23.2	23.2	R5	R5	(7-5)	CTRPNNNTRKGIHIGPGRSFYATGKEIIGDIRQAHC
24	D/M	X4	1.7	0.4	0	X4	X4	6	CGRPNNNTRKGISIGPRAVYATEKIIGNIRQAHC
25	D/M	X4	0.1	0	0.4	X4	X4	7	CTRPNNNTRKRLYSRWRRLYATEIIVJIGVJGDIRQAHC

Data from each case including Trofile result, IAL composite interpretation, geno2pheno false-positive rates (FPR) of clonal and clinical option using TCD4 at collection TCD4 (cFPR) and nadir TCD4 (nFPR), 11/25 rule, PSSM, net charge, and the V3 sequence. Possible amino acids at positions with ambiguous nucleotides are shown as [MV]; cases 8 and 19 were not resolved [X] due to excess ambiguities.

TABLE 3. CONCORDANCE, SENSITIVITY, AND SPECIFICITY OF GENOTYPING TOOLS TAKING AS REFERENCE THE TROFILE ASSAY

Genotypic algorithms	Concordance (%)	Sensitivity (%)	Specificity (%)
11/25 rule	70.8	59	100
Geno2pheno _{Motivate}	66.7	53	100
Geno2pheno _{20Clonal}	79.2	76	85.7
Geno2pheno _{20clfnicoC}	73.9	75	71.4
Geno2pheno _{20clfnicoN}	68.8	90	33.3
Geno2pheno _{10clonal}	66.7	58.8	85.7
Geno2pheno _{10clfnicoC}	69.6	37.5	100
Geno2pheno _{10clfnicoN}	50.0	50	50
PSSM	76.2	64	100
IAL criterion	95.8	94	100

Agreement between Trofile results with different genotypic algorithms; geno2pheno were evaluated using different cutoffs. Values of false-positive rate, including 5.75% (motivate), 10%, and 20%, using both clonal and clinical option, the latter applying both recommended nadir TCD4 (N) and TCD4 at collection (C).

conducted in a public health laboratory setting is notable and documents the feasibility of the test in resource-limited settings.

The reliability of the genotypic methods may be influenced by polymorphisms found in Brazilian clade B sequences.¹² HIV-1 clade B GWGR bearing isolates, an uncommon motif in the V3 loop worldwide but with an important prevalence in Brazil, was observed in 28% of isolates, including one case with discordant genotype/Trofile result.

The use of replicates, as suggested by the European consensus, should further improve prediction. It is important to note that this discordant case (sample 2, Table 2) was re-evaluated as replicates without resolving the discrepancy.

The use of individual prediction algorithms showed, as in previous studies, a robust specificity but a suboptimal sensitivity.^{2,13} Using the geno2pheno clinical option with nadir TCD4 we obtained the best sensitivity score, 90%. The specificity, however, is low (Table 3). A recent study also suggests the usefulness of geno2pheno clinical option prediction.⁴ In this study we further evaluated the clinical option using both the nadir and the TCD4 at the time of the collection. This has provided some additional information, as discussed below.

Overall, the analysis of the sequence set showed a high specificity with most web-based methods, higher than most reports in the literature.^{2,14} Although this could be secondary to the small sample size evaluated here, with our discordance increasing as more samples are analyzed, many studies did not use the new ESTA Trofile assay. The earlier version of Trofile, and possible other phenotypic assays, may lack the high sensibility of ESTA to X4. These tests would therefore miss some X4 in paired, comparative studies. The lack of one or more X4 predictions by the “gold standard” would imply that some real X4 cases, identified by a genotypic algorithm with high specificity as PSSM and 11/25 rule, would be considered false-positive results, when they were actually performing better than the comparable phenotypic assays. Although plausible, this cannot be confirmed at this point but should be considered when interpreting these studies.

In spite of the fact that individual algorithms do not show a good concordance to the Trofile results, mostly due to low sensibility, the use of a “composite” rule, as applied by our service, improves prediction. Previous studies have also sug-

gested that a combination of bioinformatics tools could improve the sensitivity and specificity.¹⁵ The use of the European Consensus in this study would lead to 4/24 (16.7%) misclassifications (samples 2, 14, 15, and 19). In this sense, the use of Geno2pheno_{20Clonal} could perform better if used in combination with other available genotypic prediction tools. In our analyses, a reliable prediction of X4 virus is obtained for samples with an FPR value below 5.75% (motivate cutoff). For R5, all but one case (sample 2) would be resolved with a cutoff of 22%; above 50% would yield a 100% concordance to Trofile. However, values within this range can benefit from other genotypic tools to improve the prediction, and the use of highly specific criteria, such as the “11/25 rule” and PSSM as well as the clinical option of geno2pheno, can be useful in this range. To illustrate, samples 3, 7, 15, and 19, all with a clonal FPR above 20%, would be considered R5 by European consensus. This would wrongly classified 2/4 (50%) (samples 15 and 19) (Table 2). The use of clinical geno2pheno (applying either nadir TCD4 or the last available TCD4 determination) may help resolve cases in this range. If clinical FPR is incorporated in the analysis, using collection TCD4, the two R5 have FPRs around 20% (26.3% and 19%), whereas the two X4 have an FPR below 5.75%. Additionally, these clinical FPRs are in concordance with PSSM and the results of the 11/25 rule. It is of note that the use of the clinical option with the nadir TCD4 would not resolve cases 3 and 7, as both show a low FPR at this option (8.2% and 4.9%).

The usefulness of these additional resources is also suggested by case 23, in which the clonal FPR, near the cutoff, can be further supported by incorporating the 11/25 rule. The most intriguing case is the discordant sample 2, with a high clonal FPR of 48.4%. This case has R5 in both the 11/25 rule and PSSM, but a low FPR (12.6%) at the clinical option that was not considered at the time of the test report.

Another situation is cases with an FPR below 20% but above 5.75%. Most (5/6) cases would be correctly classified as X4 by the European consensus recommendation, but by considering clinical option results, over 75%, along with R5 by PSSM and 11/25 rules, would resolve the single discordance. Although highly predicted for this study, these rules and cutoff suggestions should be improved and validated by larger studies. However, our data do not support the assumption that a single parameter, albeit practical, may be adequate for the prediction of genotypic tropism for Brazilian patients with advanced disease.

On the other hand, the study also suggests that a composite evaluation of existing tools may prove robust in predicting HIV coreceptor tropism.

Acknowledgments

This work was supported by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) Grant 2009/8215-0. Additional unrestricted educational funding was received from ViiV HealthCare/GSK and Trofile tests were paid by Pfizer Inc.

Author Disclosure Statement

No competing financial interests exist. LFMB have received honoraria for lectures from pharmaceutical companies, including ViiV HealthCare/GSK and travel support from Pfizer.

References

1. Vandekerckhove L, Wensing A, Kaiser R, *et al.*: European guidelines on the clinical management of HIV-1 tropism testing. *Lancet Infect Dis* 2011;10:70319–70324.
2. Garrido C, Roulet V, Chueca N, *et al.*: Evaluation of eight different bioinformatics tools to predict viral tropism in different human immunodeficiency virus type 1 subtypes. *J Clin Microbiol* 2008;46:887–891.
3. Qu S, Ma L, Yuan L, *et al.*: Co-receptor usage and prediction of V3 genotyping algorithms in HIV-1 subtype B from paid blood donors experienced anti-retroviral therapy in chinese central province. *Virology* 2010;7:280.
4. Prosperi M, Bracciale L, Fabbiani M, *et al.*: Comparative determination of HIV-1 co-receptor tropism by Enhanced Sensitivity Trofile, gp120 V3-loop RNA and DNA genotyping. *Retrovirology* 2010;7:56.
5. Svicher V, D'Arrigo R, Alteri C, *et al.*: Performance of genotypic tropism testing in clinical practice using the enhanced sensitivity version of Trofile as reference assay: Results from the OSCAR Study Group. *New Microbiol* 2010;33:195–206.
6. McGovern R, Thielen A, Mo T, *et al.*: Population-based V3 genotypic tropism assay: A retrospective analysis using screening samples from the A4001029 and MOTIVATE studies. *AIDS* 2010;24:2517–2525.
7. Raymond S, Delobe P, Mavigner M, *et al.*: CXCR4-using viruses in plasma and peripheral blood mononuclear cells during primary HIV-1 infection and impact on disease progression. *AIDS* 2010;24:2305–2312.
8. Seclén E, Garrido C, González MM, *et al.*: High sensitivity of specific genotypic tools for detection of X4 variants in anti-retroviral-experienced patients suitable to be treated with CCR5 antagonists. *J Antimicrob Chemother* 2010;65:1486–1492.
9. Ferreira JL, Thomaz M, Rodrigues R, *et al.*: Molecular characterization of newly identified HIV-1 infections in Curitiba, Brazil: Preponderance of clade C among males with recent infections. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2008;103:800–808.
10. Jensen M, Li Fu-Sheng, Wout A, *et al.*: Improved coreceptor usage prediction and genotypic monitoring of R5-to-X4 transition by motif analysis of human immunodeficiency virus type 1 env V3 loop sequences. *J Virol* 2003;77:13376–13388.
11. Sing T, Low A, Beerenwinkel N, *et al.*: Predicting HIC coreceptor usage on the basis of genetic and clinical covariates. *Antiviral Ther* 2007;12:1097–1106.
12. Santoro-Lopes G, Harrison L, Tavares M, *et al.*: HIV disease progression and V3 serotypes in Brazil: Is B different from B-Br? *AIDS Res Hum Retroviruses* 2000;16:953–958.
13. Poveda E, Séclen E, González MM, *et al.*: Design and validation of new genotypic tools for easy and reliable estimation of HIV tropism before using CCR5 antagonists. *J Antimicrob Chemother* 2009;63:1006–1010.
14. Low AJ, Dong W, Chan D, *et al.*: Current V3 genotyping algorithms are inadequate for predicting X4 co-receptor usage in clinical isolates. *AIDS* 2007;21:F17–F24.
15. Chueca N, Garrido C, Álvarez M, *et al.*: Improvement in the determination of HIV-1 tropism using the V3 gene sequence and a combination of bioinformatics tools. *J Med Virol* 2009;81:763–767.

Address correspondence to:
Luis Fernando de Macedo Brígido
Av Dr Arnaldo, no. 355
CEP 01246-902
Cerqueira César
Centro de Virologia
São Paulo, SP
Brazil
E-mail: lubrigido@gmail.com