CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E EPIDEMIOLÓGICA DO HIV EM PORTO ALEGRE: MUTAÇÕES DE RESISTÊNCIA AOS ANTIRRETROVIRAIS NO DOMÍNIO C-TERMINAL DA TRANSCRIPTASE REVERSA

Isabel M. Prellwitz (IC)[1], B. M. Alves (IC)[1], M. A. Soares[1,2], E. Sprinz[3], H. N. Seuanez[1,2], E. A. Soares[1]

[1] Programa de Genética, Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva , Coordenação de Pesquisa, RJ, Brasil; [2] Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil; [3] Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brasil.

INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos países-referência no tratamento da infecção pelo HIV através da distribuição gratuita de antirretrovirais (ARV). Entretanto, isso implica na necessidade de monitoramento constante ao surgimento de mutações de resistência aos medicamentos, fatores esses que podem levar à emergência e disseminação de variantes resistentes. Nos dias de hoje existe uma grande preocupação com as coinfecções, principalmente com os oncovírus, como por exemplo HBV, HCV e HPV. A supressão do HIV através de uma resposta eficiente ao tratamento é muito importante para o bom prognóstico desses pacientes. Os subtipos do HIV-1 apresentam diferentes comportamentos biológicos como na transmissão, progressão e resposta ao tratamento, o que destaca a região sul do Brasil, onde os subtipos C e B circulam com igual prevalência. Além disso, pouco se sabe acerca do impacto das mutações nas regiões C-terminais da Transcriptase Reversa (RT) recentemente descritas e caracterizadas por diminuírem a susceptibilidade aos ARVs. Esse estudo visa o monitoramento da distribuição dos diferentes subtipos e das mutações que conferem resistência aos ARVs inibidores da protease (PR) e da RT pacientes HIV+ no sul do Brasil.

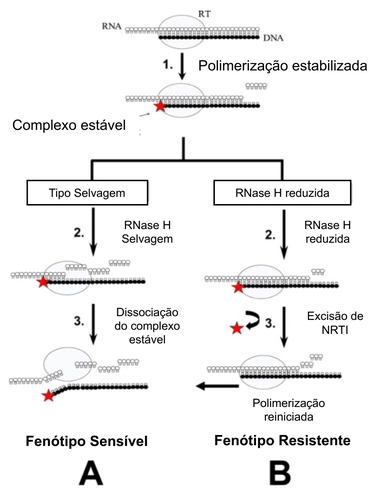

Figura 1. Exemplo de mecanismo de resistência aos inibidores nucleosídicos da RT na porção C-Terminal. Imagem traduzida e modificada de Pathak V, 2010.

METODOLOGIA

Em 2002, foram colhidas 253 amostras de pacientes HIV+ acompanhados no Ambulatório de HIVAids do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, que fazem parte de uma coorte em acompanhamento no sul do Brasil. Estas foram enviadas ao Programa de Genética juntamente com dados clínicos e laboratoriais. Foi feita a extração do DNA genômico com o kit QIAamp® DNA Mini Kit, seguida da amplificação por PCR aninhado e sequenciamento das regiões genômicas da PR e RT, domínios polimerásico (DP), C-terminal (CN) e RNaseH (RH) gerando um fragmento de 1750 pb, (Fig.2). Os eletroferogramas foram editados manualmente usando o programa SeqMan. O alinhamento das sequências foi feito no BioEdit e análises filogenéticas foram conduzidas no MEGA 4.0, usando Neighbor-Joining, Kimura 2-parâmetros e *bootstrap* de 1000 réplicas. As sequências referência de todos os subtipos foram retirados do GenBank e incluídas nas análises. Sequências de vírus recombinantes foram determinadas por análise de Bootscan pelo programa Simplot. Foram analisadas as mutações de resistência a drogas segundo bibliografias recentes, visto que ainda não existe um consenso definido de mutações para a região C-Terminal, para as outras regiões utilizou-se o consenso da Sociedade Internacional de Aids.

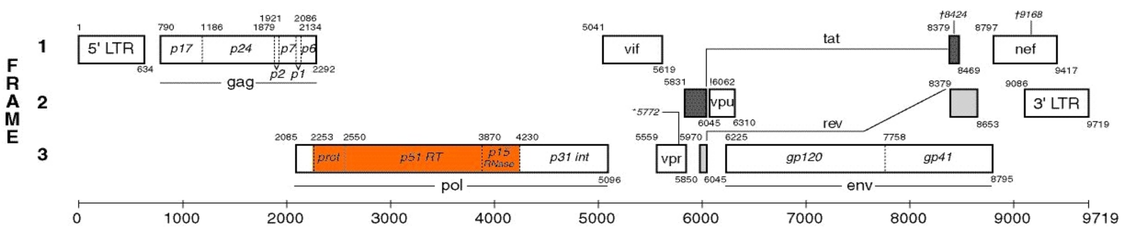

Figura 2. Mapa genômico do HIV-1. Em destaque está a região genômica estudada. (Http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/MAP/landmark.html).

RESULTADOS

Das 253 amostras, 155 foram analisadas. Dessas, 135 estavam em tratamento antirretroviral; 10 eram virgens de tratamento e para 10 não havia informação.

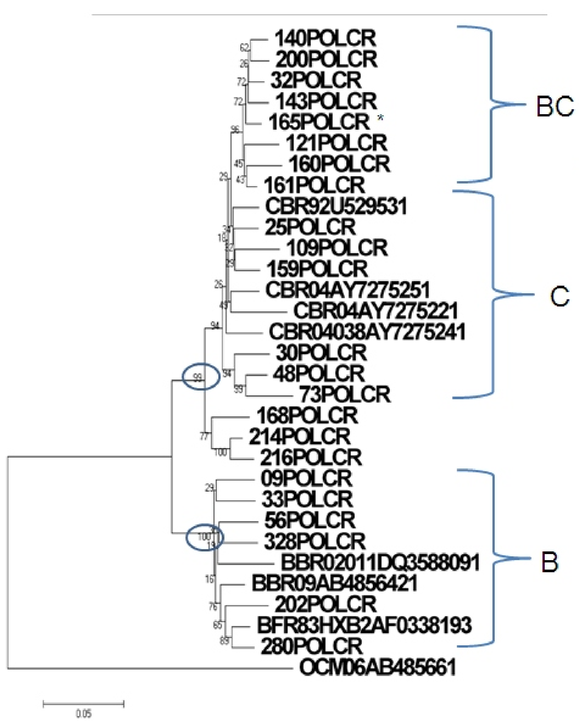

Figura 3. Árvore filogenética representativa a partir do fragmento POLCR (1750 pb; n = 23).

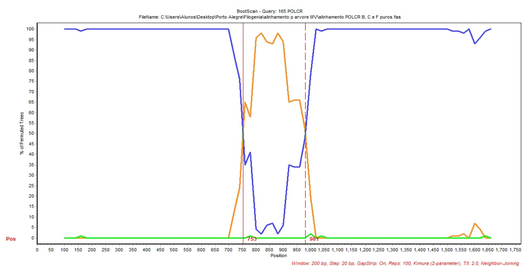

Figura 4: Análise de Bootscan da amostra 165POLCR(*) de um fragmento de 1750pb. Amostra classificada como recombinante CRF31_BC.

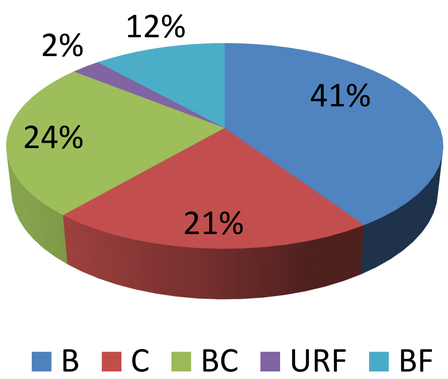

Figura 5. Prevalência de Subtipos encontrada nas amostras analisadas.

Tabela 1. Dados epidemiológicos dos pacientes.

Dados epidemiológicos	Total (*n*=145)	Subtipo B (*n*=59)	Subtipo C (*n*=31)	Rec BC (*n=34)*
Média de idade (anos)	40,58	42,13	40,13	39,23
Sexo (%)				
Homem	87 (60%)	36 (61%)	20 (64%)	21 (62%)
Mulher	58 (40%)	23 (39%)	11 (36%)	13 (38%)
Média do tempo de diagnóstico (anos)	6	6,5	5	6
Estágio CDC clínico (%)				
A	62 (43%)	25 (42%)	13 (42%)	13 (38%)
B	24 (17%)	6 (11%)	9 (29%)	6 (18%)
C	50 (34%)	25 (42%)	6 (19%)	14 (41%)
Não definido	9 (6%)	3 (5%)	3 (10%)	1 (3%)
Estágio CDC imunológico (%)				
1	3 (2%)	1 (2%)	0	2 (6%)
2	54 (37%)	21 (35%)	9 (29%)	15 (44%)
3	78 (54%)	33 (56%)	19 (61%)	16 (47%)
Não definido	10 (7%)	4 (7%)	3 (10%)	1 (3%)
Mediana de contagem de células T CD4 (cel/mm3)				
Tratados	354 (1 - 596)	354 (79 – 1383)	352 (1- 699)	348, 5 (86- 898)
Não tratados	588 (190-1139)	583 (204 -1139)	523 (190-606)	624,5 (659– 593)
Status do Tratamento (%)				
Tratados	133 (92%)	54 (92%)	28 (90%)	32 (94%)
Não tratados	10 (7%)	3 (5%)	3 (10%)	2 (6%)
Tratamento interrompido	2 (1%)	2 (3%)	0	0
Indivíduos com carga viral indetectável (%)				
Tratados	81 (60%)	34 (63%)	13 (46%)	19 (60%)
Não tratados	1 (1%)	0	1 (33%)	0

Tabela 2. Relação do tratamento com as mutações de resistência

Tratamento (n=135)	
Sucesso terapêutico (n=81)	60%
Com mutações de resistência (n= 25) Sem mutações de resistência (n=56)	31% 69%
Falha terapêutica (n= 54)	40%
Com mutações de resistência (n= 18) Sem mutações de resistência (n=36)	34% 66%
Não tratados (n=10)	
Com mutações de resistência primária (n=4) Sem mutações de resistência primária (n=6)	40% 60%

Tabela 3. Número de pacientes com de mutações de resistência por região genômica analisada

Pacientes com Mutações de Resistência por Região Genômica	
PR	7
DP	42
CN	13
RH	3

Entre os tratados (n=135), 30% (n=41) continham mutação de resistência em algumas das regiões analisadas, sendo 7 resistentes à IPs, 9 à NNRTI, 17 à NRTI e 14 à NNRTI e NRTI. Em 64 pacientes foram encontrados os polimorfismos A400T e G335D, na região da CN. Um paciente teve sua resistência com perfil TAM-1 potencializada pelo polimorfismo A400T.

Tabela 4. Análise representativa da ocorrência de mutações na transciptase reversa (DP e C-terminal) e sua resistência aos ARVs em pacientes com tratamento.

Paciente	Mutação DP	Mutação CN	Mutação RH	Resistência a ARV
27	NRTI: M41L, D67N, V75M, F77L, M184V, L210W, T215F	N348I	0	NRTI e NVP
116	NRTI: D67DN	A376S	0	AZT, D4T
272	0	A376S	Q547K	NRTI e NNRTI
277	NRTI: M41L, D67N, K70R, M184V, L210W, T215F, K219E	A371V	0	NRTI
279	NRTI: M41L, D67N, V75R, V118I, M184V, L210W, T215Y, NNRTI: V90I, A98G	A400T	0	NRTI e NVP

CONCLUSÕES

- Um dos maiores problemas da resposta ao tratamento é o acúmulo de mutações que surgem no vírus superando a eficácia da droga. Porém há poucos estudos sobre o impacto da terapia de antirretrovirais nos domínios C-terminais da RT (Conexão e RNase H).
- A diversidade de subtipos apontada pelo estudo permite identificar alta prevalência dos subtipos B (41%), recombinantes BC (24%) e C (21%), além de muitas formas recombinantes únicas, evidenciando um contexto diferente do resto do país e corroborando dados da literatura da época da amostragem.
- Entre os pacientes tratados e não-tratados, foi encontrada uma alta taxa de resistência aos medicamentos ARVs, principalmente aos inibidores da RT. Apenas foram consideradas as mutações de resistência aos antirretrovirais que possuíam dados experimentais já comprovados. As mutações A400T e G335D/C, embora com alta prevalência em pacientes não-tratados infectados pelos subtipos B e C, potencializam a resistência na presença de TAMs.
- O monitoramento da resistência aos ARVS é importante na avaliação da política de tratamento do HIV/Aids no país. Isso indica que análises em regiões como a porção C-Terminal devem ser priorizadas, para que a resposta ao tratamento não seja comprometida e não ocorra a disseminação de cepas resistentes.

Apoio financeiro: Ministério da Saúde, CNPq, FAPERJ e CAPES.

Projeto Gráfico: Serviço de Edição e Informação Técnico-Científica / CEDC / INCA