

## **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/mm<sup>3</sup> 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/mm<sup>3</sup> 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 <sup>3</sup>	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 <sub>2</sub>	Cloreto de Magnésio
mL	Mililitro (10 <sup>-3</sup> 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 <sup>-9</sup> 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

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

<b>Figura 14:</b> Aumento de células T CD4 obtido pelo grupo R5comMQV na primeira avaliação.	71
<b>Figura 15:</b> Variações nas contagens de células T CD4 obtido pelo grupo R5comMQV no período observado.	71
<b>Figura 16:</b> Aumento de células T CD4 obtido pelo grupo R5semMQV na primeira avaliação.	76
<b>Figura 17:</b> Variações nas contagens de células T CD4 no grupo R5semMQV no período observado.	76
<b>Figura 18:</b> Aumento de células T CD4 obtido pelo grupo X4 na primeira avaliação.	82
<b>Figura 19:</b> Variações nas contagens de células T CD4 obtidas pelo grupo X4 durante o período observado.	82
<b>Figura 20:</b> Classificação do GSS relacionando os três grupos avaliados.	87
<b>Figura 21:</b> Variações obtidas nas contagens de células T CD4, de acordo com o tempo observado por grupo.	89
<b>Figura 22:</b> 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:** *Primers* 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

<b>Tabela 11:</b> Informações de uso de ARVs, de acordo, com a classe de medicamento, nos diferentes períodos de tratamento avaliados nos pacientes do grupo R5comMQV.	66
<b>Tabela 12:</b> 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
<b>Tabela 13:</b> Esquema terapêutico de “baseline” e de resgate do grupo R5comMQV.	69
<b>Tabela 14:</b> Parâmetros imunológicos dos pacientes do grupo R5comMQV.	70
<b>Tabela 15:</b> Informações de uso de ARVs, de acordo, com a classe de medicamento, nos diferentes períodos de tratamento avaliados em pacientes do grupo R5MQV.	72
<b>Tabela 16:</b> Pontuação do GSS do esquema “background” dos pacientes R5semMQV.	73
<b>Tabela 17:</b> Esquema terapêutico de “baseline” e de resgate do grupo R5 e que não utilizaram maraviroque.	74
<b>Tabela 18:</b> Parâmetros imunológicos dos pacientes do grupo R5semMQV.	75
<b>Tabela 19:</b> Informações de uso de ARVs, de acordo, com a classe de medicamento, nos diferentes períodos de tratamento avaliados, do grupo X4.	77
<b>Tabela 20:</b> Notas do GSS do esquema de “background” dos pacientes X4.	79
<b>Tabela 21:</b> Esquema terapêutico de “baseline” e de resgate do grupo X4.	80
<b>Tabela 22:</b> 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

<b>1. Introdução</b>	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
<b>2 Objetivos</b>	48
2.1 Objetivo geral	48
2.2 Objetivos específicos	48
<b>3 Material e Métodos</b>	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
<b>4. Resultados</b>	<b>61</b>
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 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
<b>5.</b>	<b>Discussão</b>	<b>90</b>
<b>6.</b>	<b>Conclusão</b>	<b>96</b>
<b>7.</b>	<b>Referências Bibliográficas</b>	<b>97</b>
<b>8.</b>	<b>Anexos</b>	
8.1	Aprovação Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Adolfo Lutz	
8.2	Trabalhos publicados	