

KARIM YAQUB IBRAHIM

**Escape transitório da viremia plasmática de HIV-1 e
falência virológica em indivíduos sob terapêutica
anti-retroviral : incidência e fatores associados**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para a obtenção do título
de Doutor em Ciências

Programa de: Doenças Infecciosas e Parasitárias
Orientador: Prof. Dr. Aluísio Augusto Cotrim Segurado

São Paulo
2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Ibrahim, Karim Yaqub

Escape transitório da viremia plasmática de HIV-1 e falência virológica em indivíduos sob terapêutica anti-retroviral : incidência e fatores associados / Karim Yaqub Ibrahim. -- São Paulo, 2010.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Orientador: Aluísio Augusto Cotrim Segurado.

Descritores: 1.HIV-1 2.Viremia transitória 3.Incidência 4.Anti-retrovirais 5.Carga viral 6.Reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa 7.Mutação 8.Dosagem/análise

USP/FM/DBD-295/10

Dedico esta tese a meu pai, minha mãe e minhas irmãs por me oferecerem um delicioso ninho, repleto de carinho, conforto e incentivo.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Aluisio Augusto Cotrim Segurado, por sua orientação, apoio e dedicação em todos os momentos do estudo, sabendo solucionar, com muita paciência, as questões mais difíceis encontradas ao longo do estudo.

Aos pacientes que participaram da pesquisa pela disponibilidade e compromisso durante o estudo.

A direção do SEAP-HCFMUSP, Dra. Eliana Battaglia Gutierrez, pelo apoio dado, em todos os momentos, à realização deste trabalho e por ter disponibilizado um especial sistema de coleta de exames na própria instituição ao longo do estudo.

A toda equipe de enfermagem do SEAP-HCFMUSP por toda sua eficiência e pelo suporte fundamental à coleta de amostras dos pacientes.

A equipe do registro do SEAP-HCFMUSP, pela ajuda oferecida na busca dos participantes através da listagem de endereços, em especial, a Célia Cristina Vieira pela especial atenção fornecida nessa busca.

Aos funcionários do arquivo médico do SEAP-HCFMUSP ao auxiliar no levantamento de prontuários.

Aos médicos do SEAP-HCFMUSP pela cooperação na busca dos participantes.

Ao estudante de medicina Bruno Vita Ricci pela ajuda no preenchimento do banco de dados.

Ao laboratório de Virologia (LIM 52) pelo armazenamento e processamento dos exames de carga viral e CD4, em especial, a Maria Carolina Alamos Bernal, Anderson Molina Nascimento Filho e Ana Carolina Mamana Fernandes de Souza pela realização dos exames e apoio na organização das amostras. Ao Luciano Monteiro da Silva pelo apoio nas compras do material necessário. Ao Daniel Raimundo da Silva e Cícero Raimundo da Silva pelo apoio na listagem dos pacientes e dos resultados de carga viral e CD4. A todos deste laboratório que, direta ou indiretamente, deram apoio a esta pesquisa.

Aos colegas do Laboratório de Biologia Molecular do Banco de Sangue da Fundação Pro-Sangue, em especial à Dra. Ester Cerdeira Sabino, por abrir as portas deste laboratório para o enriquecimento do meu aprendizado e por sua contribuição na banca examinadora de qualificação.

A Dra. Noemia Barbosa Carvalho e ao Dr. Marcello M. Chaves Magri pela colaboração, compreensão e cobertura durante meus períodos de ausência no trabalho.

Aos colegas de trabalho do Hospital das Clínicas, em especial, ao Dr. Francisco Oscar de Siqueira França, a Dra. Evanthia Vetos Mimicos e a Dra. Silvia Goulart pelo apoio dado na etapa final do estudo.

Aos colegas de trabalho do ICESP, em especial, ao Dr. Edson Abdala por ter me propiciado o tempo da escrita.

A Dra. Lígia Camera Pierrotti pela ajuda na construção do banco de dados.

A Dra. Ana Marli Christovam Sartori que contribuiu com idéias e incentivos nos momentos de incertezas e pelo especial apoio e fundamental contribuição durante a qualificação.

A Dra. Daisy Maria Machado por sua contribuição na banca examinadora da qualificação.

A Valéria de Vilhena Lombardi pelo fundamental apoio na revisão das referências bibliográficas.

A Luiza Maria Vieira de Assis pela ajuda, imprescindível, prestada na busca das referências bibliográficas.

A Marina Morena Santos Coelho Carvalho pelo apoio técnico nas questões de informática.

A Roseli Antonia Santo, a qual, mesmo quando eu estive distante, sempre me deu atenção mais do que necessária às minhas demandas e me ofereceu muito suporte durante e, sobretudo, na fase final da realização deste trabalho e por toda sua generosidade.

A Vania Regina Miguel por todo o apoio oferecido e pelo carinho e parceria.

Aos professores titulares Antonio Alci Barone e Maria Aparecida Shikanai

Yasuda pelo apoio e tempo fornecido para a realização deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Virologia do Hospital Pellegrin em especial à Patricia Pinson por todo o apoio oferecido no manuseio da técnica de genotipagem.

À Dra. Isabelle Pellegrin, pelas sugestões feitas no desenho do estudo e por todos os seus ensinamentos, sempre com muito brilho e humildade.

Ao Dr. Hervé Fleury por abrir as portas de seu laboratório.

Aos colegas do Laboratório de Farmacocinética e Farmacologia Clínica do Hospital Haut-Lévêque, em especial ao Jean-Marc Bernadou por ter me ensinado, com muita paciência, dedicação e bom humor, a técnica de dosagem plasmática dos anti-retrovirais.

À Dra. Dominique Breilh, pelos ensinamentos das interpretações e aplicabilidade clínica dessa técnica.

À Dra. Marie-Claude Saux por ter, generosamente, aberto as portas de seu laboratório.

Ao Prof. Dr. Denis Malvy, por ter sido fundamental na minha inserção em todas as instituições de Bordeaux necessárias para completar o presente estudo e para o enriquecimento de minha formação. Por todo o apoio científico que me forneceu durante minha passagem por Bordeaux e pela oportunidade de ter passado pelo seu serviço.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo suporte financeiro.

Ao Instituto de Doenças Infecciosas e Tropicais, René-Labusquière, pelo suporte financeiro.

Ao Laboratório de Farmacocinética e Farmacologia Clínica do Hospital Haut-Lévêque da Universidade de Bordeaux 2 pelo suporte financeiro.

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Annelise Carneiro da Cunha, Maria Julia de A.L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2A ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*

Sumário

Lista de abreviaturas
Lista de símbolos
Lista de siglas
Lista de figuras
Lista de gráficos
Lista de quadros
Lista de tabelas
Resumo
Summary

1	Introdução	1
2	Objetivos	10
3	Métodos	13
3.1	Caracterização da população estudada	14
3.2	Desenho do estudo	15
3.3	Definição dos desfechos de interesse	15
3.4	Definição das variáveis independentes de interesse	16
3.5	Cálculo do tamanho da amostra	17
3.6	Seleção dos indivíduos	18
3.7	Procedimentos do estudo	21
3.7.1	Avaliação dos sujeitos na linha de base da coorte	21
3.7.2	Avaliação dos sujeitos durante o seguimento da coorte	22
3.8	Protocolos laboratoriais	24
3.8.1	Determinação da carga viral plasmática de HIV	24
3.8.2	Quantificação dos linfócitos T CD4+ periféricos	25
3.8.3	Genotipagem de seqüências de HIV	26
3.8.4	Determinação da concentração plasmática de anti-retrovirais	30
3.9	Análise dos Resultados	32
3.9.1	Incidência de <i>blip</i> e de falência virológica	32
3.9.2	Pesquisa de fatores associados aos desfechos	32
3.9.3	Descrição das mutações genotípicas em seqüências de HIV identificadas por ocasião dos desfechos avaliados	35
3.9.4	Avaliação da dosagem plasmática de anti-retrovirais	38
3.10	Aspectos Éticos	38

4	Resultados	40
4.1	Seleção da população de estudo	41
4.2	Seguimento Clínico-Laboratorial	43
4.3	Desfechos do Estudo	44
4.4	Pesquisa de fatores associados à incidência de <i>blip</i>	45
4.5	Pesquisa de fatores associados à incidência de falência virológica	52
4.6	Conseqüências clínicas e conduta tomada quando da ocorrência dos desfechos de interesse	59
4.7	Descrição de dados laboratoriais evolutivos (número de células CD4+ periféricas e carga viral plasmática de HIV) em indivíduos que apresentaram os desfechos de interesse (<i>blip</i> ou falência virológica)	59
4.8	Descrição de resultados dos testes genotípicos de seqüências <i>pol</i> de HIV	61
4.9	Descrição dos resultados da dosagem plasmática de anti-retrovirais nos sujeitos que apresentaram os desfechos <i>blip</i> e falência virológica	72
4.10	Descrição de dados relativos à adesão auto-relatada à terapêutica e à dosagem de concentrações plasmáticas de medicamentos anti-retrovirais	74
5	Discussão	79
5.1	Considerações finais e perspectivas futuras	113
6	Conclusões	115
7	Anexos	118
	Anexo 1 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	119
	Anexo 2 – Questionário	122
	Anexo 3 – Certificado de Aprovação do Comitê de Ética	130
	Anexo 4 – Polimorfismos e dupla população encontrados nos indivíduos que apresentaram <i>blip</i>	131
	Anexo 5 – Polimorfismos e dupla população encontrados nos indivíduos que apresentaram falência virológica	132
8	Referências	133
	Apêndices	149
	Apêndice 1 – Descrição da técnica de dosagem plasmática de anti-retrovirais (INNTR e IP)	150

Lista de Abreviaturas

cópias/mL	cp/mL
CV	Carga Viral plasmática de HIV
DP	desvio padrão
log	logaritmo
OR	odds ratio
pb	pares de bases
Prot	protease

Lista de Símbolos

°C	graus Celsius
μL	microlitro
cel/mm ³	células por milímetro cúbico
g	unidade de gravidade
mL	mililitros
mM	milimolar (10^{-3} moles por litro)
ng/mL	nanogramas por mililitro
μM	micromolar

Lista de Siglas

3TC	Lamivudina
ABV	Abacavir
aids	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
APV	Amprenavir
ARV	Anti-retroviral
AZT	Zidovudina
CDC	<i>Centers for Disease Control</i>
D4T	Estavudina
DDI	Didanosina
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
EFV	Efavirenz
HAART	<i>Highly Active Antiretroviral Therapy</i> (Terapia Anti-retroviral de Alta Potência)
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografia Líquida de Alta Performance)
IAS	<i>International AIDS Society</i>
IC	Intervalo de Confiança
IDV	Indinavir
INNTR	Inibidores da Transcriptase Reversa Não – análogo de Nucleosídeo
INTR	Inibidores da Transcriptase Reversa análogo de Nucleos(t)ídeo
IP	Inibidor da Protease
LPV/r	Lopinavir/Ritonavir
MEMS	Medication Event Monitoring System
NFV	Nelfinavir
NVP	Nevirapina
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase

RNA	Ácido Ribonucléico
RT-PCR	Reação em cadeia por polimerase precedida de transcrição reversa
RTV	Ritonavir
SEAP	Serviço de Extensão ao Atendimento de Pacientes com HIV/AIDS
SQV	Saquinavir
TARV	Terapêutica Anti-retroviral
TDF	Tenofovir
TR	Transcriptase Reversa

Lista de Figuras

- Figura 1** - Fluxograma de seleção dos indivíduos incluídos no estudo. SEAP-Casa da AIDS, HC-FMUSP São Paulo, 2005 - 200720
- Figura 2** - Processo de seleção da amostra, com o motivo de não-inclusão de casos. SEAP-Casa da AIDS, HC-FMUSP, São Paulo, 2005 - 2006.....42
- Figura 3** - Realização da análise genotípica em seqüências de HIV obtidas de sujeitos que apresentaram *blip* ao longo do seguimento. SEAP-Casa da AIDS, HC-FMUSP, São Paulo, 2005 – 200762
- Figura 4** - Realização da análise genotípica em seqüências de HIV obtidas de indivíduos que apresentaram falência virológica ao longo do seguimento. SEAP-Casa da AIDS, HC-FMUSP, São Paulo, 2005 – 200762

Lista de Gráficos

- Gráfico 1** - Porcentagem de participantes do estudo, segundo visitas realizadas no seguimento. SEAP-Casa da AIDS, HC-FMUSP, São Paulo, 2005 - 200743
- Gráfico 2** - Adesão auto-referida ao uso da medicação anti-retroviral, ao longo do seguimento. SEAP-Casa da AIDS, HC-FMUSP, São Paulo, 2005 – 200774

Lista de Quadros

- Quadro 1** - Intervalo de concentração residual adequada para os diversos anti-retrovirais das classes INNTR e IP31
- Quadro 2** - Mutações conferidoras de resistência aos inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleos(t)ídeos, adaptado das recomendações do IAS - dezembro 2009⁶⁸36
- Quadro 3** - Mutações conferidoras de resistência aos inibidores da transcriptase reversa não-análogos de nucleosídeos, adaptado das recomendações do IAS - dezembro 2009⁶⁸36
- Quadro 4** - Mutações conferidoras de resistência aos inibidores da protease, adaptado das recomendações do IAS - dezembro 2009⁶⁸37
- Quadro 5** - Mutações no gene da protease apresentados pelos sujeitos que desenvolveram *blip*. SEAP-Casa da AIDS, HC-FMUSP São Paulo, 2005 – 200765
- Quadro 6** - Mutações no gene da transcriptase reversa apresentados pelos sujeitos que desenvolveram *blip*. SEAP-Casa da AIDS, HC-FMUSP São Paulo, 2005 – 200765
- Quadro 7** - Mutações no gene da protease apresentados pelos sujeitos que desenvolveram falência virológica. SEAP-Casa da AIDS, HC-FMUSP São Paulo, 2005 – 200769
- Quadro 8** - Mutações no gene da transcriptase reversa apresentados pelos sujeitos que desenvolveram falência virológica. SEAP-Casa da AIDS, HC-FMUSP São Paulo, 2005 – 200771

Lista de Tabelas

- Tabela 1** - Conteúdo do formulário aplicado com intervalos de 3 meses (± 1 mês) após a inclusão no estudo22
- Tabela 2** - Ocorrência de *blip* e de falência virológica segundo visita de seguimento na coorte. SEAP-Casa da AIDS, HC-FMUSP, São Paulo, 2005 – 200745
- Tabela 3** - Comparação de características sócio-demográficas entre indivíduos dos grupos *blip* e avirêmicos. SEAP-Casa da AIDS, HC-FMUSP, São Paulo, 2005 - 200746
- Tabela 4** - Comparação de variáveis relacionadas à exposição ao HIV entre indivíduos dos grupos *blip* e avirêmico. SEAP-Casa da AIDS, HC-FMUSP São Paulo, 2005 – 200747
- Tabela 5** - Comparação de hábitos e intercorrências clínicas no mês precedente à visita entre indivíduos dos grupos *blip* e avirêmico. SEAP-Casa da AIDS, HC-FMUSP, São Paulo, 2005 – 200748
- Tabela 6** - Comparação de dados referentes ao uso de anti-retrovirais (ARV): adesão auto-referida e classe de ARV utilizada pelos participantes pertencentes aos grupos *blip* e avirêmico. SEAP-Casa da AIDS, HC-FMUSP, São Paulo, 2005 – 2007 ...49
- Tabela 7** - Comparação de variáveis numéricas relacionadas à história de terapia anti-retroviral e tempo de infecção por HIV entre pacientes pertencentes aos grupos *blip* e avirêmico. SEAP-Casa da AIDS, HC-FMUSP, São Paulo, 2005 – 200750
- Tabela 8** - Modelo de regressão logística múltipla para avaliação de fatores associados à ocorrência de *blip*. SEAP-Casa da AIDS, HC-FMUSP, São Paulo, 2005 – 200752
- Tabela 9** - Comparação de características sócio-demográficas entre indivíduos dos grupos com e sem falência virológica. SEAP-Casa da AIDS, HC-FMUSP, São Paulo, 2005 – 200753

Tabela 10 - Comparação de variáveis relacionadas à exposição ao HIV entre indivíduos dos grupos falência virológica e não-falência virológica. SEAP-Casa da AIDS, HC-FMUSP São Paulo, 2005 – 2007	54
Tabela 11 - Comparação de hábitos e intercorrências clínicas no mês precedente à visita entre indivíduos dos grupos falência virológica e não-falência virológica. SEAP-Casa da AIDS, HC-FMUSP, São Paulo, 2005 – 2007	55
Tabela 12 - Comparação de dados referentes ao uso de anti-retrovirais (ARV): adesão auto-referida e classe de ARV utilizada pelos participantes pertencentes aos grupos falência virológica e não-falência virológica e comparação entre os grupos em relação à ocorrência precedente de <i>blip</i> . SEAP-Casa da AIDS, HC-FMUSP, São Paulo, 2005 – 2007	56
Tabela 13 - Comparação de variáveis numéricas relacionadas à história de terapia anti-retroviral e tempo de infecção por HIV entre pacientes pertencentes aos grupos falência virológica e não-falência virológica. SEAP-Casa da AIDS, HC-FMUSP, São Paulo, 2005 – 2007	57
Tabela 14 - Modelo de regressão logística múltipla para avaliação de fatores associados à ocorrência de falência virológica. SEAP-Casa da AIDS, HC-FMUSP, São Paulo, 2005 – 2007.....	58
Tabela 15 - Comparação dos sujeitos que apresentaram os desfechos de interesse segundo número de linfócitos T CD4+ periféricos no momento da admissão no estudo. SEAP-Casa da AIDS, HC-FMUSP, São Paulo, 2005 – 2007	60
Tabela 16 - Valores de carga viral plasmática de HIV observados por ocasião da ocorrência dos eventos de interesse. SEAP-Casa da AIDS, HC-FMUSP, São Paulo, 2005 – 2007	61
Tabela 17 - Mutações conferidoras de resistência identificadas no seqüenciamento dos gene da protease e da transcriptase reversa, subtipos de HIV e dosagem plasmática de anti-retrovirais nos sujeitos que apresentaram o desfecho <i>blip</i> . SEAP-Casa da AIDS, HC-FMUSP, São Paulo, 2005 – 2007	64

Tabela 18 - Mutações conferidoras de resistência identificadas no seqüenciamento dos genes da protease e da transcriptase reversa, subtipos de HIV e dosagem plasmática de anti-retrovirais nos sujeitos que apresentaram o desfecho falência virológica. SEAP-Casa da AIDS, HC-FMUSP, São Paulo, 2005 – 2007	68
Tabela 19. Comparação dos resultados da dosagem plasmática de anti-retrovirais com a adesão à terapia relatada pelos sujeitos. SEAP-Casa da AIDS, HC-FMUSP, São Paulo, 2005 – 2007	75
Tabela 20A - Resultados da dosagem plasmática dos anti-retrovirais obtidos em momentos de desfecho e de carga viral indetectável nos indivíduos (8 ao 200) que apresentaram <i>blip</i>	76
Tabela 20B - Resultados da dosagem plasmática dos anti-retrovirais obtidos em momentos de desfecho e de carga viral indetectável nos indivíduos (208 ao 345) que apresentaram <i>blip</i>	77
Tabela 21 - Resultados da dosagem plasmática dos anti-retrovirais obtidos em momentos de desfecho e de carga viral indetectável nos indivíduos que apresentaram falência virológica.....	78

Resumo

Ibrahim KY. *Escape transitório da viremia plasmática de HIV-1 e falência virológica em pacientes sob terapêutica anti-retroviral : incidência e fatores associados* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2010. 148p.

INTRODUÇÃO: Pacientes em terapia anti-retroviral podem apresentar escapes transitórios de viremia plasmática (*blip*), porém os preditores desse evento e seu impacto sobre a incidência de falência virológica são ainda controversos na literatura. Neste estudo de coorte estimou-se a incidência de *blip* e de falência virológica e investigaram-se possíveis preditores de tais desfechos. *Blip* foi definido como carga viral superior a 50 cópias/mL com subsequente supressão da viremia plasmática e falência virológica como duas medidas consecutivas de carga viral plasmática superiores a 50 cópias/mL. Adicionalmente, pesquisou-se, por ocasião desses eventos, a presença de mutações genotípicas de HIV capazes de conferir resistência aos anti-retrovirais e as concentrações plasmáticas de inibidores não nucleosídicos da transcriptase reversa e inibidores da protease, comparando-as com o relato dos participantes sobre adesão à medicação.

MÉTODOS: 350 participantes infectados pelo HIV (250 homens e 100 mulheres) foram selecionados no Serviço de Extensão ao Atendimento de Pacientes com HIV/Aids – Casa da Aids – do Hospital das Clínicas da FMUSP, São Paulo, Brasil. Na admissão ao estudo e trimestralmente, ao longo de 78 semanas, foram coletadas informações sobre dados sócio-demográficos, forma presumida de aquisição do vírus, uso de e adesão a medicações anti-retrovirais, ocorrência de outras comorbidades, bem como uso de álcool e de drogas ilícitas. Investigaram-se fatores potencialmente associados à incidência dos desfechos de interesse, tais como ocorrência de outras doenças, exposição a imunizações e falha na adesão a práticas de sexo mais seguro. Amostras de sangue periférico foram coletadas a cada visita para determinação de carga viral plasmática por RT-PCR ultrasensível, e contagem de linfócitos T CD4+ por citometria de fluxo. Nos indivíduos que apresentaram os desfechos de interesse do estudo, procedeu-se ao seqüenciamento dos genes da transcriptase reversa e da protease de HIV e à dosagem plasmática dos anti-retrovirais por método de Cromatografia Líquida de Alta Performance. As incidências de *blip* e falência virológica foram estimadas e os fatores associados a ambos investigados em modelo de regressão logística múltipla.

RESULTADOS: As incidências de *blip* e falência virológica foram 9,4 e 4,2/100 pessoas-ano, respectivamente. Três indivíduos apresentaram falência virológica precedidos por *blip*. À análise multivariada, a não adesão às práticas de sexo mais seguro no mês precedente se mostrou independentemente associada à ocorrência de *blip* (OR 24,64, IC 95% 4,40 – 137,88, $p < 0,001$) e de falência virológica (OR 24,69, IC 95% 4,20 – 145,18, $p < 0,001$). Adicionalmente, observou-se que a exposição prévia a maior número de esquemas anti-retrovirais foi preditora dos eventos *blip* (OR 1,82, IC 95% 1,41 – 2,36, $p < 0,001$) e falência virológica (OR 1,67, IC 95% 1,19 – 2,35,

$p=0,003$). A ocorrência de *blip* não se associou ao desenvolvimento posterior de falência virológica. Um maior número de mutações conferidoras de resistência medicamentosa foi identificado no momento de falência virológica, quando comparado ao momento de *blip*, com predomínio de mutações no gene da transcriptase reversa, refletindo o maior uso desses fármacos. Das 122 concentrações plasmáticas de anti-retrovirais analisadas em 120 amostras, 84 estavam em níveis terapêuticos adequados. Porém, tais resultados apresentaram apenas 69% de concordância com a adesão auto-referida à medicação. Este estudo mostra que apresentar *blip* em uma medida isolada pode ser um evento benigno; por outro lado, falência virológica pode ser conseqüente a acúmulo de mutações conferidoras de resistência a pelo menos um dos anti-retrovirais em uso, podendo comprometer a eficácia do esquema terapêutico utilizado. Ambos os desfechos mostraram-se mais incidentes na população multiexperimentada à terapêutica, que, portanto, merece atenção particular. Uma importante contribuição deste estudo foi a avaliação da dosagem plasmática dos anti-retrovirais, método simples e de baixo custo, que, implantado na rotina laboratorial, pode contribuir para o monitoramento da adesão aos anti-retrovirais e reduzir a demanda por testes genotípicos.

Descritores: 1.HIV-1 2.Viremia intermitente 3.Incidência 4.Terapia anti-retroviral 5.Carga viral 6.Reação em cadeia de polimerase via transcriptase reversa 7.Mutações 8.Dosagem/análises

Summary

Ibrahim KY. *Intermittent HIV-1 viremia (blips) and virologic failure in patients under antiretroviral therapy : incidence and associated factors* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2010. 148p.

BACKGROUND: HIV-1-infected patients under antiretroviral therapy may present intermittent viremia (blip); however, predictors of this outcome and its influence on the incidence of virologic failure remain controversial in the literature. The aim of this study is to estimate the incidence of blip and virologic failure in a cohort of patients under stable antiretroviral therapy and to investigate their associated factors. Blip was defined as a plasma HIV-RNA load above 50 copies/mL followed by a subsequent value below 50 copies/mL. Virologic failure was defined as two consecutive measures of viral load above 50 copies/mL. Moreover, at time of occurrence of these outcomes, HIV genotyping assays were performed in search of drug resistance-associated mutations, and plasma concentrations of non-nucleoside reverse transcriptase and protease inhibitors assessed and compared with self-reported adherence to therapy. **METHODS:** 350 subjects (250 male and 100 female) were enrolled at the HIV Clinic, School of Medicine, University of São Paulo, Brazil and followed for 78 weeks. At baseline and in 3-month interval follow-up visits we collected sociodemographic data and information on presumed mode of HIV acquisition, use of and adherence to antiretrovirals, comorbidities and use of alcohol and illicit drugs. Additionally, patients were questioned about potential predictors of the outcomes, including occurrence of other diseases, immunizations and risky sexual behavior. Blood samples were drawn for assessment of HIV plasma viral loads, using ultrasensitive RT-PCR, and T CD4+ cell counts by flow cytometry. Individuals who presented blip and/or virologic failure were submitted to HIV genotyping assays and assessment of antiretroviral plasma concentrations by high-performance liquid chromatography. Incidences of blip and virological failure were estimated and associated factors investigated, using a multiple logistic regression model. **RESULTS:** The incidence of blip and of virologic failure were 9.4/100 and 4.2/100 person-years, respectively. Three individuals presented virologic failure after blip episodes. On multivariate analysis, non-adherence to safer sex measures in the previous month was shown independently associated with the occurrence of blip (OR 24.64, 95%CI 4.40 – 137.88, $p < 0.001$) and virologic failure (OR 24.69, 95%CI 4.20 – 145.18, $p < 0.001$). In addition, history of multiple exposures to antiretroviral regimens was also a predictor of blip (OR 1.82, 95%CI 1.41 – 2.36, $p < 0.001$) and virologic failure (OR 1.67, 95%CI 1.19 – 2.35, $p < 0.001$). Blips were not predictive of virologic failure. A larger number of HIV mutations were identified at time of virologic failure, as compared to blip episodes, with mutations detected predominantly in the reverse transcriptase (RT) gene, probably due to larger exposure to RT inhibitors. Eighty-four out of 122 assessments of antiretroviral plasma concentrations analyzed in 120 samples resulted in the therapeutic range. However, these results were concordant with self-reported adherence to

therapy in 69% of cases only. This study shows that a single blip episode may be considered benign, whereas virologic failure could result from accumulation of HIV drug resistance-associated mutations that may impair the efficacy of therapy. Both study outcomes occurred more frequently among patients with larger exposure to antiretrovirals, and therefore they should be monitored in this regard. An important contribution of this study concerns the assessment of antiretroviral plasma concentrations, a simple and low cost laboratory tool. Incorporated routinely in patient follow-up, it would help monitoring adherence to therapy and reduce the need for HIV genotyping assays.

Descriptors: 1.HIV-1 2.Intermittent viraemia 3.Incidence 4.Antiretroviral therapy 5.HIV viral load 6.Reverse transcriptase-polymerase chain reaction 7.Mutations 8.Dosage/Analysis

1 Introdução

A Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (aids) constitui-se na maior e mais grave epidemia do século XX. Segundo os últimos dados da Organização Mundial de Saúde, cerca de 33,4 milhões de pessoas viviam com HIV/aids em dezembro de 2008 e 2,7 milhões de novas infecções ocorreram no mundo somente naquele ano¹.

O interesse por essa epidemia propiciou, no curto período a partir de sua descrição inicial em 1981, grandes avanços científicos em relação à etiopatogenia, diagnóstico e tratamento da infecção pelo HIV propriamente dita, além do manejo das infecções oportunistas a ele relacionadas. No Brasil, os primeiros casos surgiram no estado de São Paulo, que é até hoje, responsável por uma parcela significativa da população infectada. Por outro lado, observou-se entre 1998 e 2007, uma queda significativa nas taxas de incidência de aids no estado de São Paulo, de 36,5 para 20,2 por 100.000 habitantes, tendência essa que não se confirma nas demais Unidades Federadas².

Indubitavelmente, o desenvolvimento do tratamento anti-retroviral específico e, mais particularmente, o uso combinado de drogas anti-retrovirais mais potentes (*highly active antiretroviral therapy* – HAART) levaram a considerarmos hoje a possibilidade de controle de uma doença que se apresentava, há duas décadas atrás, associada a baixa sobrevida³.

A terapia anti-retroviral baseia-se em conhecimentos sobre a fisiopatogenia da infecção pelo HIV, tendo como objetivo coibir a replicação

do agente. Nesse contexto, duas enzimas virais – a transcriptase reversa (TR) e a protease (Prot) – representam os sítios de ação de todo o arsenal terapêutico de que dispunhamos no Brasil durante o período de desenvolvimento do presente estudo. Eram utilizados rotineiramente em nosso país os inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleo(t)sídeos (INTR), tais como, Zidovudina (AZT), Didanosina (DDI), Lamivudina (3TC), Estavudina (D4T), Abacavir (ABV) e Tenofovir (TDF); os inibidores dessa enzima não análogos de nucleosídeos (INNTR), como a Nevirapina (NVP) e o Efavirenz (EFV); os inibidores de protease (IP), tais como o Nelfinavir (NFV), Indinavir (IDV), Ritonavir (RTV), Saquinavir (SQV), Amprenavir (APV), Lopinavir/Ritonavir (LPV/r) e os inibidores de fusão, como a Enfuvirtida⁴. Mais recentemente, outros anti-retrovirais (ARV) tornaram-se disponíveis e passaram a compor os esquemas terapêuticos, especialmente para pacientes em terapia de resgate – os inibidores de entrada, tais como os inibidores de CCR5 – Maraviroque⁵, além de inibidores da integrase, como o Raltegravir⁶.

Na maioria dos pacientes em uso de terapia anti-retroviral de alta potência (HAART) obtém-se supressão sustentada da replicação do HIV e, conseqüentemente, tais indivíduos passam a exibir concentrações plasmáticas de RNA viral inferiores a 50 cópias/mL (limiar de detecção dos testes ultrasensíveis baseados na reação em cadeia por polimerase precedida de transcrição reversa – RT-PCR). A redução da carga de RNA viral plasmático se faz de forma bifásica, inicialmente com declínio exponencial rápido (99%), refletindo a eliminação dos vírus livres e a perda

das células infectadas, seguida por uma queda mais lenta, correspondente à lise de células infectadas de vida longa e a ativação dos linfócitos latentemente infectados. O nadir da carga viral plasmática (CV) é um importante valor preditivo de supressão virológica⁷.

Raboud et al.⁸ observaram que nos pacientes infectados por HIV sob HAART, que obtêm CV indetectável, a resposta ao tratamento anti-retroviral é sustentada por tempo mais prolongado, quando comparados àqueles que mantêm níveis plasmáticos abaixo de 500 cópias/mL.

Por outro lado, mesmo em pacientes que conseguem manter carga viral plasmática abaixo de 20 cópias/mL de forma sustentada, pode-se verificar queda do número de células CD4+ no sangue periférico. Tal evidência é justificada pela manutenção da replicação viral em tecido linfóide, como por exemplo, nas tonsilas, representando tais territórios “santuários” da infecção⁹.

Dornadula et al¹⁰ demonstraram que mesmo pacientes com CV constantemente inferior a 50 cópias/mL apresentam evidência não apenas de discreta replicação viral em células mononucleares de sangue periférico, como também no próprio plasma sangüíneo.

Em contrapartida, nos pacientes que interrompem a terapia ou quando a potência de um esquema terapêutico é reduzida, elevações abruptas nas concentrações de RNA viral são observadas. Uma parcela menor de indivíduos não obtêm supressão completa da viremia plasmática, mantendo-se com concentrações detectáveis de RNA–HIV pelos métodos convencionais. Diversos fatores podem levar a uma baixa eficácia terapêutica.

Dentre eles destacam-se: 1) as características celulares próprias do portador do vírus, que o tornam naturalmente resistente a determinadas drogas; 2) a biodisponibilidade da droga no organismo, dependente de eventual interação medicamentosa, absorção, metabolização e excreção das mesmas; 3) a falta de adesão plena ao esquema terapêutico.

Excluídos tais fatores, as falhas terapêuticas podem ainda ser conseqüentes à resistência do vírus aos medicamentos. Estudos recentes mostram um significativo número de pacientes com falência virológica às combinações de drogas, o que em parte é explicado pelo desenvolvimento de resistência genotípica do HIV^{11,12}. Apesar do importante avanço na terapêutica anti-retroviral (TARV), nos últimos anos, a falência à HAART continua sendo um problema^{13,14}. Porém, é constatado que a maioria dos isolados virais não se torna resistente a todas as drogas simultaneamente e que, em virtude do desenvolvimento de resistência cruzada, pode surgir resistência genotípica a compostos ainda não administrados ao paciente¹⁵.

A avaliação da resistência genotípica do HIV depende de testes de amplificação molecular de seqüências nucleotídicas virais, que buscam identificar alterações genéticas capazes de modificar substancialmente a estrutura das proteínas virais, bloqueando ou diminuindo a eficiência com que as drogas inibem a replicação viral. As mutações identificadas como relacionadas à resistência às drogas foram classificadas em dois grupos: principais (ou primárias) e acessórias (ou secundárias).

Focalizando o seguimento evolutivo de pacientes com boa resposta à TARV, têm-se verificado escapes transitórios da CV para níveis

superiores a 50 cópias/mL em até 53% dos pacientes¹⁶. Tais elevações quando não excedem 200 a 1000 cópias/mL com subsequente supressão da mesma, de acordo com diferentes autores, vêm sendo denominada *blips*¹⁷⁻²⁴. Outros autores, contudo, definem *blips* como elevação única da CV com subsequente supressão da mesma, independentemente do valor observado^{16, 25-29}.

Estudos retrospectivos e prospectivos têm documentado a emergência de mutações de resistência a drogas, mesmo em pacientes recebendo HAART que apresentam supressão sustentada da replicação viral ou baixa viremia (definida como 20-1000 cópias/mL). Esses pacientes demonstram evidência de ativação imune e emergência de resistência genotípica e fenotípica, que pode acelerar o desenvolvimento de falência virológica e determinar viremia sustentada em altas concentrações^{17,19,21,25,27,28}. Porém, na prática clínica, esse fenômeno não é habitualmente observado, em função dos testes de genotipagem comercialmente disponíveis serem pouco sensíveis na presença de cargas virais inferiores a 1000 cópias/mL.

Ao contrário da baixa viremia persistente, a viremia transitória (*blip*) – parece ser um fenômeno comum e benigno. *Blips* isolados parecem ser inconseqüentes, mas *blips* repetidos ou de maior carga viral podem preceder falência virológica^{17,22,29,30}.

Alguns mecanismos podem ser aventados para explicar a ocorrência dos *blips* da carga viral plasmática durante o uso do esquema HAART. Primeiramente, deve-se considerar a possibilidade da viremia transitória ser decorrente de ativação do *pool* de células com infecção latente, resultando

na produção de novas partículas de HIV, e da replicação viral contínua, incluindo ou não o aparecimento e a seleção de novas cepas resistentes³⁰⁻³⁵, como ocorre, por exemplo, na vigência de infecções oportunistas^{36,37}, após administração de interleucina-2³⁸, ou mesmo após estímulo imunológico representado pelas imunizações contra o vírus da influenza ou anti-pneumocócica³⁹⁻⁴⁵. Outras explicações para esse fenômeno incluem flutuações aleatórias ao redor da média da carga viral menor que 50 cópias/mL ou variação estatística do método^{46,47}.

A possível associação da ocorrência de *blips* com falência virológica em longo prazo tem interesse do ponto de vista prognóstico⁴⁸, sobretudo a avaliação de uma provável associação desse evento com a falta de adesão ao tratamento^{23,25,27}. Para as doenças crônicas não infecciosas, aceita-se que adesão igual ou superior a 80% se relaciona com bons resultados terapêuticos, porém, no que se refere à TARV é necessária adesão de mais de 95% para se obter sucesso terapêutico sustentado em mais de 80% dos pacientes^{49,50}.

O monitoramento da adesão aos ARV pode se basear no auto-relato dos pacientes acerca das tomadas regulares da medicação, ou em técnicas de avaliação mais objetivas já disponíveis, que podem ser colocadas em prática, tais como, uso de dispositivo de monitoramento eletrônico - MEMS (*Medication Event Monitoring System*)⁵¹, contagem de comprimidos, uso de dados referentes à retirada de medicamentos na farmácia⁵². O seguimento do tratamento por meio da determinação das concentrações plasmáticas das drogas anti-retrovirais traz uma idéia precisa da otimização e da adesão dos

pacientes ao uso adequado das medicações⁵³. O princípio dessa técnica é baseado na relação entre as concentrações plasmáticas dos anti-retrovirais (IPs e INNTRs) e a eficácia anti-retroviral resultante, por um lado, e certos efeitos indesejáveis, por outro lado, contribuindo assim para a noção de intervalo terapêutico⁵⁴⁻⁶¹. Cabe ressaltar que a dosagem plasmática dos INNTRs e dos IPs é indicada, na prática clínica em outros países, como, por exemplo, a França, nas seguintes situações: em caso de interação medicamentosa já conhecida; nos pacientes co-infectados por vírus da hepatite B e C, mesmo na ausência de elevação de transaminases, e também nos casos com insuficiência hepática; nos pacientes com extremos de peso corpóreo; nas gestantes, em particular nas que iniciaram o tratamento durante a gestação ou que apresentaram falência terapêutica durante a gestação; nos casos de má absorção; casos de insuficiência renal dialítica ou não-dialítica⁵³. A dosagem intracelular dos metabólitos dos INTRs, por sua vez, tem seu uso atualmente restrito visando à pesquisa, pois ainda não foi estabelecido o valor clínico dessas dosagens.

O seguimento clínico de pacientes em terapia anti-retroviral monitorado pela determinação das concentrações plasmáticas dos IPs e dos INNTRs tem se apresentado cada vez mais como um meio simples, rápido e pouco custoso de avaliação de ineficácia do tratamento antiviral. Este é o primeiro estudo brasileiro que utilizou tal ferramenta para análise de adesão dos participantes em estudo.

Enquanto em determinadas circunstâncias, a replicação do HIV observada no episódio de *blip* é contida pela continuidade da administração

da HAART sem conseqüente impacto na gênese de resistência viral à droga, em outros casos verifica-se a diminuição da inibição da replicação do HIV, com conseqüente supressão subótima da viremia e surgimento de isolados virais replicantes com mutações relacionadas à resistência a drogas anti-retrovirais.

Face às lacunas ainda existentes no conhecimento da relevância clínico-epidemiológica dos eventos de viremia transitória de HIV em pacientes sob TARV em nosso meio, elaborou-se este estudo, com a finalidade de estimar a incidência de *blip* e falência virológica e investigar possíveis fatores associados a esses eventos.

2 Objetivos

- 1) Estimar a incidência de *blip* e de falência virológica em pacientes que fazem uso de esquemas anti-retrovirais.
- 2) Investigar associação entre ocorrência de *blip* e fatores relacionados ao paciente (variáveis sócio-demográficas), ao tratamento (esquemas anti-retrovirais utilizados e auto-relato de adesão à terapia) e a outros eventos (imunizações ou infecções concorrentes).
- 3) Investigar fatores associados à ocorrência de falência virológica, entre variáveis sócio-demográficas, esquemas anti-retrovirais utilizados e auto-relato de adesão à terapia, outros eventos (imunizações ou infecções concorrentes) e ocorrência de *blip*.
- 4) Descrever as mutações genóticas encontradas na região *pol* do genoma do HIV nos casos que apresentaram *blip* e/ou falência virológica, bem como os subtipos virais.
- 5) Determinar a concentração plasmática dos medicamentos anti-retrovirais nos seguintes momentos
 - precedente ao evento *blip* ou à falência virológica
 - nos eventos *blip* ou falência virológica, associando-as, quando possível, à presença de mutações genóticas virais conferidoras de resistência medicamentosa e aos esquemas anti-retrovirais em uso por esses indivíduos.

- 6) Avaliar a concordância entre o auto-relato de adesão ao tratamento anti-retroviral e as concentrações plasmáticas de medicamentos inibidores não nucleosídicos da transcriptase reversa e inibidores da protease viral.

3 Métodos

3.1 Caracterização da população estudada

O presente estudo foi realizado, tendo como sujeitos adultos vivendo com HIV/aids em tratamento anti-retroviral, atendidos no Serviço de Extensão ao Atendimento de Pacientes com HIV/AIDS - Casa da AIDS - da Divisão de Clínica de Moléstias Infecciosas e Parasitárias do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (SEAP-HCFMUSP). Trata-se de um ambulatório especializado no cuidado integral a adultos que vivem com HIV/aids, localizado na região central de São Paulo. No momento do desenvolvimento do presente estudo, 3.500 sujeitos eram seguidos nesse serviço, dos quais 3.000 se encontravam sob uso de TARV. A maior parte dos indivíduos pertencia ao sexo masculino, a via de transmissão presumida de HIV predominante era sexual e, entre os homens, predominavam homens que fazem sexo com homens. A população de usuários do ambulatório era multiexperimentada à TARV, como descrito em estudo de Gutierrez et al⁶², que investigou a co-infecção HIV-tuberculose na unidade. Segundo esses autores 92,1% dos participantes da pesquisa estavam sob uso de TARV, dos quais, 50,8% haviam experimentado, pelo menos, três esquemas terapêuticos distintos. Por outro lado, existe uma parcela significativa de indivíduos atendidos no serviço que se mantêm com CV indetectável, apesar do longo tempo de infecção.

3.2 Desenho do estudo

Estudo de coorte prospectiva.

3.3 Definição dos desfechos de interesse

Durante o acompanhamento na coorte os eventos considerados como desfechos do estudo incluíram:

- Escape transitório da viremia de HIV (*blip*): detecção de CV superior a 50 cópias/mL com CV subsequente inferior a 50 cópias/mL (indetectável)
- Falência virológica: detecção de duas amostras consecutivas com CV superior a 50 cópias/mL

Ambos os desfechos foram caracterizados de forma dicotômica, segundo ocorrência de *blip* (sim ou não), ou de falência virológica (sim ou não).

3.4 Definição das variáveis independentes de interesse

As variáveis independentes de interesse no presente estudo incluíram:

a) Características sócio-demográficas:

- idade: variável contínua
- sexo
- cor da pele (auto-referida)
- escolaridade: categorizada em estratos (inferior a 8 anos; 8-11 anos; superior a 11 anos de estudo)

b) Variáveis relacionadas à infecção pelo HIV:

- forma presumida de aquisição da infecção por HIV
- possui parceiro fixo também infectado por HIV: sim ou não
- tempo de diagnóstico da infecção por HIV (em meses): variável contínua
- número de esquemas anti-retrovirais já utilizados
- número de trocas de esquemas anti-retrovirais por resistência medicamentosa
- adesão à terapia anti-retroviral (tomou todas as doses prescritas, na semana precedente?): sim ou não
- adesão a práticas de sexo mais seguro: sim ou não
- determinação quantitativa de células T CD4+ (número de células/mm³) à admissão no estudo: variável contínua
- carga viral plasmática de HIV (cópias de RNA-HIV/mL) no momento do desfecho: variável contínua
- terapia anti-retroviral (esquema em uso): somente ITRN, ITRN + ITRNN, ITRN + IP, outro

c) Outras variáveis clínicas e hábitos:

- doença de base: sim ou não
- faz uso de outras medicações: sim ou não
- tomou vacina no mês precedente: sim ou não
- infecção concorrente no mês precedente: sim ou não
- diarreia no mês precedente: sim ou não
- uso de drogas ilícitas no mês precedente: sim ou não
- uso de álcool no mês precedente: sim ou não

3.5 Cálculo do tamanho da amostra

Para efeito de cálculo do tamanho amostral estimou-se a ocorrência de *blip* em 39%, com evidências da literatura da época, que demonstraram frequência de 25-53%³². Baseado nesses dados, considerando um universo populacional de 3.000 pacientes em terapêutica anti-retroviral atendidos no serviço, uma margem de erro de $\pm 5\%$ em relação à frequência estimada do desfecho, nível de significância estatística de 5% e poder estatístico de 80%, calculou-se que seriam necessários 326 indivíduos. Além disso, levou-se em conta o fato da genotipagem para HIV ser menos eficiente quando realizada em pacientes com carga viral baixa. Estimou-se que a sensibilidade da genotipagem pela técnica empregada estivesse em torno de 81%, cálculo esse baseado no estudo de Mackie et al⁶³, em que houve falha no

seqüenciamento em 13 entre 68 amostras analisadas com carga viral abaixo de 300 cópias/mL (19,1%). Em vista disto, planejou-se recrutar 350 indivíduos para o estudo.

3.6 Seleção dos indivíduos

Foram considerados elegíveis para o presente estudo os sujeitos que preenchessem os seguintes critérios:

- a) Idade igual ou superior a 18 anos;
- b) Diagnóstico sorológico de infecção por HIV, segundo critérios estabelecidos pelo Ministério da Saúde, que incluem sororreatividade em ensaio imunoenzimático, seguida de confirmação da soropositividade com base em padrões de reatividade ao teste de *Western blot*⁶⁴;
- c) Estar em acompanhamento ambulatorial no SEAP-HCFMUSP;
- d) Estar em uso de anti-retrovirais;
- e) Ter apresentado duas cargas virais plasmáticas indetectáveis, com intervalo de no mínimo 2 meses entre elas, com base na técnica ultrasensível de quantificação do RNA de HIV-1 (Amplicor HIV-1 Monitor versão 1.5 - *Roche Diagnostic*, Chicago – EUA, de acordo com as instruções do fabricante), cujo limite de detecção é de 50 cópias de RNA do HIV/mL.

Na estratégia para inclusão de sujeitos para o estudo, realizou-se entre os meses de outubro e novembro de 2004, como etapa de pré-seleção, uma busca no banco de dados disponível no Laboratório de Investigação Médica em Virologia (LIM-52) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP (HC-FMUSP), responsável pela realização de exames laboratoriais para monitoramento evolutivo da carga viral plasmática de HIV e da determinação quantitativa de células CD4+ periféricas dos pacientes em acompanhamento ambulatorial no SEAP-HCFMUSP. Procurou-se identificar adultos (idade igual ou superior a 18 anos) que possuíam a última determinação de CV, realizada pelo método *standard* de RT-PCR, seguindo-se as recomendações do fabricante (Amplicor, Roche, Chicago, EUA), com resultado inferior a 400 cópias de RNA-HIV/mL.

Tais pacientes tiveram suas duas avaliações subseqüentes de carga viral plasmática de HIV, realizadas rotineiramente no serviço com intervalo de pelo menos dois meses entre as coletas, analisadas pelo método ultrassensível de detecção de RNA viral por RT-PCR, (Amplicor HIV-1 Monitor versão 1.5 - *Roche Diagnostic*, Chicago, EUA), cujo limite de detecção é de 50 cópias de RNA-HIV/mL, seguindo-se as recomendações do fabricante.

Os indivíduos que apresentaram ambas CV inferiores a 50 cópias/mL foram então convidados pelo investigador a participar do estudo, seja por meio de contato telefônico ou por abordagem direta no momento em que compareceram ao serviço para coleta rotineira de exames laboratoriais de monitoramento evolutivo.

Entre julho de 2005 e junho de 2006 foram assim selecionados, de forma consecutiva, 350 sujeitos para participar da coorte prospectiva. A figura 1 resume de forma esquemática as etapas de seleção dos sujeitos para inclusão no estudo.

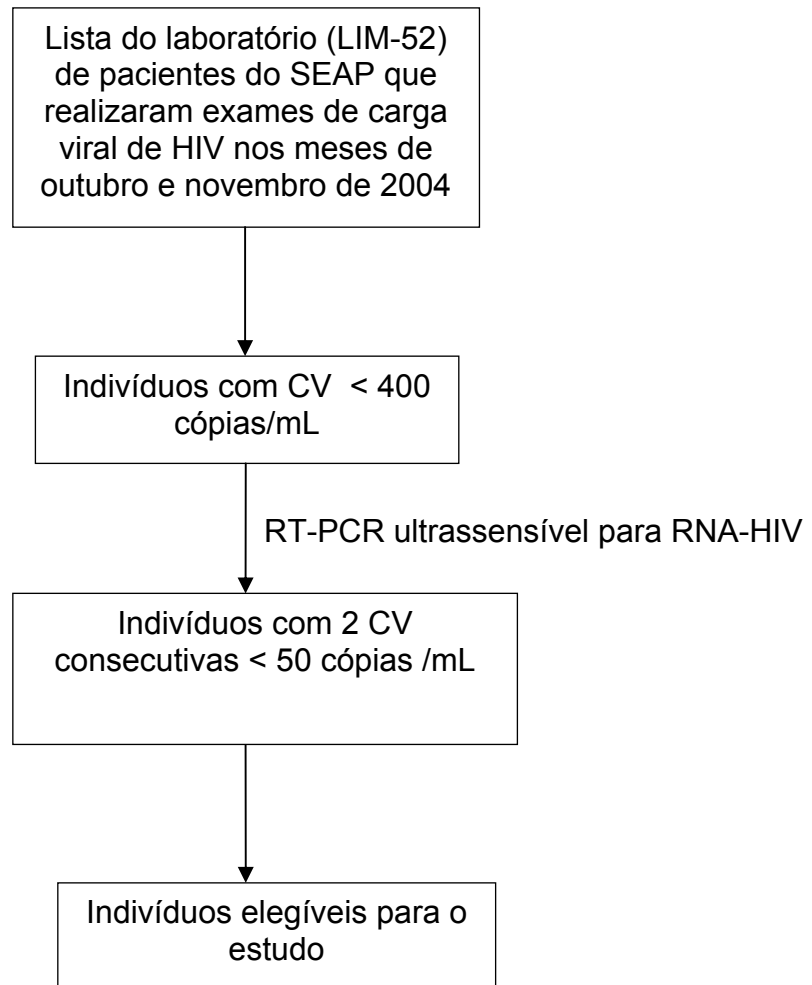


Figura 1 - Fluxograma de seleção dos indivíduos incluídos no estudo. SEAP-Casa da AIDS, HC-FMUSP São Paulo, 2005 - 2007

3.7 Procedimentos do estudo

3.7.1 Avaliação dos sujeitos na linha de base da coorte

Após a seleção acima descrita, os indivíduos considerados elegíveis foram abordados por ocasião de seu comparecimento ao serviço para coletas de exames de rotina ou convidados em contato telefônico a comparecer ao SEAP, ocasião em que o investigador apresentou-lhes o projeto de pesquisa, convidou-os a participar do mesmo e obteve assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 1) dos que concordaram.

Em seguida, os indivíduos foram submetidos à primeira entrevista com o pesquisador responsável para coleta de dados referentes à linha de base da coorte. Esses incluíram variáveis sócio-demográficas, informações acerca da forma de aquisição do HIV, do uso de e adesão a medicações anti-retrovirais e investigação da existência de outras comorbidades, bem como uso de álcool e de drogas ilícitas. Foram ainda questionados sobre fatores potencialmente associados com aumento transitório da viremia, tais como presença de outras doenças concorrentes, exposição recente a imunizações e falhas de adesão a práticas de sexo mais seguro (Anexo 2, Tabela 1).

Na primeira visita do estudo os sujeitos foram ainda submetidos a nova coleta de amostra de sangue periférico em tubos contendo EDTA para determinação de CV pelo método de RT-PCR ultrasensível, imunofenotipagem de linfócitos T periféricos por citometria de fluxo e armazenamento de amostras biológicas a -80°C para posterior processamento

da genotipagem de HIV e dosagem sérica dos anti-retrovirais em uso, nos casos que essas se fizeram necessárias, segundo o protocolo de pesquisa.

3.7.2 Avaliação dos sujeitos durante o seguimento da coorte

Para o acompanhamento na coorte os pacientes foram convidados a comparecer a cinco novas visitas no ambulatório do SEAP-HCFMUSP em intervalos de 90 dias, perfazendo seguimento total de 78 semanas, ou até a ocorrência do desfecho falência virológica. Em todas as visitas foram novamente entrevistados pelo investigador para registro das variáveis de interesse e submetidos a novas coletas de sangue periférico para avaliação laboratorial evolutiva, que incluiu determinações quantitativas das concentrações plasmáticas de RNA-HIV e de células CD4+ e CD8+ (Anexo 2).

Tabela 1 - Conteúdo do formulário aplicado com intervalos de 3 meses (\pm 1 mês) após a inclusão no estudo

Variáveis	Visita 1	Visita 2 a 6
Sócio-demográficas	X	
Modo de aquisição do HIV	X	
Adesão auto-referida aos ARV	X	X
Manifestações clínicas	X	X
Infecções concorrentes	X	X
Vacinas	X	X
Medicamentos concomitantes	X	X
Adesão às práticas de sexo mais seguro	X	X
Carga viral plasmática de HIV	X	X
Determinação quantitativa de células T CD4+	X	X
Genotipagem	S/N	S/N
Dosagem plasmática	S/N	S/N

S/N: se necessário, de acordo com o protocolo da pesquisa

Todas as determinações da CV pelo método ultrasensível foram processadas conforme as recomendações do fabricante pelo Laboratório de Investigação Médica em Virologia (LIM-52) do HC-FMUSP, que também se incumbiu da imunofenotipagem de linfócitos T periféricos CD4+ e CD8+ por técnica de citometria de fluxo (FACS Calibur).

Cabe destacar que os indivíduos que apresentaram CV detectável somente na sexta visita foram convocados para uma sétima visita adicional com intuito de definir a qual grupo de desfecho pertenceriam - *blip* ou falência virológica.

Nos eventos de *blip* e de falência virológica procurou-se realizar a genotipagem de HIV. A análise genotípica das seqüências de HIV foi inicialmente realizada no Laboratório de Virologia (LIM-52) do HC-FMUSP e em seguida, devido às dificuldades técnicas encontradas no desenvolvimento do trabalho, procedeu-se a um novo estudo das amostras, após envio das mesmas ao Laboratório de Virologia do Hospital Pellegrin da Universidade Victor Segalen – Bordeaux 2, França. Essas análises foram realizadas pelo investigador, após treinamento intensivo na técnica localmente utilizada, a partir de amostras de sangue da rotina do laboratório em questão. O estudo genotípico viral foi conduzido após extração de RNA viral do plasma sangüíneo.

Alíquotas adicionais de plasma que haviam sido armazenadas a -80°C foram também enviadas ao Laboratório de Farmacocinética e Farmacologia Clínica do Hospital Haut-Lévêque da Universidade Victor Segalen – Bordeaux 2, França, para avaliação da concentração plasmática

de anti-retrovirais em uso pelo indivíduo, nos eventos *blip* e nas falhas virológicas. Para essa determinação foi adotado o método de HPLC (*High Performance Liquid Chromatography* - Cromatografia Líquida de Alta Performance) acoplado à detecção por ultravioleta dos inibidores da protease e inibidores da transcriptase reversa não-análogos de nucleosídeos^{56,59,60}. A avaliação farmacológica foi conduzida também pelo investigador, após aprendizado teórico e treinamento prático realizado com amostras da rotina desse laboratório.

3.8 Protocolos laboratoriais

3.8.1 Determinação da carga viral plasmática de HIV

A carga viral para HIV foi processada a partir de amostras de sangue total coletadas em tubo contendo EDTA e processadas em até 6 horas após a coleta. Tanto o método *standard* quanto o ultrasensível foram baseados em cinco processos: preparação da amostra; transcrição reversa do RNA alvo para DNA complementar (DNAc); amplificação por PCR do DNAc alvo, usando *primers* complementares específicos do HIV-1; hibridação do DNA amplificado com sondas de oligonucleotídeos específicas ao alvo e detecção de DNA amplificado ligado a sonda pela determinação colorimétrica. A técnica de quantificação do HIV-1 da *Roche Diagnostic*, denominada Amplicor HIV-1 Monitor versão 1.5, permite a avaliação de amostras numa variação de

detecção linear de 50 a 750.000 cópias/mL. Foram separados, por centrifugação, 500µL de plasma (de acordo com a metodologia utilizada – *Standard* ou ultrasensível), nos quais se procedeu à extração do RNA viral juntamente com um controle interno da reação - padrão de qualificação interno (QS). Após a extração, o material foi amplificado e detectado pelo Cobas Amplicor HIV-1 Monitor (*Roche Diagnostic*, Chicago, EUA). Através de centrifugação prévia de 500µL de plasma, obteve-se um concentrado de RNA viral, que foi utilizado no procedimento pelo método ultrasensível, seguindo a técnica de extração com alteração apenas nos volumes dos controles, os quais foram reduzidos. A amplificação e detecção seguiram a metodologia *Standard*, obtendo um volume de reposição em suspensão de 100µL.

3.8.2 Quantificação dos linfócitos T CD4+ periféricos

Foi realizada a partir de amostras de sangue coletadas em tubo contendo EDTA e processadas em no máximo 6 horas após a coleta. A técnica realizada foi a citometria de fluxo, na qual 50µL da amostra foram incubados por 15 minutos, a temperatura ambiente, em tubos *True Count* (Becton Dickinson Immunodiagnostic Systems, BDIS, New Jersey, EUA) juntamente com 20µL de anticorpos monoclonais específicos. Após esse tempo, foram adicionados 450µL de solução de lise FACS *Lysing Solution* (BDIS). Essa mistura foi homogeneizada e incubada por 15 minutos a temperatura ambiente. As amostras foram então analisadas em citômetro de fluxo FACS Calibur com o auxílio do programa Multitest (BDIS).

3.8.3 Genotipagem de seqüências de HIV

Inicialmente, foi realizada por meio da extração de RNA viral a partir de plasma sangüíneo. A versão 2.0 da *Abbott Viroseq* (Illinois, EUA) foi utilizada para analisar seqüências na região *pol* do HIV-1, que normalmente é preconizada para os indivíduos com carga viral superior a 2.000 cópias/mL. Assim, resumidamente, o vírus foi extraído de 1,0 mL de plasma e concentrado por centrifugação a 23.000 x g por 90 minutos a 4°C com obtenção do *pellet*, e o RNA extraído do módulo de extração proveniente do *kit*, constituindo alvo para a transcrição. Em seguida, o RNA extraído foi submetido à amplificação, usando os *primers* do sistema de genotipagem ABI *Viroseq* HIV-1 da *Abbott*, versão 2.0. Cinco µL do produto obtido na primeira etapa de amplificação da PCR foram submetidos a uma segunda amplificação por PCR, utilizando os *primers* A e H do módulo de seqüenciamento do *kit Viroseq* Versão 2.0. Para tal procedimento, foram empregados 1 x buffer de PCR (*Invitrogen*, Califórnia, EUA), 1,5mM MgCl₂, 0,2mM de cada desoxiribonucleotídeo, 0,3µM de cada *primer* e 2,5 unidades de *AmpliTaq gold* (*Invitrogen*, Califórnia, EUA). As amostras foram submetidas a um único ciclo a 93°C por 12 minutos e em seguida, 40 ciclos de 93°C por 20 segundos, 64°C por 45 segundos e 66°C por 3 minutos, seguidos por um único ciclo de 72°C por 10 minutos, com a temperatura final mantida a 4°C. O produto final da RT-PCR foi visualizado em gel de agarose a 1% e purificado, seguindo-se as recomendações do fabricante. Em seguida procedeu-se ao seqüenciamento às análises do *software* da *Viroseq* HIV-1 versão 2.0. Finalmente, as seqüências foram subtipadas, usando o banco de dados de resistência genotípica de HIV-1 da Universidade de Stanford⁶⁵.

Uma segunda técnica de genotipagem foi aplicada, visto que houve falha na detecção das seqüências na maioria das amostras analisadas, devido ao fato da maioria delas apresentar CV inferior a 1.000 cópias de RNA-HIV/mL. Inicialmente, 1 mL de cada amostra foi transferido para um tubo estéril Sarstedt e submetido à ultracentrifugação a 4°C e a 23.500 x g durante 1 hora. Em seguida, com a utilização do *kit* comercial QIAmp Viral RNA Mini *Kit* (*Qiagen*, Califórnia, EUA), a extração do RNA viral foi realizada e sucedida pela amplificação do mesmo por RT-PCR, utilizando os genes da transcriptase reversa (TR) – códons 1 a 240 – e da protease (Prot) – códons 1 a 99, em duas combinações de *primers* 5µL cada e o uso do *kit* TITAN I (*Roche Diagnostics*, Mannheim, Alemanha), sendo a reação processada no aparelho termociclador GeneAmp PCR System 9700 (*Applied Biosystems*, Foster City, EUA) segundo o programa abaixo de duração de 3 horas e 30 minutos:

50°C durante 30 minutos

94°C durante 2 minutos

40 ciclos de $\left\{ \begin{array}{l} 94^\circ\text{C durante 30 segundos} \\ 55^\circ\text{C durante 30 segundos} \\ 68^\circ\text{C durante 1 minuto e 30 segundos} \end{array} \right.$

68°C durante 7 minutos

8°C ao infinito

Os *primers* externos da transcriptase reversa (TR) foram MJ3 (5' – AGT AGG ACC TAC ACC TGT CA – 3') e MJ4 (5' – CTG TTA GTG CTT TGG TTC CTC T – 3') ou RT18 (5' – GGA AAC CAA AAA TGA TAG GGG GAA TTG GAG

G – 3') e RT21 (5' – CTG TAT TTC TGC TAT TAA GTC TTT TGA TGG G – 3') e para a protease (Prot) foram 5' PROT1 (5' – TAA TTT TTT AGG GAA GAT CTG GCC TCC C – 3') e 3' PROT1 (5' – GCA AAT ACT GGA GTA TTG TAT GGA TTT TCA GG – 3') ou 5' eprB (5' – AGA GCT TCA GGT TTG GGG – 3') e 3' eprB (5' – GCC ATC CAT TCC TGG CTT – 3'). Para tal reação, foi utilizado um controle negativo apenas contendo o *mix* da reação.

Dois μL do produto da PCR associados a 98 μL do mix preparados com a utilização do *kit AmpliTaq Gold* foram submetidos a uma *nested* PCR. Os *primers* internos para a TR foram A(35) (5' – TTG GTT GCA CTT TAA ATT TTC CCA TTA GTC CTA TT – 3') e NE1(35) (5' – CCT ACT AAC TTC TGT ATG TCA TTG ACA GTC CAG CT – 3'), ou RT1 (5' – CCA AAA GTT AAA CAA TGG CCA TTG ACA GA – 3') e RT4 (5' – AGT TCA TAA CCC ATC CAA AG – 3') e para a Prot foram 5' PROT2 (5' – TCA GAG CAG ACC AGA GCC AAC AGC CCC A – 3') e 3' PROT2 (5' – AAT GCT TTT ATT TCT TCT GTC AAT GGC – 3') ou 5' prB (5' – GAA GCA GGA GCC GAT AGA CA – 3') e 3' prB (3' – ACT GGT ACA GTT TCA ATA GG – 3'). Dois controles negativos foram utilizados, um deles representado por 2 μL do controle negativo da primeira rodada de amplificação por PCR e o segundo pelo *mix* da *nested* PCR. O programa utilizado com duração de 3 horas e 30 minutos é descrito abaixo:

94°C durante 12 minutos

40 ciclos de $\left\{ \begin{array}{l} 94^\circ\text{C durante 30 segundos} \\ 55^\circ\text{C durante 30 segundos} \\ 72^\circ\text{C durante 2 minutos} \end{array} \right.$

72°C durante 7 minutos

8°C ao infinito

Em seguida, a detecção do DNA amplificado foi feita em gel de agarose a 1,5%, sendo as amostras misturadas com azul de metileno e depositadas nos orifícios próprios, além de 5 µL do marcador de peso molecular depositados no orifício reservado. Após corrida eletroforética com voltagem em torno de 120 volts por 15-20 minutos, a revelação da presença ou ausência de DNA era feita através do depósito do gel sobre a placa para detecção por ultravioleta.

As amostras que obtiveram DNA detectável foram submetidas à etapa de purificação para, em seguida, serem seqüenciadas em seqüenciador automático, utilizando o *kit* CEQ DTCS *Quick Start* no *software* versão 6.0 (Beckman Coulter, Inc., Fullerton, EUA) e a análise das substituições dos aminoácidos registrada em relação à seqüência do vírus selvagem HXB2, no Laboratório de Virologia do Hospital Pellegrin da Universidade Victor Segalen Bordeaux 2, como previamente descrito⁶⁶. Devido aos baixos valores de carga viral apresentados pela maioria das amostras, foram utilizados 10 µL de DNA purificado em vez de 6 µL, junto com o *mix* preparado com a utilização do *kit* de seqüência SEQ DTCS *Quick Start Kit* da Beckman Coulter (Foster City, EUA). Os *primers* utilizados da reação foram os mesmos *primers* internos utilizados na reação de *nested* PCR. O programa de reação de seqüência foi HIV_CEQ.CYC, descrito a seguir:

30 ciclos {

- 20 segundos a 96°C → Separação dos braços 3' 5'
- 20 segundos a 50°C → Hibridação
- 4 minutos a 60°C → Elongação
- a 4°C ao infinito

A determinação dos subtipos virais foi baseada na seqüência de nucleotídeos derivados das regiões da Prot e da TR, após alinhamento das mesmas com cepas referência do grupo M e N do banco de dados de gene de HIV-1⁶⁷, empregando-se o *software* Clustal 1.74 *Multiple Sequence Alignments*. Os dendogramas gerados foram visualizados com auxílio dos softwares *Njplot* e *MacDraw Pro*. As mutações relacionadas à resistência viral foram registradas de acordo com o algoritmo da *International AIDS Society (IAS)*⁶⁸.

3.8.4 Determinação da concentração plasmática de anti-retrovirais

A dosagem plasmática dos anti-retrovirais pode ser realizada em qualquer amostra, desde que a última tomada da medicação tenha sido feita com intervalo inferior a 24 horas do momento da coleta. Entretanto, para a adequada interpretação, o horário da coleta assim como o horário da última tomada da medicação deve estar anotado na ficha de exame laboratorial para que o farmacêutico ou clínico responsável pela interpretação dos resultados possa ter subsídios para a realização da interpretação correta de acordo com os níveis de corte pré-estabelecidos das concentrações mínima e máxima.

Os princípios ativos das drogas empregados para as análises farmacológicas foram fornecidos pelos próprios fabricantes dos fármacos, sob diversas formas químicas, seja em forma de base ou de sal.

A determinação das concentrações de ARV foi efetuada pelo método de HPLC com fase reversa para determinação quantitativa dos IPs e INNTRs no plasma humano. Essa técnica se baseia em uma fase de pré-tratamento através de uma extração sólido-líquida, seguida de recuperação do fármaco para sua análise e detecção do mesmo no cromatógrafo com ultravioleta. Em seguida, passa-se à interpretação dos resultados. Para tal, é necessária a anotação de dados concorrentes como: outras medicações em uso, os anti-retrovirais em uso a serem analisados, data e horário da última dose administrada, assim como data e horário da coleta da amostra analisada. Os resultados foram avaliados de acordo com os parâmetros pré-estabelecidos, segundo a zona de concentração plasmática residual ou pico dos INNTRs e IPs habitualmente eficazes sobre os vírus sensíveis, conforme apresentado no quadro 1.

Quadro 1 - Intervalo de concentração residual adequada para os diversos anti-retrovirais das classes INNTR e IP

Medicamento	C _{máx}	Dosagem (ng/mL)	C _{min}	Dosagem (ng/mL)	C _{min} alvo para Vírus selvagem
Nevirapina	1h após 200 mg	6.500 ± 1.800	12h após 200 mg	4.500 ± 1.900	4.000-8.000
Efavirenz	1h após 600 mg	4.100 ± 1.200	24h após 600 mg	1.700 ± 1.000	1.000-4.000
Indinavir	1h após 800 mg	7.930 (± ?)	8h após 800 mg	150 (50-300)	150-800
Nelfinavir	3h após 1250 mg	3.000-4000	12h após 1250 mg	1.000-3000	1.000-4.000
(Fos)Amprenavir*	1,5h após 700 mg	5.380-6.860	12h após 700 mg	1.770-2.540	800-3.000
Lopinavir/r**	4h após 400 mg	8.000-10.000	12h após 400 mg	3.000-5.000	3.000-8000
Atazanavir***	3h após 300 mg	5.233 ± 3.033	24h após 300 mg	862 ± 638	200-1000

* Fosamprenavir 700 mg+ Ritonavir 100 mg

** Concentração Lopinavir; r = ritonavir 100mg

*** Atazanavir 300 mg + Ritonavir 100mg

3.9 Análise dos Resultados

Os dados obtidos nas entrevistas e os resultados dos exames laboratoriais realizados foram inseridos em banco de dados informatizado, empregando-se o programa computacional EpiData 3.1.

3.9.1 Incidência de *blip* e de falência virológica

As freqüências dos desfechos do estudo *blip* e falência virológica foram calculadas com base na razão entre o número de eventos de interesse observados e o total de pacientes analisados. As densidades de incidência dos desfechos *blip* e falência virológica foram estimadas em relação a 100 pessoas-ano de seguimento clínico-laboratorial. Para o cálculo do tempo total de seguimento e da densidade de incidência de falência virológica, o seguimento foi considerado até a ocorrência desse desfecho. Para o cálculo da densidade de incidência de *blip*, o tempo total de seguimento dos indivíduos que apresentaram *blip* foi considerado até o momento do acontecimento do primeiro *blip*.

3.9.2 Pesquisa de fatores associados aos desfechos

Para a investigação de fatores associados à ocorrência dos desfechos de interesse do estudo, inicialmente compararam-se os indivíduos que apresentaram eventos de *blip* durante o seguimento na coorte com

aqueles que se mantiveram sempre avirêmicos, no tocante às variáveis sócio-demográficas, modo de aquisição do HIV, adesão auto-referida à terapia anti-retroviral, manifestações clínicas observadas durante o seguimento, infecções concorrentes, vacinas administradas no mês precedente à visita, medicações concomitantes, adesão às práticas de sexo mais seguro, esquema anti-retroviral em uso, número de trocas de esquemas anti-retrovirais por resistência viral, número de esquemas anti-retrovirais já utilizados e tempo de infecção por HIV.

As mesmas variáveis independentes foram investigadas quanto à sua possível associação com a ocorrência de falência virológica, tomando-se desta feita como grupo controle o conjunto de indivíduos que apresentaram *blip* e que se mantiveram avirêmicos durante o seguimento da coorte. Cabe ainda destacar que a ocorrência de *blip* foi incluída como variável independente na avaliação de preditores do desfecho falência virológica.

Para os pacientes avirêmicos foram consideradas para a análise todas as variáveis independentes de interesse como observadas no momento inicial do estudo (visita 1). Para os pacientes que apresentaram desfechos (*blip* e falência virológica), utilizaram-se para a análise as variáveis sócio-demográficas e categoria de exposição, com dados obtidos na primeira visita e para, as demais variáveis independentes de interesse os valores observados no momento de ocorrência do desfecho.

Cabe esclarecer que para os indivíduos que apresentaram falência virológica, as variáveis independentes de interesse analisadas corresponderam às observadas no segundo momento consecutivo de detecção de viremia

superior a 50 cópias/mL, ou seja, no momento em que se definiu a falência virológica.

Os sujeitos que apresentaram mais de um *blip* foram considerados para análise apenas na ocorrência do primeiro episódio de escape da viremia. Os participantes que abandonaram o estudo antes da definição do desfecho que iriam apresentar, ou seja, aqueles que apresentaram no seu último comparecimento à visita de acompanhamento da pesquisa uma carga viral superior a 50 cópias/mL sem uma dosagem consecutiva que permitisse classificá-los em algum dos desfechos estudados foram excluídos da análise.

Para a comparação entre grupos, as variáveis independentes de interesse, quando categóricas, foram descritas segundo cada desfecho com uso de frequências absolutas e relativas e realizados testes de associação entre as variáveis e cada desfecho, conforme a categorização adotada no estudo, com uso de testes qui-quadrado, ou testes da razão de verossimilhanças (para amostra insuficiente com mais de duas categorias na variável) ou testes exatos de Fisher (para amostras insuficientes com apenas duas categorias na variável)⁶⁹.

As variáveis numéricas foram descritas segundo cada desfecho de interesse e comparados os valores de idade entre os pacientes com uso de testes t-Student⁷⁰ e para as demais variáveis, teste Mann-Whitney⁷¹. As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio dos *softwares* Microsoft® Excel 2003 e SPSS versão 15.0, tendo sido adotado o nível de significância igual a 5%.

Em seguida, passou-se ao modelo de regressão logística múltipla⁷² com intuito de identificar os fatores independentemente associados à presença dos desfechos *blip* e falência virológica. Na construção de tais modelos foram incluídas todas as variáveis que apresentaram níveis de significância abaixo de 0,2 ($p < 0,2$) na análise bivariada inicial. Optou-se pelo cálculo das razões de chance (*odds ratio* - OR) para cada uma das variáveis explanatórias, com cálculo de seus respectivos intervalos de confiança 95% (IC_{95%}) como medidas de associação entre essas e a ocorrência de *blip* ou falência virológica. Permaneceram no modelo final as variáveis que apresentaram níveis de significância abaixo de 5% ($p < 0,05$).

3.9.3 Descrição das mutações genotípicas em seqüências de HIV identificadas por ocasião dos desfechos avaliados

As mutações identificadas no genoma do HIV nas amostras de sangue coletadas por ocasião dos desfechos do estudo (*blip* e falência virológica) foram descritas e interpretadas no tocante à sua associação com resistência aos medicamentos ARV de acordo com o algoritmo preconizado pela IAS em dezembro de 2009⁶⁸. Segundo tal diretriz, as mutações no gene da protease viral podem ser classificadas como primárias (ou principais) ou secundárias (ou acessórias). As primeiras são definidas como aquelas primeiramente selecionadas na presença do fármaco ou como aquelas que reduzem substancialmente a sensibilidade do agente viral ao inibidor da protease em

uso. As mutações secundárias, por sua vez, geralmente são identificadas após o aparecimento das primárias e são por si só incapazes de ocasionar resistência a qualquer inibidor da protease. Porém, são responsáveis por intensificar a capacidade de replicação dos vírus que já contêm mutações principais. Algumas dessas mutações estão presentes como polimorfismos em algumas cepas de subtipos não B do HIV⁶⁸. Os quadros 2, 3 e 4 resumem a classificação de mutações adotada no presente estudo para interpretação de seu significado em termos de resistência medicamentosa.

Quadro 2 - Mutações conferidoras de resistência aos inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleos(t)ídeos, adaptado das recomendações do IAS - dezembro 2009⁶⁸

INTR	M41	A62*	K65	D67	69**	K70	L74	V75	F77	Y115	F116	Q151	M184	L210	T215	K219
ABV	.	V	R	.	S	.	V	I	L	F	Y	M	V	.	.	.
DDI	.	V	R	.	S	.	V	I	L	.	Y	M
3TC	.	V	R	.	S	.	.	I	L	.	Y	M	V/I	.	.	.
D4T	L	V	R	.	S	R	.	I	L	.	Y	M	.	W	Y/F	Q/E
TDF	.	V	R	.	S	R
AZT	L	V	.	N	S	R	.	I	L	.	Y	M	.	W	Y/F	Q/E

TAMs: *Thymidine Analogue-Associated Mutations* – influencia na sensibilidade de todos os INTRs

* Mutação conferidora de resistência aos múltiplos INTRs quando associada às TAMs

**Complexo de inserção 69: confere resistência a todos os INTRs

*** Complexo 151: diminui a sensibilidade de todos os INTRs, exceto do Tenofovir

Quadro 3 - Mutações conferidoras de resistência aos inibidores da transcriptase reversa não-análogos de nucleosídeos, adaptado das recomendações do IAS - dezembro 2009⁶⁸

INNTR	L100	K101	K103	V106	V108	Y181	Y188	G190	P225
Efavirenz	I	P	N	M	I	C/I	L	S/A	H
Nevirapina	I	P	N	A/M	I	C/I	C/L/H	A	.

Quadro 4 - Mutações conferidoras de resistência aos inibidores da protease, adaptado das recomendações do IAS - dezembro 2009⁶⁸

IP	L10	G16	K20	L24	D30	V32	L33	E34	M36	M46	I47	G48	I50	F53	I54	D60	I62	L63	I64	A71	G73	L76	V77	V82	I84	I85	N88	L90	I93
ATV/r	I/F V/C	E	R/M/I T/V	I	.	I	I/F V	Q	I/L V	I/L	.	V	L	L/Y	L/V/M T/A	E	V	.	L/M V	V/I T/L	C/S T/A	.	I	A/T F/I	V	V	S	M	L M
APV/r	F/I R/V	I	F	.	.	.	V	.	V	.	L/V/M T/A	S	V	.	A/F S/T	V	.	.	M	.
IDV/r	I/R V	.	M/R	I	.	I	.	.	I	I/L	V	V/T	S/A	V	I	A/F T	V	.	.	M	.
LPV/r	F/I R/V	.	M/R	I	.	I	F	.	.	I/L	V/A	.	V	L/Y	V/L/A M/T/S	.	.	P	.	V/T	S	V	.	A/F S/T	V	.	.	M	.
NFV	F/I	.	.	.	N	.	.	.	I	I/L	V/T	.	.	I	A/F S/T	V	.	D/S	M	.
SQV/r	I/R V	.	.	I	V	.	.	V/L/A M/T/S	.	V	.	.	V/T	S	.	I	A/F S/T	V	.	.	M	.

3.9.4 Avaliação da dosagem plasmática de anti-retrovirais

As concentrações plasmáticas dos anti-retrovirais obtidas nas amostras dos pacientes estudados foram apresentadas e interpretadas segundo critérios descritos por Lamotte et al⁷³, que levam em conta o horário da coleta e o horário da tomada da última dose de anti-retroviral. Nessa análise as concentrações plasmáticas podem ser classificadas como adequadas ou inadequadas, em termos de seu nível terapêutico baseado na concentração mínima ou máxima do fármaco analisado, dependendo do momento da administração da última dose do medicamento.

Além disso, buscou-se comparar os resultados obtidos nas análises farmacológicas (concentrações adequadas ou inadequadas dos ARV) com o auto-relato de adesão ao tratamento anti-retroviral, obtido nas entrevistas com os participantes do estudo. A adesão auto-referida foi considerada adequada quando o indivíduo fez uso de todas as doses na semana que precedeu a coleta e inadequada quando falhou ao menos uma tomada.

3.10 Aspectos Éticos

A participação dos sujeitos na pesquisa foi voluntária e eventual recusa em fazê-lo ou abandono de seguimento não modificou a atenção à saúde que os mesmos receberam no serviço ambulatorial onde o estudo foi realizado. O protocolo da pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética e

Pesquisa do Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, sob número 024/05 (Anexo 3).

4 Resultados

4.1 Seleção da população de estudo

Como mostra a figura 2, no período de julho de 2005 a junho de 2006 foram inicialmente pré-selecionados no SEAP-HCFMUSP 560 indivíduos, que preenchiam critérios de inclusão definidos para o presente estudo. Após a realização de dois exames consecutivos de carga viral pelo método de RT-PCR ultrasensível, 462 mantiveram-se elegíveis por terem apresentado cargas virais indetectáveis. Destes, um indivíduo evoluiu para óbito antes de ser convidado a participar do estudo, 84 não responderam ao convite e 20, embora convidados, recusaram-se a participar. As justificativas mais frequentes para a recusa foram indisponibilidade de tempo para comparecer ao serviço para as visitas programadas pelo estudo e dia de coleta de exames incompatível com sua rotina de vida. Os demais sete pacientes elegíveis, não chegaram a ser convidados, uma vez que a inclusão consecutiva de sujeitos já havia atingido o número previsto para a realização do estudo, com base no cálculo do tamanho amostral anteriormente apresentado.

Para o presente estudo de coorte foram assim admitidos consecutivamente 350 participantes. Resumidamente, no primeiro trimestre de execução da pesquisa (julho a setembro de 2005) foram recrutados 15 sujeitos, no segundo trimestre (outubro a dezembro de 2005) 142 sujeitos,

no terceiro trimestre (janeiro a março de 2006) 132 indivíduos e no quarto trimestre (abril a junho de 2006) outros 61 indivíduos, perfazendo 100% da amostra planejada.

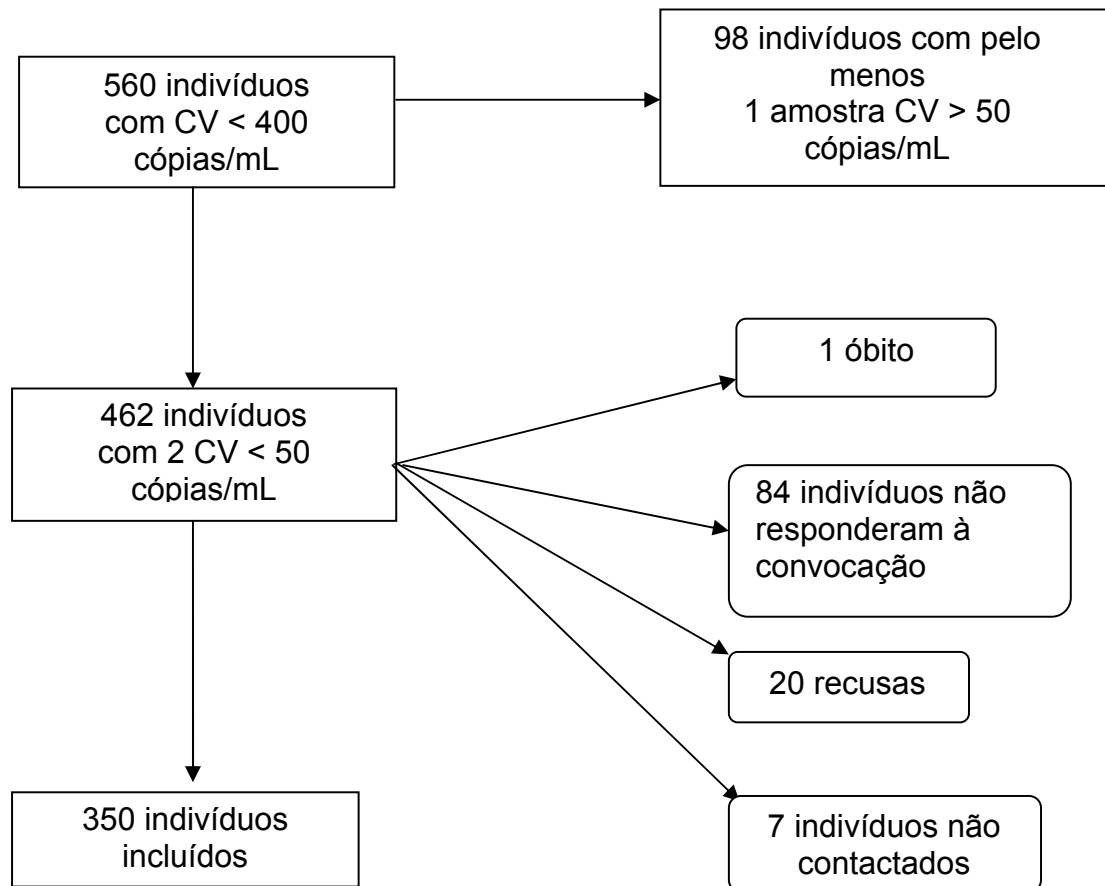
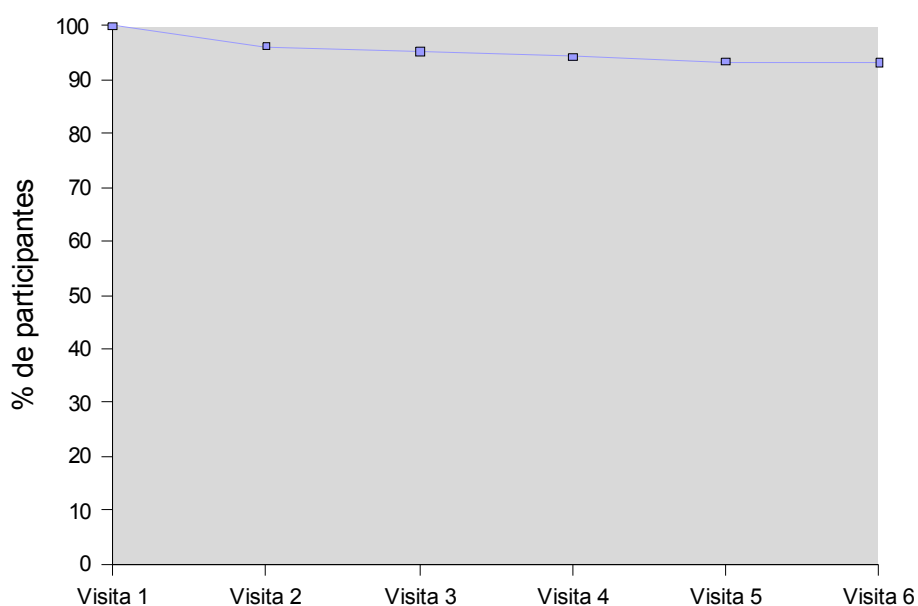


Figura 2 - Processo de seleção da amostra, com o motivo de não-inclusão de casos. SEAP-Casa da AIDS, HC-FMUSP, São Paulo, 2005 - 2006

4.2 Seguimento Clínico-Laboratorial

Os 350 participantes incluídos na coorte foram seguidos ambulatorialmente conforme anteriormente descrito, por meio de visitas trimestrais de reavaliação. Do total de indivíduos admitidos ao estudo, 93,1% (326 indivíduos) completaram as seis visitas de seguimento, totalizando 78 semanas de acompanhamento (Gráfico 1).

Gráfico 1 - Porcentagem de participantes do estudo, segundo visitas realizadas no seguimento. SEAP-Casa da AIDS, HC-FMUSP, São Paulo, 2005 - 2007



No conjunto da população estudada, pôde-se calcular o tempo de seguimento total como de 496,5 pessoas-ano.

4.3 Desfechos do Estudo

Levando-se em conta o desfecho principal deste estudo, buscou-se identificar o comportamento da carga viral de HIV ao longo do seguimento efetuado. Essa se manteve indetectável na maioria dos casos, denotando eficiência da terapia anti-retroviral em propiciar adequada supressão da replicação viral. Assim, 286 (81,7%) indivíduos permaneceram com viremia abaixo do limiar de detecção pela PCR ultrasensível durante todo o tempo de seguimento, dos quais, 22 que não completaram o estudo se mantiveram com carga viral indetectável durante o tempo em que estiveram sob seguimento (12 indivíduos por 12 semanas, e outros 2, 4, 3 e um, respectivamente, por 24, 36, 48 e 60 semanas), restando 264 que se mantiveram com viremia não detectável até o final do estudo.

Quarenta e quatro (12,6%) participantes apresentaram pelo menos um evento de *blip*, ou seja, uma medida de carga viral superior a 50 cópias/mL seguida de carga viral indetectável na determinação imediatamente subsequente. Dessa forma a incidência de *blip* foi de 9,4 por 100 pessoas-ano (44 *blips*/ 467,5 pessoas-ano). Dois pacientes apresentaram dois escapes transitórios de viremia e um terceiro apresentou 3 *blips*.

Vinte e um (6,0%) indivíduos apresentaram falência virológica, isto é, duas cargas virais consecutivas superiores a 50 cópias/mL, determinando, portanto, densidade de incidência desse desfecho de 4,2 por 100 pessoas-ano (21 falências virológicas/ 496,5 pessoas-ano). Deve-se destacar que

apenas 3/21 (14,3%) eventos de falência virológica foram precedidos pela ocorrência de *blip*.

Tabela 2 - Ocorrência de *blip* e de falência virológica segundo visita de seguimento na coorte. SEAP-Casa da AIDS, HC-FMUSP, São Paulo, 2005 – 2007

Visita	1	2	3	4	5	6
CV Indetectável	326	313	325	320	320	310
Blip	10	8	5	7	4	14
Falência virológica	-	14	2	2	1	2
Total de pacientes	350	337	334	330	327	326

Quatorze indivíduos que apresentaram viremia detectável na sexta visita foram convocados para uma sétima visita adicional, 3 meses depois, para a confirmação da indetectabilidade ou não de suas respectivas cargas virais. Nesse momento os escapes de viremia neles observados puderam ser classificados segundo os desfechos do estudo (*blip* ou falência virológica).

4.4 Pesquisa de fatores associados à incidência de *blip*

A tabela 3 compara os indivíduos que apresentaram *blip* ao longo do seguimento na coorte com os indivíduos persistentemente avirêmicos no tocante a características sócio-demográficas. Não houve diferença estatisticamente significativa entre eles quanto a sexo, cor da pele e grau de escolaridade.

Tabela 3 - Comparação de características sócio-demográficas entre indivíduos dos grupos *blip* e avirêmico. SEAP-Casa da AIDS, HC-FMUSP, São Paulo, 2005 - 2007

Variável	<i>Blip</i>				OR	IC (95%)		p	Total
	Não		Sim			Inferior	Superior		
	N	%	N	%					
Sexo							0,363 [”]		
M	202	85,6	34	14,4	1,00			236	
F	84	89,4	10	10,6	0,71	0,33	1,50	94	
Cor							0,451 [#]		
Branca	201	87,0	30	13,0	1,00			231	
Preta	15	93,8	1	6,3	0,45	0,06	3,51	16	
Parda	66	83,5	13	16,5	1,32	0,65	2,68	79	
Amarela	4	100,0	-	0,0	a			4	
Escolaridade							0,134 [”]		
até 8 anos	91	87,5	13	12,5	1,00			104	
8-11 anos	100	87,0	15	13,0	1,05	0,47	2,33	115	
> 11 anos	95	85,6	16	14,4	1,18	0,54	2,59	111	
Total	286	86,7	44	13,3				330	

[”]Teste do qui-quadrado; [#] Teste da razão de verossimilhanças
a Não foi possível calcular

A média de idade dos indivíduos que apresentaram *blip* foi de 41,82 anos, enquanto a do grupo de avirêmicos foi de 44,47 anos ($p=0,055$). Não se observou diferença estatisticamente significativa em relação à renda per capita entre esses dois grupos ($p= 0,965$).

No que se refere às variáveis relacionadas à exposição ao HIV, é interessante apontar que 178 (50,9%) participantes do estudo possuíam parceiro sexual fixo, dos quais 66 (37,1%) também apresentavam infecção por HIV, enquanto 112 (62,9%) eram sorodiscordantes.

Pela tabela 4 verifica-se que a categoria de exposição ao HIV e ter parceiro fixo também infectado por HIV não se mostraram associados à

incidência de *blip*. Em contraste, os indivíduos que relataram falta de adesão às práticas de sexo mais seguro tiveram 22 vezes mais chance de apresentarem *blip* durante o seguimento ($p < 0,001$).

Tabela 4 - Comparação de variáveis relacionadas à exposição ao HIV entre indivíduos dos grupos *blip* e avirêmico. SEAP-Casa da AIDS, HC-FMUSP São Paulo, 2005 – 2007

Variável	<i>Blip</i>				OR	IC (95%)		p	Total
	Não		Sim			Inferior	Superior		
	n	%	n	%					
Parceiro HIV+								0,988 [”]	
Não	89	84,0	17	16,0	1,00				106
Sim	52	83,9	10	16,1	1,01	0,43	2,36		62
Categorias de exposição								0,540 [#]	
Homossexual	97	85,8	16	14,2	1,00				113
Bissexual	30	88,2	4	11,8	0,81	0,25	2,60		34
Heterossexual masculino	52	85,2	9	14,8	1,05	0,43	2,54		61
Heterossexual feminino	77	89,5	9	10,5	0,71	0,30	1,69		86
Usuário de droga intravenosa	14	87,5	2	12,5	3,46	0,72	16,70		16
Hemofílico	-	0,0	1	100,0	a				1
Transfusão	16	84,2	3	15,8	1,14	0,30	4,35		19
Adesão às práticas de sexo mais seguro								<0,001 [*]	
Sim	284	88,2	38	11,8	1,00				322
Não	2	25,0	6	75,0	22,42	4,37	115,09		8
Total	286	86,7	44	13,3					330

”Teste do qui-quadrado; #Teste da razão de verossimilhanças; *Teste exato de Fisher
a Não foi possível calcular

Na tabela 5 comparam-se os sujeitos que apresentaram *blip* e os persistentemente avirêmicos em relação a hábitos e a intercorrências clínicas observadas ao longo do seguimento da coorte. Não se verificou associação entre a incidência de *blip* e relato de uso de drogas ilícitas ou de álcool. A existência de doença de base, o uso de medicações combinadas

aos anti-retrovirais, história de diarreia, infecção ou exposição a vacinas no mês precedente à coleta dos dados também não se mostraram preditores do desfecho *blip*.

Tabela 5 - Comparação de hábitos e intercorrências clínicas no mês precedente à visita entre indivíduos dos grupos *blip* e avirêmico. SEAP-Casa da AIDS, HC-FMUSP, São Paulo, 2005 – 2007

Variável	<i>Blip</i>				OR	IC (95%)		p	Total
	Não		Sim			Inferior	Superior		
	n	%	N	%					
Doença de base								0,269"	
Não	170	85,0	30	15,0	1,00				200
Sim	116	89,2	14	10,8	0,68	0,35	1,35		130
Faz uso de outras medicações?								0,931"	
Não	158	86,8	24	13,2	1,00				182
Sim	128	86,5	20	13,5	1,03	0,54	1,95		148
Uso de drogas ilícitas no último mês?								0,153*	
Não	272	87,5	39	12,5	1,00				311
Sim	14	73,7	5	26,3	2,49	0,85	7,30		19
Tomou álcool no último mês?								0,650"	
Não	185	86,0	30	14,0	1,00				215
Sim	101	87,8	14	12,2	0,85	0,43	1,69		115
Teve diarreia no último mês?								>0,999*	
Não	259	86,6	40	13,4	1,00				299
Sim	27	87,1	4	12,9	0,96	0,32	2,89		31
Teve infecção no último mês?								0,578"	
Não	219	87,3	32	12,7	1,00				251
Sim	67	84,8	12	15,2	1,23	0,60	2,51		79
Tomou vacina no último mês?								0,332*	
Não	265	86,0	43	14,0	1,00				308
Sim	21	95,5	1	4,5	0,29	0,04	2,24		22
Total	286	86,7	44	13,3					330

"Teste do qui-quadrado; *Teste exato de Fisher

Ao se compararem os participantes do estudo no tocante à terapia anti-retroviral, pôde-se verificar que no que se refere à adesão à medicação anti-retroviral, observou-se na entrevista inicial que mais de 90% dos

participantes relataram tomar os medicamentos segundo a prescrição (respeitando corretamente o rigor dos horários ou com certo atraso), enquanto menos de 10% referiu falhar doses. Como ilustra a tabela 6, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos *blip* e avirêmico ($p=0,573$) em relação à adesão ao tratamento anti-retroviral.

Um total de 16 (36,4%) participantes que apresentaram *blip* pertencia ao grupo que utilizava como terceira droga um inibidor de transcriptase reversa não-análogo de nucleosídeo, enquanto 26 (59,1%) se encontravam sob uso de inibidores de protease e dois (4,5%) utilizavam outra classe de drogas (Tabela 6). Uma maior proporção de indivíduos em uso de IP apresentou *blip*, quando comparados àqueles em uso de INNTR, com associação significativa entre o uso de IP e o aparecimento de *blip* ($p=0,005$) na análise bivariada.

Tabela 6 - Comparação de dados referentes ao uso de anti-retrovirais (ARV): adesão auto-referida e classe de ARV utilizada pelos participantes pertencentes aos grupos *blip* e avirêmico. SEAP-Casa da AIDS, HC-FMUSP, São Paulo, 2005 – 2007

Variável	<i>Blip</i>				OR	IC (95%)		p	Total
	Não		Sim			Inferior	Superior		
	N	%	n	%					
Uso regular da medicação								0,573*	
Não	25	83,3	5	16,7	1,00			30	
Sim	261	87,0	39	13,0	0,75	0,27	2,07	300	
Anti-retroviral								0,005#	
INTR+INNTR	177	91,7	16	8,3	1,00			193	
INTR+IP	97	78,9	26	21,1	2,97	1,52	5,80	123	
Outras	12	85,7	2	14,3	1,84	0,38	8,97	14	
Total	286	86,7	44	13,3				330	

*Teste exato de Fischer; #Teste da razão de verossimilhanças

INTR: inibidor análogo nucleos(t)ídico da transcriptase reversa

INNTR: inibidor não-análogo nucleos(t)ídico da transcriptase reversa

IP: inibidor da protease

Constatou-se que a maioria dos pacientes (244; 69,7%) havia recebido no máximo dois esquemas de terapia anti-retroviral até a sua inclusão no estudo. As trocas relatadas nessa ocasião haviam sido motivadas em sua maioria por intolerância à combinação empregada ou necessidade de adequação posológica, segundo informações relatadas pelo próprio sujeito da pesquisa.

A tabela 7 mostra que os indivíduos que apresentaram o desfecho de interesse *blip* eram mais experimentados do ponto de vista da terapia anti-retroviral, relatando uso pregresso de um maior número de esquemas medicamentosos ($p < 0,001$) e também maior número de trocas de anti-retrovirais por resistência ($p = 0,001$). Além disso, constatou-se que o tempo de infecção foi estatisticamente superior no grupo que apresentou *blip* ($p = 0,013$).

Tabela 7 - Comparação de variáveis numéricas relacionadas à história de terapia anti-retroviral e tempo de infecção por HIV entre pacientes pertencentes aos grupos *blip* e avirêmico. SEAP-Casa da AIDS, HC-FMUSP, São Paulo, 2005 – 2007

Variável	<i>Blip</i>	Média	DP	Mediana	Mínimo	Máximo	N	p
Número de esquemas ARV utilizados	Não	2,09	1,10	2	1	5	286	<0,001§
	Sim	3,02	1,36	3	1	5	44	
Número de trocas de esquemas ARV por resistência	Não	0,45	1,02	0	0	4	286	0,001§
	Sim	1,11	1,54	0	0	4	44	
Tempo de infecção por HIV	Não	85,25	36,37	80,5	5	235	286	0,013§
	Sim	102,20	42,69	98,5	27	219	44	

§Mann-Whitney

Cabe sintetizar que na etapa de análise bivariada realizada para investigar fatores preditores da incidência de *blip*, destacaram-se com $p < 0,20$ as variáveis: não adesão às práticas de sexo mais seguro, número de esquemas anti-retrovirais utilizados e número de trocas de esquemas medicamentosos ocasionados por resistência, além do tempo de infecção por HIV, a idade, o relato de uso de drogas ilícitas e estar em uso de IP como terceira droga do esquema ARV. Tais variáveis foram a seguir incluídas em modelo de regressão logística múltipla para identificar fatores independentemente associados a esse desfecho (Tabela 8).

Notou-se que, após ajuste para as demais variáveis incluídas no modelo, a não adesão às práticas de sexo mais seguro no mês precedente à coleta de exames se mostrou fortemente preditora da ocorrência de *blip*. Os participantes que relataram práticas de sexo desprotegido no mês precedente à visita de acompanhamento apresentaram risco 24 vezes maior para ocorrência do desfecho em questão ($p < 0,001$). Adicionalmente, observou-se que o incremento de um esquema anti-retroviral aumentou em 82% a chance de ocorrência de *blip* ($p < 0,001$).

Tabela 8 - Modelo de regressão logística múltipla para avaliação de fatores associados à ocorrência de *blip*. SEAP-Casa da AIDS, HC-FMUSP, São Paulo, 2005 – 2007

Modelo	Variável	OR	IC (95%)		p
			Inferior	Superior	
Parcial	Faz uso de drogas ilícitas?				
	Não	1,00			
	Sim	0,37	0,11	1,22	0,103
	Adesão às práticas de sexo mais seguro				
	Sim	1,00			
	Não	26,98	4,22	172,66	0,001
	ARV				
	ITRN+ITRNN	1,00			
	ITRN+IP	1,70	0,78	3,70	0,178
	Outras	1,16	0,20	6,54	0,869
	Idade	0,97	0,93	1,01	0,094
	Número de esquemas ARV utilizados	1,56	0,98	2,48	0,059
	Número de trocas de esquemas ARV por resistência	1,02	0,68	1,53	0,939
	Tempo de infecção	1,01	1,00	1,02	0,132
Final	Adesão às práticas de sexo mais seguro				
	Sim	1,00			
	Não	24,64	4,40	137,88	<0,001
	Número de esquemas ARV utilizados	1,82	1,41	2,36	<0,001

4.5 Pesquisa de fatores associados à incidência de falência virológica

A tabela 9 compara características sócio-demográficas dos indivíduos que apresentaram falência virológica ao longo do seguimento da coorte com as daqueles que se mantiveram persistentemente avirêmicos ou que apresentaram *blip* (reunidos no grupo não-falência virológica). Não houve

diferença estatisticamente significativa entre esses grupos quanto a sexo e grau de escolaridade, em contraste com o observado em relação à cor da pele auto-referida ($p=0,01$).

Tabela 9 - Comparação de características sócio-demográficas entre indivíduos dos grupos com e sem falência virológica . SEAP-Casa da AIDS, HC-FMUSP, São Paulo, 2005 – 2007

Variável	Falência virológica				OR	IC (95%)		p	Total
	Não		Sim			Inferior	Superior		
	n	%	n	%					
Sexo								0,631"	
M	234	94,4	14	5,6	1,00				248
F	93	93,0	7	7,0	1,26	0,49	3,22		100
Cor								0,010#	
Branca	229	92,7	18	7,3	1,00				247
Preta	16	100,0	-	-	a				16
Parda	78	98,7	1	1,3	0,16	0,02	1,24		79
Amarela	4	66,7	2	33,3	6,36	1,09	37,12		6
Escolaridade								0,134"	
até 8 anos	103	97,2	3	2,8	1,00				106
8-11 anos	115	94,3	7	5,7	2,09	0,53	8,29		122
> 11 anos	109	90,8	11	9,2	3,46	0,94	12,77		120
Total	327	94,0	21	6,0					348

"Teste do qui-quadrado; # Teste da razão de verossimilhanças
a Não foi possível calcular

A média de idade no grupo falência virológica foi de 42,00 anos, enquanto a do grupo não-falência virológica foi de 44,16 anos ($p=0,084$). Analogamente não se observou diferença significativa entre os grupos em relação à renda per capita ($p= 0,369$).

No que se refere às variáveis relacionadas à exposição ao HIV, a categoria de exposição e ter parceiro fixo também infectado por HIV não se

mostraram associados à incidência de falência virológica (Tabela 10). Em contraste, os indivíduos que relataram falta de adesão às práticas de sexo mais seguro tiveram 18 vezes mais chance de apresentarem falência virológica durante o seguimento ($p=0,003$).

Tabela 10 - Comparação de variáveis relacionadas à exposição ao HIV entre indivíduos dos grupos falência virológica e não-falência virológica. SEAP-Casa da AIDS, HC-FMUSP São Paulo, 2005 – 2007

Variável	Falência virológica				OR	IC (95%)		P	Total
	Não		Sim			Inferior	Superior		
	N	%	n	%					
Parceiro HIV+								0,749"	
Não	105	94,6	6	5,4	1,00				111
Sim	61	92,4	5	7,6	1,43	0,42	4,90		66
Categorias de exposição									0,526#
Homossexual	112	94,1	7	5,9	1,00				119
Bissexual	34	100,0	-	-	a				34
Heterossexual masculino	61	92,4	5	7,6	1,31	0,40	4,31		66
Heterossexual feminino	85	93,4	6	6,6	1,13	0,37	3,48		91
Usuário de droga intravenosa	16	94,1	1	5,9	a				17
Hemofílico	1	100,0	-	-	a				1
Transfusão	18	90,0	2	10,0	1,78	0,34	9,24		20
Adesão às práticas de sexo mais seguro									0,003"
Sim	324	94,7	18	5,3	1,00				342
Não	3	50,0	3	50,0	18,00	3,39	95,55		6
Total	327	94,0	21	6,0					348

"Teste exato de Fisher; #Teste da razão de verossimilhanças
a Não foi possível calcular

Na tabela 11 comparam-se os sujeitos que apresentaram falência virológica e os que não apresentaram tal desfecho em relação a hábitos e a intercorrências clínicas observadas ao longo do seguimento da coorte. Como se pode observar não se verificou associação entre a incidência de

blip e relato de uso de drogas ilícitas ou de álcool. A existência de doença de base, o uso de medicações combinadas aos anti-retrovirais, história de diarreia, infecção ou exposição a vacinas no mês precedente à coleta dos dados também não se mostraram preditores de falência virológica.

Tabela 11 - Comparação de hábitos e intercorrências clínicas no mês precedente à visita entre indivíduos dos grupos falência virológica e não-falência virológica. SEAP-Casa da AIDS, HC-FMUSP, São Paulo, 2005 – 2007

Variável	Falência virológica				OR	IC (95%)		p	Total
	Não		Sim			Inferior	Superior		
	n	%	n	%					
Doença de base								0,055"	
Não	196	92,0	17	8,0	1,00				213
Sim	131	97,0	4	3,0	0,35	0,12	1,07		135
Faz uso de outras medicações?								0,809"	
Não	178	93,7	12	6,3	1,00				190
Sim	149	94,3	9	5,7	0,90	0,37	2,18		158
Uso de drogas ilícitas no último mês?								>0,999*	
Não	309	93,9	20	6,1	1,00				329
Sim	18	94,7	1	5,3	0,86	0,11	6,76		19
Tomou álcool no último mês?								0,277"	
Não	211	93,0	16	7,0	1,00				227
Sim	116	95,9	5	4,1	0,57	0,20	1,59		121
Teve diarreia no último mês?								>0,999*	
Não	292	93,9	19	6,1	1,00				311
Sim	35	94,6	2	5,4	0,88	0,20	3,93		37
Teve infecção no último mês?								0,440"	
Não	243	94,6	14	5,4	1,00				257
Sim	84	92,3	7	7,7	1,45	0,56	3,71		91
Tomou vacina no último mês?								0,216*	
Não	303	94,4	18	5,6	1,00				321
Sim	24	88,9	3	11,1	2,10	0,58	7,65		27
Total	327	94,0	21	6,0					348

"Teste do qui-quadrado; *Teste exato de Fisher

Ao se compararem os participantes do estudo no tocante à terapia anti-retroviral recebida (Tabela 12), pôde-se verificar que não houve diferença estatisticamente significativa na adesão ao tratamento entre os grupos falência virológica e não-falência virológica ($p=0,426$).

Onze (52,4%) sujeitos pertencentes ao grupo do desfecho de interesse estavam sob uso de INNTR, enquanto 9 (42,8%) indivíduos utilizavam IP e somente 1 (4,8%) recebia ambas as classes de anti-retrovirais. Porém, em relação à incidência de falência virológica, contrariamente ao observado com a ocorrência de *blip*, não houve diferença significativa entre os grupos que apresentaram ou não o desfecho no tocante aos esquemas de ARV utilizados (Tabela 12).

Buscou-se ainda avaliar se a ocorrência de episódios de *blip* ao longo do seguimento na coorte poderia ser preditora de falência virológica, porém, tal associação não pôde ser demonstrada ($p=0,738$) (Tabela 12).

Tabela 12 - Comparação de dados referentes ao uso de anti-retrovirais (ARV): adesão auto-referida e classe de ARV utilizada pelos participantes pertencentes aos grupos falência virológica e não-falência virológica e comparação entre os grupos em relação à ocorrência precedente de *blip*. SEAP-Casa da AIDS, HC-FMUSP, São Paulo, 2005 – 2007

Variável	Falência Virológica				OR	IC (95%)		P	Total
	Não		Sim			Inferior	Superior		
	n	%	n	%					
Uso regular da medicação								0,426*	
Não	29	90,6	3	9,4	1,00			32	
Sim	298	94,3	18	5,7	0,58	0,16	2,10	316	
Anti-retroviral								0,864#	
INTR+INNTR	191	94,6	11	5,4	1,00			202	
INTR+IP	122	93,1	9	6,9	1,28	0,52	3,18	131	
Outras	14	93,3	1	6,7	1,24	0,15	10,31	15	
Blip								0,738*	
Não	286	94,1	18	5,9	1,00			304	
Sim	41	93,2	3	6,8	1,16	0,33	4,12	44	
Total	327	94,0	21	6,0				348	

*Teste exato de Fischer; #Teste da razão de verossimilhanças

A tabela 13 mostra também que os indivíduos que apresentaram o desfecho falência virológica eram mais experimentados em terapia anti-retroviral e já haviam apresentado maior número de trocas de esquemas terapêuticos por resistência ($p=0,015$), quando comparados ao grupo que não apresentou falência virológica ($p=0,011$). Porém, diferentemente do observado em relação ao desfecho *blip*, o tempo de infecção por HIV no grupo que apresentou falência virológica não foi estatisticamente diferente do exibido pelos indivíduos que não apresentaram falência ($p = 0,225$).

Tabela 13 - Comparação de variáveis numéricas relacionadas à história de terapia anti-retroviral e tempo de infecção por HIV entre pacientes pertencentes aos grupos falência virológica e não-falência virológica. SEAP-Casa da AIDS, HC-FMUSP, São Paulo, 2005 – 2007

Variável	Falência virológica	Média	DP	Mediana	Mínimo	Máximo	N	p
Número de esquemas ARV utilizados	Não	2,18	1,15	2	1	5	327	0,011§
	Sim	2,95	1,43	3	1	5	21	
Número de trocas de esquemas ARV por resistência	Não	0,53	1,12	0	0	4	327	0,015§
	Sim	1,19	1,57	0	0	4	21	
Tempo de infecção por HIV (em meses)	Não	87,46	37,61	84	5	235	327	0,225§
	Sim	96,81	33,00	91	52	175	21	

§Mann-Whitney

Na análise bivariada conduzida para pesquisar fatores associados à incidência de falência virológica, destacaram-se com $p < 0,20$ as variáveis: adesão às práticas de sexo mais seguro, o número de trocas de esquemas anti-retrovirais ocasionados por resistência, o número de esquemas anti-retrovirais previamente utilizados, cor da pele auto-referida, idade, e apresentar uma doença de base. Tais variáveis foram a seguir incluídas em modelo de regressão logística múltipla para identificar fatores independentemente associados a esse desfecho (Tabela 14).

Como se pode observar, após ajuste para as demais variáveis incluídas no modelo, a não adesão às práticas de sexo mais seguro no mês que antecedeu à análise laboratorial se mostrou independentemente associada à ocorrência de falência virológica. Adicionalmente, notou-se que leva a um aumento de 24 vezes na chance de ocorrer falência virológica ($p < 0,001$). Outra variável preditora de falência virológica foi o incremento de uma troca no esquema anti-retroviral por resistência, que acarretou aumento de 67% na chance de falência virológica ($p = 0,003$).

Tabela 14 - Modelo de regressão logística múltipla para avaliação de fatores associados à ocorrência de falência virológica. SEAP-Casa da AIDS, HC-FMUSP, São Paulo, 2005 – 2007

Modelo	Variável	OR	IC (95%)		p
			Inferior	Superior	
	Doença de base				
	Não	1,00			
	Sim	0,35	0,10	1,23	0,102
	Adesão às práticas de sexo mais seguro				
Parcial	Sim	1,00			
	Não	22,38	3,59	139,61	0,001
	Idade	0,99	0,93	1,05	0,719
	Número de esquemas ARV utilizados	1,57	0,86	2,86	0,139
	Número de trocas de esquemas ARV por resistência	1,12	0,66	1,91	0,673
	Adesão às práticas de sexo mais seguro				
Final	Sim	1,00			
	Não	24,69	4,20	145,18	<0,001
	Número de esquemas ARV utilizados	1,67	1,19	2,35	0,003

4.6 Conseqüências clínicas e conduta tomada quando da ocorrência dos desfechos de interesse

Nenhum episódio de viremia plasmática detectável ao longo do seguimento da coorte foi sucedido por eventos clínicos e/ou doenças oportunistas.

Apenas três dos 21 (14,3%) indivíduos que apresentaram falência virológica tiveram seus esquemas anti-retrovirais modificados por terem sido tais eventos considerados também como falência terapêutica.

Além disso, três outras alterações de esquemas terapêuticos foram realizadas pelos médicos que acompanhavam os sujeitos da pesquisa, na visita imediatamente anterior à ocorrência do desfecho, com o objetivo de facilitar a posologia ou em função de efeito colateral observado com o esquema vigente.

4.7 Descrição de dados laboratoriais evolutivos (número de células CD4+ periféricas e carga viral plasmática de HIV) em indivíduos que apresentaram os desfechos de interesse (*blip* ou falência virológica)

No momento de admissão no estudo (linha de base da coorte) a população estudada mostrava-se homogênea no que se refere à carga viral plasmática. Em relação ao número de linfócitos T CD4+ periféricos,

pouco mais de 80% dos indivíduos apresentavam valores superiores a 350 células/mm³.

A comparação dos participantes em relação ao número de linfócitos T CD4+ periféricos na linha de base da coorte é ilustrada na tabela 15, que apresenta as diferenças das médias e medianas no momento da admissão no estudo. Não houve diferença estatística entre os grupos *blip* e avirêmico no tocante à mediana de células T CD4+. Em contraste, o grupo que evoluiu com falência virológica apresentava número de células T CD4+ inferiores ao grupo não-falência virológica, com diferença estatisticamente significativa.

Tabela 15 - Comparação dos sujeitos que apresentaram os desfechos de interesse segundo número de linfócitos T CD4+ periféricos no momento da admissão no estudo. SEAP-Casa da AIDS, HC-FMUSP, São Paulo, 2005 – 2007

Desfecho		Células CD4+ (número/ mm ³)					N	p
		Média	DP	Mediana	Mínimo	Máximo		
Blip	Não	621,06	292,06	574	112	1 869	286	0,108§
	Sim	694,32	301,09	642,5	249	1 730	44	
Falência virológica	Não	633,97	303,28	598	112	1 869	327	0,027§
	Sim	481,81	215,61	481	116	1 073	21	

§Mann-Whitney

Com o intuito de caracterizar de forma mais detalhada os eventos de escape de viremia observados ao longo do seguimento da coorte, apresentam-se na tabela 16 a distribuição dos participantes que apresentaram os desfechos de interesse (*blip* e falência virológica) segundo intensidade de carga viral plasmática apresentada por ocasião do desfecho.

Tabela 16 - Valores de carga viral plasmática de HIV observados por ocasião da ocorrência dos eventos de interesse. SEAP-Casa da AIDS, HC-FMUSP, São Paulo, 2005 – 2007

Desfecho	Carga Viral de HIV (número de cópias HIV-RNA/mL)					N
	Média	DP	Mediana	Mínimo	Máximo	
Blip	881,11	2 051,50	130	51	11 500	44
Falência virológica	6 206,57	11965,32	1 880	56	364 000	21

4.8 Descrição de resultados dos testes genotípicos de seqüências *pol* de HIV

Foi possível conduzir com sucesso a análise genotípica de seqüências *pol* do HIV em 44 amostras de 37 indivíduos entre os 62 que apresentaram carga viral detectável em pelo menos um momento ao longo do estudo. Tal avaliação foi conduzida em 22 amostras coletadas no momento de ocorrência de *blip* e em 22 outras obtidas por ocasião de eventos de falência virológica.

Buscou-se avaliar a presença de mutações em seqüências do gene *pol* que codificam a TR (20 sujeitos) e a protease viral (37 sujeitos). Cabe destacar que o indivíduo 328 teve uma amostra de um segundo momento de viremia detectável também analisado, visto que houve um acréscimo de ritonavir no esquema anti-retroviral entre as análises dos dois momentos diferentes em que o mesmo continuava com viremia detectável.

Nas figuras 3 e 4 apresentam-se de forma esquemática os resultados obtidos na análise genotípica efetuada em amostras coletadas durante o seguimento da coorte.

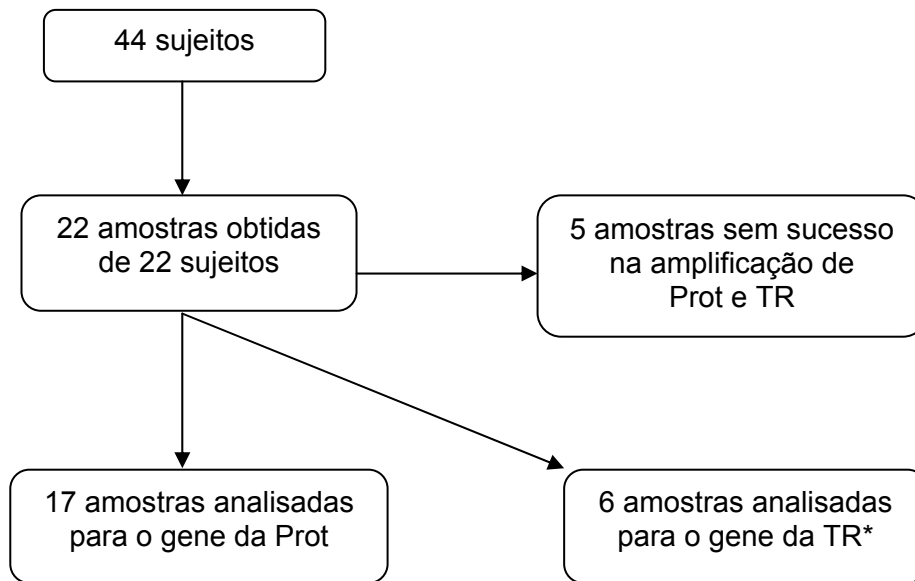


Figura 3 - Realização da análise genotípica em seqüências de HIV obtidas de sujeitos que apresentaram *blip* ao longo do seguimento. SEAP-Casa da AIDS, HC-FMUSP, São Paulo, 2005 – 2007

*Todas as amostras amplificadas para o gene da TR também apresentaram, paralelamente, amplificação do gene da Prot.

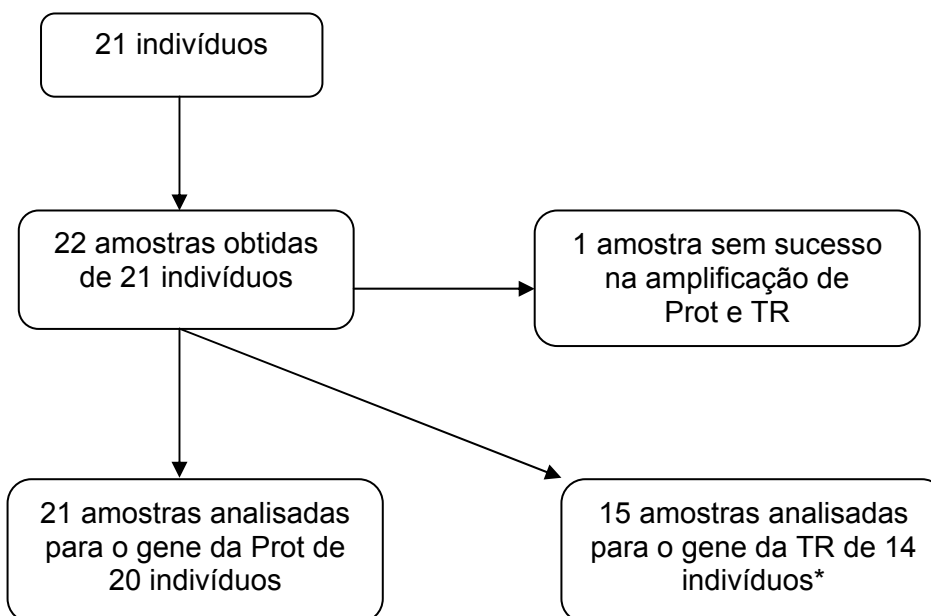


Figura 4 - Realização da análise genotípica em seqüências de HIV obtidas de indivíduos que apresentaram falência virológica ao longo do seguimento. SEAP-Casa da AIDS, HC-FMUSP, São Paulo, 2005 – 2007

*Todas as amostras amplificadas para o gene da TR também apresentaram, paralelamente, amplificação do gene da Prot.

A interpretação da relevância clínica das mutações baseou-se nas recomendações do IAS. Segundo essas, para que se observe resistência aos inibidores da protease, em geral são necessárias pelo menos 3 mutações secundárias, além da mutação genotípica primária. Porém, certos compostos dessa classe, como a associação Lopinavir/Ritonavir, requerem pelo menos 6 mutações para que a sensibilidade ao fármaco se mostre reduzida e 7 a 8 para que seja conferida resistência completa.

No presente estudo de coorte observou-se que no momento da ocorrência de *blip* nenhum indivíduo apresentava perfil de mutações genotípicas conferidoras de resistência completa aos inibidores da protease. Entretanto, em 15 (88%) das 17 amostras analisadas com sucesso no momento *blip* foram identificadas mutações secundárias no gene da protease, sendo que as mais freqüentemente detectadas nesse grupo foram M36I, L63P, I64V (Tabela 17 e Quadro 5).

Tabela 17 - Mutações conferidoras de resistência identificadas no seqüenciamento dos gene da protease e da transcriptase reversa, subtipos de HIV e dosagem plasmática de anti-retrovirais nos sujeitos que apresentaram o desfecho *blip*. SEAP-Casa da AIDS, HC-FMUSP, São Paulo, 2005 – 2007

Sujeito N°	ARV em uso	Uso prévio de ARV	Carga Viral (cópias/mL)	Mutações na Protease	Mutações na Transcriptase Reversa	Subtipo	Dosagem Plasmática
8	AZT, 3TC, NVP	Nenhum	171	I62V	NA	B	A
12	3TC, TDF, ATV/r	INNTR	68	I64V	NA	B	A
29	AZT, 3TC, LPV/r	INNTR*	458	D60E L63P	V106I V108I	B	A
39	AZT*, 3TC, NPV	IP*	4470	M36I I62V L63P	M41L T215Y	B	ND
44	AZT, 3TC, EFV	Nenhum	579	L63P I93L	Nenhuma	B	A
48	3TC, TDF, LPV/r	INNTR	56	I64V	NA	B	I
59	3TC, D4T, EFV	Nenhum	124	NA	NA	NA	A
65	AZT, 3TC, NVP	Nenhum	87	NA	NA	NA	A
111	DDI, D4T, ATV*	INNTR	892	L33V D60E L63P I64V	NA	B	A
118	AZT, 3TC, EFV	Nenhum*	596	K20M M36I I62V L63P I93L	NA	B	A
157	AZT, 3TC, LPV/r	INNTR	11500	Nenhuma	não sequenciado	B	ND
161	AZT, 3TC, ATV	Nenhum	6650	L63P I93L	NA	B	I
167	AZT, 3TC, EFV	Nenhum*	105	L33V D60E L63P I64V	NA	B	A
200	3TC, ABV, LPV/r	INNTR	646	I62V L63P A71T	NA	B	A
223	AZT*, 3TC, TDF LPV/r	INNTR	184	Nenhuma	M41L T215Y	B	A
225	3TC, D4T, NFV	Nenhum	1330	NA	NA	NA	A
272	AZT, 3TC, ATV/r	Nenhum	86	L63P I93L	Nenhuma	B	ND
274	AZT, 3TC, LPV/r	Nenhum	89400	K20M M36I	Nenhuma	B	ND
283	DDI, 3TC, TDF LPV/r	INNTR	1400	NA	NA	NA	A
291	AZT, 3TC, ABC LPV/r	INNTR	277	K20R M36I	NA	F1	A
296	AZT, DDI, EFV LPV/r	INNTR/IP	51	I64V	NA	B	NR
343	AZT, 3TC, ATV/r	INNTR	51	NA	NA	NA	A

NA: Não Amplificado

A: Adequada; I: Inadequada; ND: Não Detectável; NR: Não Realizada

*:mutações conferidoras de resistência à classe de ARV já utilizada

*:mutações conferidoras de resistência à classe de ARV nunca utilizada

*:mutações conferidoras de diminuição de sensibilidade ao medicamento em uso

Quadro 5 - Mutações no gene da protease apresentados pelos sujeitos que desenvolveram *blip*. SEAP-Casa da AIDS, HC-FMUSP São Paulo, 2005 – 2007

Sujeito n°	L10	K20	L33	M36	K43	M46	I50	I54	D60	I62	L63	I64	H69	A71	G73	V77	V82	I84	I85	L90	I93	
8	V
12	V
29	E	.	P
39	.	.	.	I	V	P
44	P	L
48	V
111	.	.	V	E	.	P	V
118	.	M	.	I	V	P	L
157
161	P	L
167	.	.	V	E	.	P	V
200	V	P	.	.	T
223
272	P	L
274	.	M	.	I
291	.	R	.	I
296	V

Mutações primárias da protease; Mutações secundárias da protease

Apenas três indivíduos apresentaram mutações no gene da transcriptase reversa, dos quais, dois tiveram mutações conferidoras de resistência aos INTR caracterizadas como duas TAMs na ausência da mutação M184V e no terceiro, as mutações foram conferidoras de resistência aos inibidores da classe de INNTR (Quadro 6). Cabe ressaltar que dois desses apresentaram também mutações secundárias no gene da protease (Tabela 17).

Quadro 6 - Mutações no gene da transcriptase reversa apresentados pelos sujeitos que desenvolveram *blip*. SEAP-Casa da AIDS, HC-FMUSP São Paulo, 2005 – 2007

Sujeito n°	M41	A62	K65	D67	K70	K103	V106	V108	F116	Q151	V179	M184	Y188	G190	L210	T215	K219	
29	I	I
39	L	Y	.
44
223	L	Y	.
272

Mutações primárias da Transcriptase Reversa; Mutações secundárias da Transcriptase Reversa

Considerando tais dados, pode-se afirmar que nesta coorte, 9 (69,2%) dos 13 sujeitos analisados no momento do escape transitório da viremia plasmática (*blip*) apresentavam vírus sensíveis ao esquema anti-retroviral que vinham recebendo. Em outros 4 indivíduos que não estavam em uso de inibidores de protease, não se obteve sucesso na análise do gene da transcriptase reversa, não sendo possível assim confrontar as mutações observadas com o esquema terapêutico utilizado.

Observou-se também que o indivíduo 39 (Tabela 17) apresentou 3 mutações secundárias sem nenhuma mutação primária, em vigência de esquema sem inibidor de protease como terceira droga, porém o mesmo já havia feito uso dessa classe de medicamento.

Dos três sujeitos que apresentaram mais de um *blip* ao longo do seguimento, pôde-se realizar a análise genotípica em um único deles, por ocasião do segundo momento de viremia detectável (Tabela 17, sujeito n° 274). Foram identificadas duas mutações secundárias (K20M e M36I) no gene da protease que, isoladamente, não conferem resistência fenotípica. Nenhuma mutação no gene da transcriptase reversa foi observada nesse caso.

No grupo de sujeitos que apresentaram falência virológica, foi possível conduzir o seqüenciamento genotípico do gene da protease de HIV em 20 indivíduos. Em 14 (70%) desses não foram detectadas mutações que pudessem conferir resistência medicamentosa (Tabela 18). Ressalta-se que sete (50%) nunca haviam utilizado IPs, quatro (28%) deles relataram uso progressivo de IP e três (23%) estavam sob uso de IP no momento analisado. Dos seis indivíduos que apresentaram mutações conferidoras de resistência

a pelo menos um inibidor de protease nesse grupo, quatro (67%) já tinham experimentado troca de esquemas anti-retrovirais por causa de resistência.

Dos seis participantes que apresentaram mutações ao IP em uso por ocasião do evento falência virológica, dois também exibiam mutações conferidoras de resistência a pelo menos um inibidor da transcriptase reversa análogo e/ou não análogo de núcleos(t)ídeo em uso.

Tabela 18 - Mutações conferidoras de resistência identificadas no seqüenciamento dos genes da protease e da transcriptase reversa, subtipos de HIV e dosagem plasmática de anti-retrovirais nos sujeitos que apresentaram o desfecho falência virológica. SEAP-Casa da AIDS, HC-FMUSP, São Paulo, 2005 – 2007

Sujeito n°	ARV em uso	Uso prévio de ARV	Carga Viral (cópias/mL)	Mutações na Protease	Mutações na TR	Subtipo	Dosagem Plasmática
20	3TC, D4T, LPV/r	INNTR	94	Nenhuma	NA	B	A
21	D4T, ABC, LPV/r*	INNTR	2210	L10I L33V D60E L63P I64V V77I L90M	Nenhuma	B	ND
33	3TC, D4T, NFV	Nenhum	102	M36I I93L	NA	B	A
148	AZT, 3TC, EFV	Nenhum*	831	M36I L63P H69K I93L	NA	B	A
158	3TC, D4T, IDV/r*	INNTR	700	I50L V82F I85V L90M	NA	B	NR
187	AZT, 3TC*, EFV*	Nenhum	1450	D60E L63P	A62V K103N M184V	B	A
234	AZT*, 3TC*, EFV*	Nenhum	1590	D60E L63P	M41L K103N V108I M184V T215Y	B	A
255	AZT*, 3TC*, EFV*	IP*	233	L10I M36I I62V I64V H69K V77I	D67N K70R K103N V108I M184V K219Q	B	A
260	3TC*, TDF*, NVP*	IP*	82	I62V L63P A71T	K65R K103N F116Y Q151M M184V	B	I
273	3TC, TDF, EFV	IP	948	L63P I93L	Nenhuma	B	NR
314	AZT*, 3TC, ABC EFV	IP	364000	V77I I93L	M41L L210W T215D K219Q	B	ND
319	AZT*, 3TC*, ATV/r*	INNTR*	2420	L10I A71V V77I L90M	A62V V106M M184V G190A T215Y	B	A
320	AZT, 3TC*, EFV*	Nenhum	128	L63P I64V	A62V V179D M184V Y188L	B	A
326	AZT, 3TC*, NVP*	Nenhum	867	I64V	M184V G190S	B	A
328	AZT*, 3TC*, ATV*	Nenhum	699	L10V K20R M36I I50L L63P L90M	M41L D67N K70R M184V T215F K219Q	F1	A
328	AZT*, 3TC*, ATV/r	Nenhum	212	L10I I64V	M41L D67N K70R M184V T215F K219Q	F1	A
329	AZT, 3TC, TDF LPV/r*	INNTR	2350	L10F K20I M46I I54V I62V L63P I84V I85V I93L	NA	B	ND
330	DDI, D4T, NFV*	Nenhum*	139	M36I K43T M46I I54V L63P I64V A71V L90M I93L	D67N K103N	B	A
333	3TC*, D4T, IDV/r	INNTR	221	M36I	M184V	B	ND
336	AZT, 3TC, EFV	Nenhum	56	I64V	NA	B	I
338	3TC, D4T, EFV	IP	2830	NA	NA	NA	A
350	DDI, EFV*, LPV/r*	INNTR	253	L10F K20I M36I I54V I62V L63P A71V G73S V82A L90M	M41L D67N K103N M184V L210W T215Y	B	I/A

NA: Não Amplificado

A: Adequada; I: Inadequada; ND: Não Detectável; NR: Não Realizada

*:mutações conferidoras de resistência à classe de ARV já utilizada

*:mutações conferidoras de resistência à classe de ARV nunca utilizada

*:mutações conferidoras de diminuição de sensibilidade ao medicamento em uso

Adicionalmente, entre as mutações secundárias que se destacaram estão: L10F/I/V, M36I, I62V, L63P, I64V, A71T/V, e I93L (Quadro 7).

Quadro 7 - Mutações no gene da protease apresentados pelos sujeitos que desenvolveram falência virológica. SEAP-Casa da AIDS, HC-FMUSP São Paulo, 2005 – 2007

Sujeito n°	L10	K20	L33	M36	K43	M46	I50	I54	D60	I62	L63	I64	H69	A71	G73	V77	V82	I84	I85	L90	I93	
20
21	I	.	V	E	.	P	V	.	.	.	I	M	.
33	.	.	.	I	L
148	.	.	.	I	P	.	K	L
158	L	F	.	V	M	.	.
187	E	.	P
234	E	.	P
255	I	.	.	I	V	.	V	K	.	.	I
260	V	P	.	.	T
273	P	L
314	I	L
319	I	V	.	I	M	.
320	P	V
326	V
328	V	R	.	I	.	.	L	.	.	.	P	M	.
329	F	I	.	.	.	I	.	V	.	V	P	V	V	.	.	L
330	.	.	.	I	T	I	.	V	.	.	P	V	.	V	M	L
333	.	.	.	I
336	V
350	F	I	.	I	.	.	.	V	.	V	P	.	.	V	S	.	A	.	.	.	M	.

Mutações primárias da protease; Mutações secundárias da protease
Sujeitos que apresentaram falência virológica precedida por *blip*

Destaca-se ainda a detecção de mutações conferidoras de resistência ao atazanavir em uso pelo sujeito número 328 (Tabela 18), enquanto utilizava atazanavir não associado ao ritonavir. Depois da associação dessas drogas, apesar da persistência de detecção de valores inferiores da viremia plasmática, as mutações aos IPs não persistiram.

No grupo falência virológica, 14 sujeitos tiveram também suas amostras analisadas genotipicamente para a enzima transcriptase reversa. Doze (86%) deles apresentaram mutações conferidoras de resistência a pelo menos um dos inibidores da transcriptase reversa análogos e/ou não análogos de nucleos(t)ídeos vigentes, sendo 12 demonstrando mutações aos análogos de nucleosídeos e 9 aos não-análogos. A história progressiva de exposição aos anti-retrovirais nesses casos demonstrou que cinco (42%) deles já haviam feito uso de esquemas prévios com trocas ocasionadas por resistência.

Entre as mutações mais freqüentes, destacam-se as que são ocasionadas pelo uso de anti-retrovirais com baixa barreira genética, ou seja, mutações que isoladamente conseguem conferir resistência fenotípica à droga correspondente. São elas K103N e M184V. Dos 10 que apresentaram a mutação M184V, nove estavam em uso do 3TC, droga indutora dessa mutação e cinco deles não apresentavam TAMs concomitantemente. Além disso, pôde-se observar a associação da mutação M184V com outras mutações conferidoras de resistência múltipla, tais como A62V e Q151M em quatro casos. Destes, três indivíduos que apresentavam a mutação A62V, conferidora de resistência a múltiplos anti-retrovirais inibidores da transcriptase reversa análogos dos nucleosídeos, apresentavam também outras mutações relacionadas a essa enzima (Tabela 18 e Quadro 8).

Quadro 8 - Mutações no gene da transcriptase reversa apresentados pelos sujeitos que desenvolveram falência virológica. SEAP-Casa da AIDS, HC-FMUSP São Paulo, 2005 – 2007

Sujeito n°	M41	A62	K65	D67	K70	K103	V106	V108	F116	Q151	V179	M184	Y188	G190	L210	T215	K219
21
187	.	V	.	.	.	N	V
234	L	N	.	I	.	.	.	V	.	.	.	Y	.
255	.	.	.	N	R	N	.	I	.	.	.	V	Q
260	.	.	R	.	.	N	.	.	Y	M	.	V
273
314	L	W	D	Q
319	.	V	M	V	.	A	.	Y	.
320	.	V	I	.	.	.	D	V	L
326	V	.	S	.	.	.
328	L	.	.	N	R	V	.	.	.	F	Q
330	.	.	.	N	.	N
333	V
350	L	.	.	N	.	N	V	.	.	W	Y	.

Mutações primárias da Transcriptase Reversa; Mutações secundárias da Transcriptase Reversa
Sujeitos que apresentaram falência virológica precedida por *blip*

Em relação aos compostos inibidores da transcriptase reversa não-análogos nucleosídicos, observou-se presença de mutações conferidoras de resistência a essa classe de fármacos em nove participantes do estudo que apresentaram o desfecho falência virológica. Desses, sete estavam em uso dessa classe de drogas, enquanto um já as havia utilizado e outro era virgem de tratamento com INNTR. Seis (67%) sujeitos apresentaram a mutação K103N. Nove (64%) mostraram também mutações de resistência a ambas as classes de inibidores de transcriptase reversa.

Polimorfismos e dupla população detectados no gene da Prot e da TR dos indivíduos que desenvolveram um dos desfechos são apresentados nos Anexos 4 e 5.

No que tange à classificação de subtipos de HIV, verificou-se na coorte estudada que dos 37 sujeitos analisados por seqüenciamento genotípico, 35 (94,5%) eram infectados pelo subtipo B e dois (5,5%) participantes pelo subtipo F1.

4.9 Descrição dos resultados da dosagem plasmática de anti-retrovirais nos sujeitos que apresentaram os desfechos *blip* e falência virológica

Dos 20 sujeitos acompanhados na coorte que apresentaram o desfecho *blip* dos quais se obtiveram amostras concomitantes ao evento para realização de testes genotípicos e farmacológicos, foram realizadas dosagem de IPs e INNTRs, em 12 e 8 casos, respectivamente. Quinze amostras (75%) revelaram níveis plasmáticos adequados dos anti-retrovirais em uso, cinco (25%) apresentaram concentrações plasmáticas inadequadas e, em três dessas, as dosagens estavam até mesmo abaixo do limite inferior de detecção dos testes (Tabela 17).

Dos três indivíduos, cuja análise genotípica demonstrava diminuição de sensibilidade a alguma droga do esquema anti-retroviral em uso, dois referiram não terem falhado no uso da medicação na semana que antecedeu o evento *blip* e apresentaram dosagens plasmáticas adequadas dos fármacos, enquanto o terceiro, no qual não demonstrou detecção plasmática do INNTR prescrito, confirmou a má adesão durante a entrevista ao afirmar

que havia deixado de tomar mais de três doses prescritas na semana que precedeu o desenvolvimento do desfecho em questão.

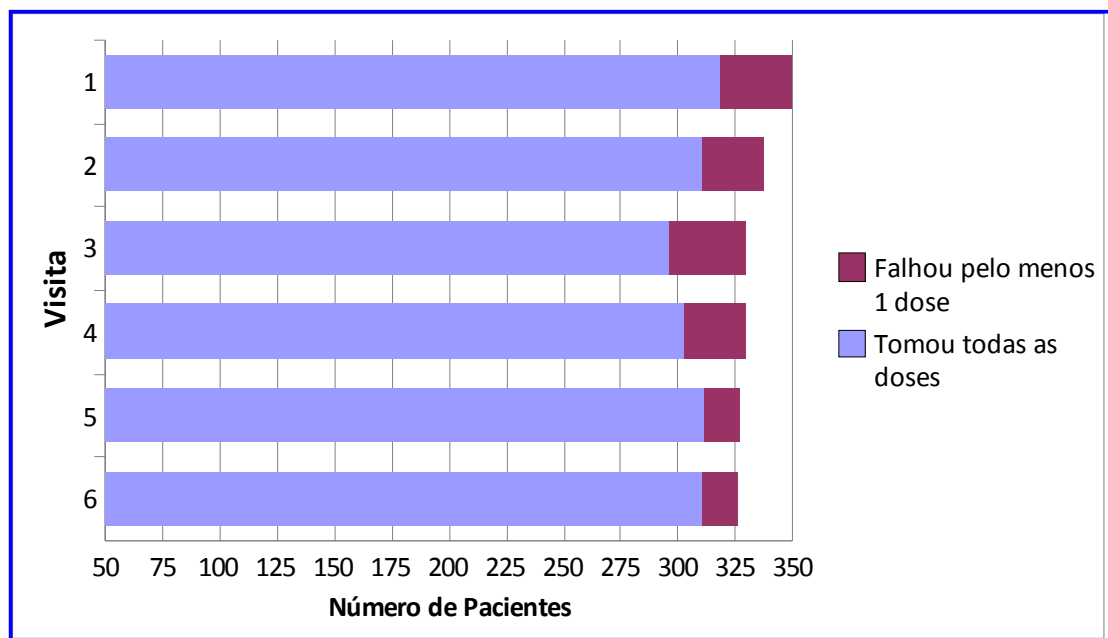
No grupo de 21 indivíduos que apresentou o desfecho falência virológica, obtiveram-se amostras concomitantes ao evento para a realização dos testes genotípicos e farmacológicos em 19, tendo sido realizada dosagem plasmática de INNTRs e IPs em 11 (55%) e 9 (45%) casos, respectivamente. Em um caso foi efetuada a dosagem de ambas as classes de anti-retrovirais. Treze amostras (65%) revelaram níveis plasmáticos adequados dos anti-retrovirais, sete (35%) apresentaram concentrações inadequadas, das quais em quatro não se demonstrou detecção do fármaco (Tabela 18).

Ainda nesse grupo, o único indivíduo que não apresentou mutações conferidoras de resistência apresentava baixa viremia e concentrações plasmáticas adequadas da medicação. Dos sete que apresentaram mutações conferidoras de resistência aos INNTRs em uso, cinco mostravam uma adequada dosagem do anti-retroviral, enquanto nos outros dois, a mesma encontrava-se inadequada. Dos 5 indivíduos que demonstraram mutações conferidoras de resistência aos IPs em uso, 3 apresentavam dosagem plasmática do IP adequada. Pôde-se observar no grupo de falência virológica que a maioria dos indivíduos com mutações conferidoras de resistência apresentava dosagem plasmática adequada do anti-retroviral, tendo assim, como causa de falência virológica, a existência da própria mutação.

4.10 Descrição de dados relativos à adesão auto-relatada à terapêutica e à dosagem de concentrações plasmáticas de medicamentos anti-retrovirais

Tomando como base as informações auto-referidas sobre adesão à terapia anti-retroviral prescrita, coletadas nas visitas de seguimento do estudo, observou-se tomada de todas as medicações em cerca de 90% dos pacientes ao longo do estudo, atingindo 95% no período final do estudo (Gráfico 2).

Gráfico 2 - Adesão auto-referida ao uso da medicação anti-retroviral, ao longo do seguimento. SEAP-Casa da AIDS, HC-FMUSP, São Paulo, 2005 – 2007



A dosagem plasmática de anti-retrovirais foi conduzida em 120 amostras disponíveis para a análise, obtendo-se resultados conclusivos em 100% delas. Ressalta-se que duas amostras continham duas medicações anti-retrovirais diferentes, totalizando, portanto, 122 aferições.

Observaram-se em 84/122 (69%) casos concordância em relação à interpretação de adesão à terapia anti-retroviral, quando comparados os resultados da dosagem sérica dos fármacos (adequada versus inadequada) com a adesão auto-referida pelo paciente nas entrevistas realizadas nas visitas de acompanhamento da coorte (Tabela 19).

Tabela 19 - Comparação dos resultados da dosagem plasmática de anti-retrovirais com a adesão à terapia relatada pelos sujeitos. SEAP-Casa da AIDS, HC-FMUSP, São Paulo, 2005 – 2007

Autoquestionário	Dosagem plasmática	
	Adequada	Inadequada
Aderente	78	32
Não-aderente	6	6

Os resultados da avaliação farmacológica são confrontados de modo detalhado com os resultados da dosagem plasmática dos anti-retrovirais, dados de carga viral de HIV e adesão auto-referida à terapia pelo paciente no momento da respectiva entrevista nas tabelas 20A, 20B e 21.

Tabela 20A - Resultados da dosagem plasmática dos anti-retrovirais obtidos em momentos de desfecho e de carga viral indetectável nos indivíduos (8 ao 200) que apresentaram *blip*. SEAP-Casa da AIDS, HC-FMUSP, São Paulo, 2005 – 2007

Indivíduo n°	CV	Visita	INNTR/IP	Horas após última dose	Dosagem ng/mL	Nível	Adesão
8	171	3	NVP	10	6 395	A	A
12	68	3	ATV/r	12	1 001/88	A	A
29	458	2	LPV/r	8	11 433/176	A	I
39	<50	1	NVP	14	4 394	A	A
39	4 470	2	NVP	48	ND	I	I
44	579	1	EFV	10,5	1 425	A	A
44	<50	2	EFV	11	1 674	A	I
48	56	1	LPV/r	4	10 588/458	A	A
48	<50	2	LPV/r	3,5	7 078/155	I	A
53	<50	1	EFV	9	1 651	A	A
53	82	2	EFV	9	1 431	A	A
59	124	1	EFV	12	1 121	A	A
59	<50	2	EFV	10	1 484	A	A
65	87	1	NVP	11	3 068	A	A
65	<50	2	NVP	24	442	I	A
70	<50	5	LPV/r	15	8 817/105	A	A
70	136	6	LPV/r	15	7 985/112	A	A
107	56	1	EFV	12	ND	I	A
107	61	4	EFV	12	ND	I	A
111	<50	4	ATV	10	1 393	A	A
111	892	5	ATV/r	10	719/37	A	A
116	<50	5	ATV/r	22	751/21	A	A
116	62	6	ATV/r	22	701/ND	A	A
118	<50	3	EFV	14	1 184	A	A
118	596	4	EFV	13	1 792	A	A
124	<50	1	LPV/r	11	ND	I	A
124	55	2	LPV/r	12	ND	I	A
155	<50	2	EFV	12	1 720	A	A
157	11 500	1	LPV/r	11	ND	I	A
157	<50	2	LPV/r	11	ND	I	A
161	<50	5	ATV	1,5	1 599	I	A
161	6 650	6	ATV	1,5	819	I	A
167	<50	5	EFV	8	2 940	A	A
167	105	6	EFV	9	1 776	A	A
170	<50	2	ATV	10	487	A	A
200	<50	5	LPV/r	12	5 467/68	A	A
200	646	6	LPV/r	13	4 111/27	A	A

A: Adequada; I: Inadequada; ND: Não Detectável

Tabela 20B - Resultados da dosagem plasmática dos anti-retrovirais obtidos em momentos de desfecho e de carga viral indetectável nos indivíduos (208 ao 345) que apresentaram *blip*. SEAP-Casa da AIDS, HC-FMUSP, São Paulo, 2005 – 2007

Indivíduo n°	CV	Visita	INNTR/IP	Horas após última dose	Dosagem ng/mL	Nível	Adesão
208	425	6	LPV/r	11	6 158/111	A	I
213	<50	5	EFV	10	2 379	A	A
213	143	6	EFV	10	1 137	A	A
223	<50	3	LPV/r	13	435/ND	I	A
223	184	4	LPV/r	13	5 979/58	A	A
225	<50	5	LPV/r	3	6 000/168	A	A
225	1 330	6	LPV/r	3,5	13 396/247	A	A
227	<50	3	ATV/r	11	2 512/49,6	A	A
227	70	4	ATV/r	11	ND	I	A
227	74	6	ATV/r	11	2 350/70,8	A	A
228	68	4	ATV	18	338	A	A
261	<50	1	EFV	10	925	I	A
261	99	2	EFV	10	299	I	A
272	<50	5	ATV/r	24	394	A	A
272	86	6	ATV/r	24	ND	I	A
274	<50	2	LPV/r	8	6 925/252	A	A
274	<50	3	LPV/r	8	4 121/21,1	A	A
274	89 400	4	LPV/r	96	ND	I	I
283	1 400	6	LPV/r	36	5 681/112	A	I
291	<50	2	LPV/r	14	1 400/73	I	A
291	277	3	LPV/r	13	5 000/154	A	A
296	<50	4	EFV/LPV/r	10_12	2 777/7 844/160	A/A	A
305	<50	5	LPV/r	11	5 769/84	A	A
305	73	6	LPV/r	11	5 234/64,7	A	A
337	<50	3	ATV/r	19	208/ND	I	A
337	101	4	ATV/r	17	1 420/44,3	A	A
343	<50	4	ATV/r	23	618/ND	A	A
343	51	5	ATV/r	22	1 093/42	A	A
343	<50	6	ATV/r	22	516	A	A
345	278	2	APV/r/EFV	11	1 900/109/857	A/I	A

A: Adequada; I: Inadequada; ND: Não Detectável

Tabela 21 - Resultados da dosagem plasmática dos anti-retrovirais obtidos em momentos de desfecho e de carga viral indetectável nos indivíduos que apresentaram falência virológica. SEAP-Casa da AIDS, HC-FMUSP, São Paulo, 2005 – 2007

Indivíduo n°	CV	Visita	INNTR/IP	Horas após última dose	Dosagem ng/mL	Nível	Adesão
20	94	1	LPV/r	15	4 120/65	A	A
20	2 260	2	LPV/r	13	10 113/169	A	I
20	<50	3	LPV/r	2	4 934/81,4	I	A
21	2 210	2	LPV/r	10	5 689/72	A	A
21	22 300	5	LPV/r	10	ND	I	A
33	102	1	NFV	10	2 139	A	A
33	2 900	2	NFV	10	660	I	I
148	831	1	EFV	10	6 361	A	A
158	132	1	IDV/r	8	4 771/193	A	A
158	<50	3	IDV/r	11	2 090/ND	A	A
187	<50	4	EFV	10	1 092	A	A
187	517	5	EFV	10	931	I	A
187	1 450	6	EFV	11	1 083	A	A
234	<50	2	EFV	9	2 552	A	A
234	1 590	3	EFV	9	3 088	A	A
234	2 230	4	EFV	9	2 737	A	A
255	233	3	EFV	12	1 420	A	A
255	341	4	EFV	11	1 688	A	A
260	76	1	NVP	12	2 671	A	A
260	<50	2	NVP	12	2 600	A	A
260	111	3	NVP	12	2 601	A	A
260	126	4	NVP	13	3 271	A	A
314	364 000	1	EFV	12	ND	I	A
314	<50	4	EFV	9	265	I	A
319	2 420	1	ATV	16	812	A	A
320	475	2	EFV	12	985	I	A
320	252	3	EFV	12	1 177	A	A
326	867	1	NVP	1	3 068	A	A
328	699	2	ATV	20	389	A	A
328	212	4	ATV/r	18	1 519/97	A	A
329	2 350	1	LPV/r	24	ND	I	I
330	<50	1	NFV	10	1 412	A	A
330	81	2	NFV	12	808	I	A
330	139	3	NFV	12	1 072	A	A
333	80	2	IDV/r	12	1 649/581	A	A
333	221	3	IDV/r	96	ND	I	I
336	<50	4	EFV	9	0,872	I	A
336	63	5	EFV	11	446	I	A
336	56	6	EFV	11	758	I	A
338	2 830	1	EFV	11	1 178	A	A
350	253	1	LPV/r/EFV	12 – 12	4 856/643	A/I	A

A: Adequada; I: Inadequada; ND: Não Detectável

5 Discussão

Nesse estudo procurou-se avaliar prospectivamente indivíduos infectados por HIV que mantinham carga viral indetectável sob uso da terapêutica anti-retroviral quanto à possibilidade de apresentarem escapes transitórios da viremia ou mesmo viremia detectável de forma persistente (duas determinações consecutivas de carga viral de HIV-RNA com intervalo de três meses). Considerando que a literatura estrangeira registra frequência variável de viremia transitória (entre 16 e 53%)^{16-18,20,22-26,29} e de falência virológica (7 a 13%)^{22,23} em populações com essas características, a falta de dados nacionais sobre o tema e o fato das causas de tais desfechos ainda não terem sido suficientemente elucidadas, torna-se fundamental caracterizar melhor sua frequência e investigar fatores a eles associados em indivíduos acompanhados em serviço especializado brasileiro, para que possa avaliar com mais clareza o impacto clínico-laboratorial que esses fenômenos podem induzir em pacientes tratados segundo as diretrizes estabelecidas pelo Ministério da Saúde para o manejo clínico da infecção por HIV.

Buscou-se assim estudar um número significativo de indivíduos com viremia controlada em uso de diferentes esquemas anti-retrovirais, a partir do universo de sujeitos com essa característica que freqüentam uma unidade de referência no cuidado a pessoas que vivem com HIV/aids, e comparar aqueles que desenvolvem *blip* ou falência virológica em seu

seguimento clínico-laboratorial com os que não apresentam os mesmos desfechos, ou seja, que permanecem com carga viral indetectável ao longo do seguimento.

Nesta coorte, pouco mais de 80% dos indivíduos se mantiveram com a carga viral indetectável ao longo da pesquisa, dado superior ao previamente descrito na literatura (60%)²⁹, em estudo que acompanhou por mediana de 485 dias (69 semanas) 448 indivíduos, 80% dos quais já haviam experimentado pelo menos uma troca de esquema terapêutico, e que adotou critérios semelhantes aos nossos no tocante ao intervalo entre coletas de exames laboratoriais e limite inferior de detecção da carga viral.

A frequência de *blip* de 12,6% encontrada em nosso estudo foi discretamente inferior aos dados encontrados na literatura, mesmo os mais recentes, os quais estão em torno de 16-53%^{16-18, 20, 22-26, 29}. Porém, outros critérios de definição do desfecho *blip* foram utilizados por vários desses estudos, variando entre valor único de carga viral entre 50 cópias/mL e 400 cópias/mL, carga viral detectável não superior a 200 cópias/mL, e para outros ainda, um limite de 1.000 cópias/mL. Além disso, contrariamente ao presente estudo, a maioria deles constitui-se de análises retrospectivas. Ressalta-se que o trabalho¹⁶ que apresentou a maior frequência da literatura até hoje obtida (53%), analisou indivíduos que faziam uso de dupla ou tripla terapia anti-retroviral, o que pode provavelmente ter permitido aos autores identificar maior frequência de *blips*. Nesses estudos, os intervalos adotados para coleta de exames laboratoriais evolutivos foram inferiores aos estabelecidos para o presente estudo, alguns dos quais analisaram carga

viral de HIV semanalmente. Outros apresentaram um tempo de seguimento superior. Tais diferenças podem explicar o fato de descrevermos menor frequência de *blip* obtida. Nosso estudo foi projetado com intuito de fazê-lo ser mais comparável com as condições habitualmente observadas na prática cotidiana de seguimento clínico de pacientes infectados por HIV, com visitas a cada 12 semanas de seguimento e adotando-se viremia superior a 50 cópias/mL como definidora do desfecho.

Por outro lado, nossos resultados apontam para frequência de *blip* discretamente superior apenas a outros dois trabalhos publicados. O primeiro encontrou 9,1% em pacientes que utilizaram somente IP como terceira droga. Cabe ressaltar que esse estudo utilizou para a definição de *blip* um corte superior de carga viral (500 cópias/mL), o que contribuiu fortemente para o achado de menor frequência do desfecho, quando comparada àquela obtida por outros trabalhos²⁷. O segundo obteve uma frequência de 11%, com critério de *blip* definido com dosagem plasmática de carga viral de HIV entre 50 e 1.000 cópias de HIV-RNA/mL, com visitas a cada 12 semanas e com 389 participantes, características essas semelhantes às nossas²¹.

Em relação à incidência, apenas três estudos calcularam esse dado, visto que a maioria dos trabalhos realizados no assunto teve caráter retrospectivo. A nossa incidência de 9,4 *blips*/100 pessoas-ano foi inferior aos dados de literatura, que variaram entre 19,4 a 37,4 *blips*/100 pessoas-ano^{20,22,29}. Cabe ressaltar que a pesquisa que obteve a maior incidência, apresentava um maior número de indivíduos com mais de um *blip*²².

A frequência da falência virológica obtida foi de 6%, ligeiramente inferior aos resultados obtidos dos estudos, que oscilaram em torno de 10% (7,6-13,8%)^{17, 18, 20, 22}. Em nosso estudo foi possível calcular a densidade de incidência desse desfecho em 4,2/100 pessoas-ano, porém não há dados de literatura com cálculos semelhantes que permitam a adequada comparação de nossos achados.

Cabe destacar que a grande maioria dos casos de falência virológica identificados no presente estudo não se traduziu em falência terapêutica, por falta de identificação de desfechos de importância clínica, tendo determinado troca de esquemas de terapia anti-retroviral em apenas três casos. Em parte a baixa associação entre falência virológica e falência terapêutica neste estudo pode ser explicada pelo conceito restrito utilizado para definir falência virológica, visto que 8 (38%) dos 21 indivíduos que apresentaram duas cargas virais consecutivas positivas apresentaram valores inferiores a 1.000 cópias/mL, com mediana de carga viral no momento em que se definiu a falência virológica inferior a 2.000 cópias/mL. Essas elevações de carga viral podem ser justificadas por fenômenos temporários ocorridos e/ou por mutações que, *per se*, são incapazes de sustentar a replicação de vírus mutantes, voltando o mesmo indivíduo a apresentar predomínio de cepas sensíveis ao esquema em utilização, tornando esses vírus incapazes de conferir um conjunto de mutações conferidoras de resistência sustentável e, conseqüentemente, induzir a falência terapêutica. Algumas explicações podem ser dadas a esse fenômeno. Primeiro, as cepas de HIV contendo várias mutações capazes de conferir resistência aos anti-retrovirais

isoladamente podem persistir fenotipicamente sensíveis à combinação daquelas drogas. Segundo, variantes de vírus resistentes têm uma capacidade comprometida de se replicar. Neste estudo, 10 dos 14 indivíduos que tiveram suas amostras submetidas às análises genotípicas no momento da falência apresentavam a mutação M184V. Sabe-se que os vírus que contêm esta mutação apresentam uma capacidade replicativa prejudicada⁷⁴. Em contrapartida, podem ocasionar uma hipersensibilidade aos INTRs.

Cabe ainda discutir que no presente estudo pouco mais de 80% dos participantes apresentavam mais de 350 células CD4+/mm³ à admissão no estudo, com média e mediana de células T CD4+ superiores a 500/mm³. Esse fato pode ter contribuído para a ocorrência de uma menor frequência de *blip* e de falência virológica, pois na literatura há estudos que demonstraram uma associação entre número de células T CD4+ inferior a 200/mm³ com o desenvolvimento de *blip* e de falência virológica^{20,75,76}, embora tal constatação não seja unânime^{23,24,48}.

Vários fatores já foram aventados como potencialmente associados à ocorrência do evento *blip* ou de falência virológica, dos quais alguns já foram avaliados na literatura, tal como, a falha na adesão aos medicamentos, o uso de vacinas, a presença de infecção concomitante e o número de esquemas anti-retrovirais previamente utilizados.

No presente estudo não foi encontrada associação independente entre a ocorrência de *blip* e fatores sócio-demográficos, incluindo, idade, sexo, cor auto-referida, grau de instrução, renda per capita, e outras variáveis, como, por exemplo, comportamento de risco relacionado à

infecção por HIV, ou ter parceiro fixo infectado por HIV. De modo análogo, outros autores também não encontraram associação entre os fatores sócio-demográficos e categorias de exposição ao HIV com os desfechos do estudo^{24,29}. Em contrapartida, Easterbrook et al²⁵ observaram diferenças entre os sexos na ocorrência de *blip*, com frequência significativamente maior entre os homens.

Resultados semelhantes foram obtidos na análise comparativa entre os grupos falência virológica e não-falência virológica, à semelhança do previamente descrito na literatura^{17,18}, mostrando que variáveis sócio-demográficas parecem não exercer influência na ocorrência dos desfechos estudados.

Da mesma forma, as categorias de exposição, classificadas segundo a forma presumida de aquisição do HIV, não se mostraram preditoras de viremia transitória em nosso estudo, em consonância com resultados de outros estudos^{25-26,29,48}.

No tocante a dados clínicos e hábitos, não demonstramos diferenças estatisticamente significativas na ocorrência dos eventos de interesse em relação a tomar outras medicações concomitantes, apresentar diarreia, infecção concorrente, ter sido imunizado, feito uso de álcool ou droga ilícita no mês precedente à avaliação. Easterbrook et al²⁵, ao contrário, demonstraram que 6,8% dos indivíduos que evoluíram com viremia transitória apresentaram interação medicamentosa, porém não explicitaram quais e nem tampouco como foram avaliadas tais interações. No presente estudo, a ausência de associação entre o uso de medicação concomitante e

o desenvolvimento dos desfechos estudados pode ter sido decorrente da pequena frequência de uso de fármacos capazes de interferir na metabolização dos anti-retrovirais observada na coorte.

No que concerne a ocorrência de infecções concomitantes, discute-se amplamente na literatura^{36,37} a possibilidade dessas poderem determinar viremia transitória de HIV, sendo reconhecidamente capazes de estimular a replicação viral no *pool* de células com infecção latente. De fato, Esterbrook et al²⁵ registraram a ocorrência de 26,2% de infecções concorrentes ou vacinação nos indivíduos que apresentaram *blip*. No presente estudo também obtivemos uma frequência semelhante de infecções concorrentes (27%) nesse grupo; no entanto não se conseguiu identificar tal fator como preditor da ocorrência dos desfechos de interesse. Uma possível justificativa para tal fato poderia ser a transitoriedade da ativação do *pool* de células infectadas, determinando assim viremia fugaz com subsequente indetectabilidade da mesma após curto espaço de tempo. Tal fenômeno foi demonstrado após estimulação antigênica decorrente de imunizações, como detalhado a seguir.

Atenção particular têm merecido as imunizações como indutoras de incremento da viremia em pessoas que vivem com HIV. Há evidências na literatura, de que a vacinação contra influenza e anti-pneumocócica podem-se associar à ocorrência de viremia transitória^{39,40,43-45}, porém dados conflitantes já foram descritos em outros estudos^{41,77-80}. Parte dessa discrepância pode ser justificada por diferenças metodológicas, como, por exemplo, a definição do intervalo entre a administração da dose vacinal e a

aferição de carga viral. Quando analisamos o tempo em que a aferição foi feita, alguns estudos a fizeram em período inferior a sete dias após a vacinação^{39,40,43-45,78}, enquanto outros obtiveram amostras após 14 a 28 dias. Cinco entre seis estudos que optaram por aferição mais precoce obtiveram carga viral detectável^{39,40,43-45,78} em contraste com somente dois dos estudos com avaliação mais tardia.

Esses dados corroboram o fato de que a imunização pode levar ao aumento transitório e benigno da carga viral em indivíduos sob uso de terapêutica anti-retroviral de alta potência. No entanto, existem três estudos que mostraram que tal elevação pode persistir mais prolongadamente entre 1 a 3 meses ou mais após a vacinação, sem conseqüências clínico-virológicas. Alguns dos trabalhos citados, nos quais se identificou viremia transitória após vacinação não apresentaram dados relacionados ao uso de esquemas anti-retrovirais^{40,44,45}. Por outro lado, em outros, que demonstraram a presença de viremia detectável após imunização em sujeitos em tratamento anti-retroviral, deve-se lembrar que a metade deles especificou que os indivíduos estavam sob uso de mono ou dupla terapia com INTRs, esquemas hoje entendidos como incapazes de propiciar supressão da replicação viral de forma sustentável.

No presente estudo de coorte foram identificados apenas 22 e 27 indivíduos que haviam sido vacinados no mês precedente à avaliação para análise dos desfechos *blip* e falência virológica, respectivamente. Desses apenas um indivíduo, desenvolveu viremia transitória e três, falência virológica. O pequeno número de sujeitos imunizados nos limitou na análise mais precisa dessa variável como preditora dos desfechos de interesse.

Um destaque deve ser dado à variável adesão às práticas de sexo mais seguro em nosso estudo, uma vez que a não adesão a tais práticas, ou seja, o relato de sexo desprotegido se mostrou forte preditor da ocorrência tanto de *blip* como de falência. Não encontramos descrição prévia na literatura de que essa variável pudesse ter tal papel preditor da ocorrência de *blip* ou de falência virológica.

Do ponto de vista patogênico, no entanto, pode-se especular que a reexposição a antígenos virais possa estimular a resposta imune dos hospedeiros infectados, levando secundariamente a incremento da replicação do HIV. Willberg et al⁸¹ compararam a resposta imune específica anti-HIV em indivíduos soropositivos com parceiros sexuais sorocordantes virêmicos e avirêmicos em relação à história de práticas sexuais desprotegidas, considerando que a viremia é associada à intensidade de excreção genital do vírus^{82,83}. Os indivíduos cujos parceiros eram virêmicos apresentaram resposta específica de células T mais intensa, quando comparados à exibida por aqueles com parceiros avirêmicos. Inferiram os autores que a prática de sexo desprotegido com parceiro virêmico poderia ter levado a reexposição ao vírus, com conseqüente ativação imunológica e aumento da viremia. A ativação celular pôde ser demonstrada tanto para células T CD4+ como para linfócitos CD8+ específicos. Adicionalmente verificaram que a redução da freqüência de práticas sexuais desprotegidas foi acompanhada prospectivamente de redução na intensidade de resposta imune celular.

Em nosso estudo, apesar de ter sido evidenciada a associação independente entre prática de sexo desprotegido e ocorrência dos desfechos de interesse, não houve associação entre esses e o status sorológico dos parceiros dos participantes, nem tampouco pôde ser analisada sua situação no tocante à presença de viremia detectável. Também não se distinguiram as práticas sexuais ocorridas e se essas se deram com parceiro único ou múltiplo. Em função disso, não se pode concluir se de fato houve reexposição ao vírus.

Alternativamente, outra explicação pode ser aventada para justificar os achados acima citados. Deve-se considerar a possibilidade das práticas de sexo desprotegido refletir um contexto mais abrangente de falta de adesão. Nesse sentido indivíduos que relatam baixa adesão às práticas de sexo mais seguro poderiam também exibir falha de adesão à medicação anti-retroviral. De fato, Kalichman et al⁸⁴, ao estudarem uma amostra de conveniência em 275 homens e 116 mulheres infectados por HIV em serviços de saúde de Atlanta, EUA, demonstraram que a baixa adesão aos anti-retrovirais e o comportamento sexual de risco estavam associados entre si. Seus resultados indicaram que os indivíduos que mais falhavam doses de medicação foram os que mais se engajaram em práticas sexuais desprotegidas, tanto anais quanto vaginais, nos três meses que precederam a pesquisa.

Apesar do nosso estudo não ter demonstrado diferença significativa no auto-relato de adesão aos anti-retrovirais em relação à ocorrência dos desfechos avaliados, cabe ressaltar que a informação obtida dessa forma

apresentou baixa concordância com os resultados de dosagem plasmática dos fármacos.

Outro preditor da ocorrência de *blip* e de falência virológica nesta coorte foi a história de exposição a maior número de esquemas ARV, corroborando dados de dois trabalhos previamente realizados. Sungkanuparph et al²⁰ relataram que o uso prévio de pelo menos um esquema ARV elevava em duas vezes o risco de desenvolver *blip* ($p < 0.001$). Moore et al¹⁸ demonstraram que os indivíduos que haviam feito uso de 4 ou mais esquemas apresentaram maior frequência de *blip* e de falência virológica, se comparados aos menos experimentados. De modo mais detalhado outros estudos avaliaram o uso de diferentes classes de ARV, demonstrando que o uso prévio de INTRs associava-se à ocorrência de *blip*^{25,28,48}. Opostamente a esses resultados, Sklar et al²⁹, num estudo com 448 pacientes que obteve 27,2% de viremias transitórias, não encontraram diferenças estatísticas entre o grupo que apresentou *blip* comparado aquele com carga viral indetectável no tocante ao uso de maior número de esquemas. Além disso, o fato de o indivíduo ser virgem de tratamento ou ter feito uso de ARV prévio também não mostrou diferença na ocorrência para *blip* ($p = 0.31$).

Ao se tentar detalhar o motivo da troca de esquemas em nossa coorte, verificando associação entre os desfechos de interesse e o número de trocas de ARV por auto-relato de resistência medicamentosa, observamos na análise bivariada que houve maior número de trocas dessa natureza nos grupos que apresentaram *blip* e falência virológica. Entretanto,

tal associação não se manteve no modelo final de regressão logística, no qual o relato de exposição a maior número de esquemas terapêuticos (independentemente do motivo de troca) mostrou-se preditor dos desfechos. Esse fato parece apontar para uma imprecisão na obtenção de informação relativa a trocas por resistência. Deve-se considerar que os participantes poderiam não conhecer o motivo da troca, ou eventualmente, alterações terapêuticas, mesmo que motivadas por intolerância ou adequação posológica, poderiam ter se dado em momento no qual mutações genotípicas virais já estivessem presentes.

De modo análogo, maior tempo de infecção por HIV não se mostrou preditor do desfecho *blip*, após controle para as demais variáveis incluídas no modelo multivariado. Essa constatação pode ser explicada pelo fato desses indivíduos terem maior chance de serem multiexperimentados à terapêutica, fator esse identificado como preditor independente da ocorrência de viremia transitória, como previamente descrito^{21,24,48}.

Em relação aos esquemas anti-retrovirais em uso, verificamos frequência significativamente maior de *blip* entre os indivíduos que utilizavam IP, quando comparados aos que utilizavam INNTR, associação essa que se perdeu após controle de outras variáveis. Sungkanuparph et al²⁰ aventaram a possibilidade de haver maior risco de ocorrência de viremia entre os indivíduos em uso de INNTR, dado que essa classe de anti-retrovirais exibe menor barreira genética para resistência aos ARV, ou seja, necessita de menor número de mutações para alcançar resistência ou a facilidade na seleção de determinada mutação de resistência e, portanto, teoricamente

poderia haver maior chance de acúmulo de mutações conferidoras de resistência com conseqüente falência virológica, porém não encontraram associação entre a classe de ARV utilizada e o desenvolvimento de *blips* ou falência virológica. Resultados semelhantes foram também descritos por outros autores^{26,29}.

Sabe-se que as diretrizes do Ministério da Saúde para terapia anti-retroviral estabelecem não apenas quando o tratamento deve ser iniciado, como também recomenda quais esquemas devem ser priorizados. Por ocasião da realização do presente estudo dava-se preferência para o emprego de INNTR associados a INTR, ficando os IP como opção alternativa⁴. Assim sendo, o uso de IP ficava reservado para indivíduos mais experimentados, nos quais se observasse falha terapêutica ou efeito indesejável ao INNTR. Tal situação justifica o fato do esquema ARV não se mostrar preditor dos desfechos de interesse deste estudo, após controle pelo número de esquemas previamente utilizados à semelhança do discutido para as variáveis esquema anti-retroviral utilizado, tempo de infecção por HIV e auto-relato de maior número de trocas de anti-retrovirais por resistência medicamentosa.

No tocante à adesão auto-referida à medicação anti-retroviral, não encontramos associação significativa desse fator com a incidência de *blip* ou falência virológica, analogamente ao descrito por Miller et al²⁴. Uma justificativa pode ser o fato de que foi elevada a proporção de indivíduos que relataram fazer uso da medicação anti-retroviral corretamente ao longo de nosso estudo, variando de 90 a 95% entre as visitas feitas.

Por outro lado, deve-se considerar que a variável adesão à terapia tem sido aferida de modo heterogêneo por diferentes investigadores o que pode acarretar a obtenção de resultados conflitantes. Podsadecki et al²³, por exemplo, ao empregarem dispositivo eletrônico (MEMS) para aferição de adesão à combinação Lopinavir/ritonavir prescrita, encontraram associação significativa entre essa e a ocorrência de *blip* ($p= 0,007$). Ao mesmo tempo, observaram aumento da adesão nas três semanas que sucediam a detecção de *blip*, justificando-o pelo fato dos sujeitos tomarem conhecimento da positividade de sua viremia detectável.

Tem-se mostrado que, mesmo quando os desfechos de interesse deste estudo não ocasionam falência terapêutica, com conseqüente necessidade de mudança do esquema anti-retroviral vigente, eles podem afetar o número de células T CD4+ periféricas, levando à sua queda^{25,26,29}. Garcia et al⁹ demonstraram que mesmo indivíduos que se mantêm com viremia inferior a 20 cópias/mL podem apresentar redução do número de células T CD4+ no sangue periférico. Atribui-se esse fato à manutenção da replicação viral em tecido linfóide. O impacto da ocorrência dos desfechos sobre o status imunológico dos participantes, tomando como base o número de células CD4+ periféricas, não foi possível avaliar neste estudo, tendo em vista o curto tempo de seguimento após a ocorrência de *blip* e falência virológica.

No presente trabalho, embora não tenha sido adotado limite superior à carga viral observada no momento de definição do desfecho *blip*, a mediana da viremia por ocasião do evento em questão foi inferior a

1.000 cópias/mL, critério considerado pela maioria dos estudos. Pode-se assim comparar nossos resultados com dados da literatura, inclusive com os estudos que consideraram *blip* apenas escape transitório de viremia inferior a 400 cópias/mL.

Apenas três dos 44 (6,8%) indivíduos que apresentaram *blip* evoluíram com falência virológica ao longo do estudo e a viremia transitória não se mostrou preditora desta última ($p=0,738$). Nosso resultado vai ao encontro da maioria dos estudos apresentados na literatura^{16,17,19,20,21,23,26, 28}. Esses alegam que a principal diferença de resultados encontrados na literatura se baseia nas características do grupo de participantes, pois indivíduos que se mantêm por longo tempo com carga viral indetectável têm menor risco de evoluir para falência virológica, diferentemente daqueles que não conseguem atingir esse nadir de carga viral. Entretanto, a interpretação pode ser distinta em caso de escapes repetidos de viremia. Há evidência de que apresentar mais de um *blip*, isto é, manter-se com viremia intermitente de maneira persistente, pode induzir à falência virológica e/ou a mutações conferidoras de resistência^{16,17,19}. Todavia tal fato não foi observado em nossa coorte, uma vez que nenhum dos três pacientes que apresentaram mais de um *blip* evoluiu para falência virológica.

Por outro lado, há estudos que mostram associação entre o fenômeno *blip* e o desenvolvimento de falência virológica^{22,27,29}. Embora o estudo de Masquelier²⁷ tenha adotado definição de desfecho semelhante à nossa, ter considerado *blip* apenas eventos em que se detectou carga viral superior a 500 cópias/mL pode ter sido decisivo para a discordância de resultados com

nosso estudo. Por outro lado, as mutações detectadas no momento *blip* não foram preditoras de falência virológica. De modo interessante, Greub et al²² encontraram gradiente na força de associação entre a ocorrência de *blip* e de falência virológica. Sujeitos que apresentaram um único episódio de *blip* tiveram duas vezes a chance de evoluir para falência virológica, quando comparados com indivíduos avirêmicos, ao passo que os participantes que apresentaram mais de um *blip* tiveram quase 6 vezes tal chance.

Vale a pena destacar outra pesquisa com características semelhantes à nossa, que acompanhou coorte de 330 participantes, na qual apenas três indivíduos dos 37 (8,1%) que desenvolveram *blip* ao longo de 48 semanas de acompanhamento evoluíram para a falência virológica, enquanto outros 11 (16,9%) evoluíram diretamente para falência ($p= 0,25$)⁸⁵. A frequência desta última superou a observada em nossa pesquisa: 18 sujeitos com evolução direta para falência virológica, 5,2% do total de participantes. Van Sighem et al⁸⁶ mostraram que baixas viremias com curto período de persistência não influenciam no desenvolvimento de falência virológica, contrariamente às viremias mais elevadas e persistentes, que contribuem não somente para falência virológica quanto impõem a necessidade de realizar trocas terapêuticas.

No tocante à análise genotípica de seqüências de HIV obtidas de participantes que desenvolveram *blip*, obtiveram-se bons resultados na amplificação e seqüenciamento do gene da protease (17/22), porém foi muito falha a detecção do gene da transcriptase reversa (6/22). Mesmo após utilização de dois pares de *primers* diferentes para cada enzima não se

conseguiu melhorar o desempenho da técnica. Dificuldade semelhante foi também evidenciada no estudo de Macias et al²¹, que lograram amplificar os genes da protease e transcriptase em apenas 5 dos 17 (29,4%) participantes analisados no estudo. O insucesso na amplificação genômica nesses casos pode ter sido decorrente das baixas intensidades de carga viral apresentadas pela maioria dos indivíduos, ou até mesmo por eventual ausência de viremia detectável na amostras seqüenciadas nos casos em que não houve amplificação de nenhum dos genes avaliados.

No presente estudo, foram detectadas mutações conferidoras de resistência viral em apenas seis indivíduos dos que apresentaram o desfecho *blip*, as quais poderiam ocasionar diminuição da sensibilidade do HIV a apenas uma das drogas do esquema anti-retroviral em uso, segundo critérios do IAS⁶⁸. Tal identificação sinaliza potencial comprometimento da eficácia do esquema em uso, podendo-se questionar a necessidade de mudança do esquema anti-retroviral ou, pelo menos, de substituir o fármaco para o qual a eficácia estaria comprometida. Dois desses indivíduos (Tabela 18, sujeitos 39 e 223) não apresentaram mutações aos IP nem aos INNTR, mas resistência intermediária aos INTR foi observada, detectando-se diminuição significativa da sensibilidade ao AZT decorrente da presença de duas TAMs na ausência da mutação M184V, reconhecida como capaz de reduzir o impacto das mutações anteriormente descritas na resistência fenotípica. É importante ressaltar que não se pode assegurar que tais mutações tenham ocorrido no momento *blip*, visto que ambos participantes já relatavam história de troca de medicações por resistência sem realização

de teste genotípico confirmatório e já haviam feito uso de drogas indutoras de TAMs. No terceiro indivíduo foram identificadas mutações no gene da protease, capazes de induzir diminuição de sensibilidade ao Atazanavir em uso, primeiro IP por ele utilizado.

Além desses, o quarto indivíduo apresentou mutações conferidoras de resistência aos INNTR, classe esta já utilizada pelo mesmo, porém ausente no esquema atual (Tabela 18, sujeito 29). Considerando que a maior parcela dos casos mencionados era previamente experimentada a ARV, não se pode relacionar diretamente a presença dessas mutações conferidoras de resistência à ocorrência do evento *blip*, nem tampouco descartar a possibilidade das mesmas existirem previamente à inclusão no estudo. Um dos indivíduos que apresentou mutação no gene da TR (Tabela 18, sujeito 39) apresentou também três mutações secundárias sem nenhuma mutação primária no gene da protease, recebendo esquema sem inibidor de protease, embora tivesse feito uso prévio dessa classe de medicamentos. Seus achados demonstram que as mutações observadas podem persistir mesmo na ausência de pressão seletiva das drogas. Por último, dois participantes apresentaram mutações secundárias à protease sem uso prévio da classe de inibidores dessa enzima. Essas mutações poderiam já estar presentes no momento de sua infecção, ou seja, os indivíduos já teriam adquirido vírus que albergavam essas mutações, ou elas foram geradas espontaneamente após ter adquirido a infecção, uma vez que o indivíduo não fez uso de ARV específico que pudesse exercer uma pressão seletiva. A explicação para esse fenômeno baseia-se no

fato das infecções por vírus RNA serem marcadas pelas variações genéticas virais e o HIV não ser uma exceção. Os retrovírus constituem uma família de agentes virais de alto polimorfismo genético, dentre os agentes infecciosos que atingem os vertebrados. Tal diversidade é caracterizada pelos altos níveis de produção de vírus e pela elevada taxa de erros na transcrição reversa (cerca de $3,5 \times 10^{-5}$ nucleotídeos por ciclo)⁸⁷. Na maioria dos pacientes não tratados, o número total de células produzidas infectadas nos tecidos linfóides é estimado em aproximadamente 10^7 a 10^8 células⁸⁸. Durante a fase crônica da infecção esse número é relativamente estável, refletindo o balanço entre a infecção de novos alvos celulares e seu clareamento. Por causa da meia vida das células infectadas ser remarcadamente curta (1 a 2 dias), a manutenção desse equilíbrio exige que o HIV infecte novos alvos numa taxa extremamente elevada⁸⁹.

Por outro lado, houve 11 participantes cujas amostras, quando analisadas no momento *blip*, apresentavam vírus sensíveis aos esquemas terapêuticos por eles utilizados, corroborando o fato do mesmo não ter sido preditor de falência virológica em nossa coorte e sustentando a idéia de que deva ser encarado como benigno. Deve-se levar em conta, todavia, que nossas análises se basearam predominantemente no seqüenciamento do gene da protease, para o qual a existência simultânea de várias mutações conferidoras de resistência é necessária para permitir replicação sustentada de vírus mutantes e, conseqüentemente contribuir para a incidência de falência virológica.

Diferentemente do observado em relação aos inibidores da protease, há inibidores da transcriptase reversa que possuem baixa barreira genética, como por exemplo, a classe de INNTR e a Lamivudina. Tais compostos requerem apenas uma mutação para que a população de vírus resistente torne-se dominante. Logo, o indivíduo que apresentou mutações aos INNTR (V106I e V108I) provavelmente não apresentou falha terapêutica nem virológica porque não estava em uso dessa classe de medicamentos. Por sua vez, os dois indivíduos que apresentaram mutações conferidoras de resistência no gene da TR (M41L e T215Y) ao AZT em uso obtiveram apenas uma diminuição da sensibilidade à droga e não resistência completa, dada a maior barreira genética apresentada por esse ARV.

Ao analisarmos conjuntamente a presença de mutações conferidoras de resistência viral à análise genotípica e os resultados da avaliação farmacológica realizada por ocasião do evento *blip*, observaram-se em quatro dos seis casos que apresentaram esse desfecho, dosagens plasmáticas adequadas de ARV, concordantes com o auto-relato de adesão à medicação, descartando assim relação entre o desfecho e falha na adesão no período avaliado. O quinto sujeito, apesar de apresentar dosagem adequada de ARV, não relatou ter tomado a medicação adequadamente. O sexto participante, entretanto, apresentou níveis indetectáveis do INNTR prescrito e confirmou ter sido não aderente ao esquema terapêutico na semana que precedeu o desfecho em questão. Nesse caso, a análise genotípica correspondente revelou a presença de mutações conferidoras de

resistência aos INTR, mas não aos INNTR, mostrando que a falha comprovada de adesão ainda não fora suficiente para o aparecimento de mutações relacionadas à resistência a essa classe de ARV.

Nossos resultados assemelham-se aos observados em outros estudos da literatura. Masquelier et al.²⁷, por exemplo, identificaram no momento de *blip* 25% de casos com mutações conferidoras de resistência medicamentosa nos genes da protease e da transcriptase reversa. Um aspecto interessante desse estudo, bem como no de Macias et al.²¹ foi a realização de testes de genotipagem de HIV previamente ao início da terapia anti-retroviral, o que possibilitou identificar a temporalidade entre a identificação das mutações conferidoras de resistência e a ocorrência do evento *blip*.

Outros dados que podem explicar a baixa frequência de mutações conferidoras de resistência no presente estudo baseiam-se no fato de que boa parcela dos participantes eram multiexperimentados somente para INTR, mas não para INNTR ou IP, em vista da primeira classe ter surgido no mercado há mais tempo e, muitos esquemas de mono e dupla terapia já terem sido utilizados. Não se obtiveram análises da maioria das amostras do gene da transcriptase reversa, ou seja, o fato de não encontrarmos mais mutações conferidoras de resistência pode estar baseado na ausência de sucesso na genotipagem dessa enzima. No tocante às mutações do gene da protease, é necessário haver combinação das primárias e secundárias para que o vírus se torne resistente à droga, ou seja, para que as cepas de vírus mutantes recém formadas se tornem a população predominante e com

capacidade replicativa, é necessário maior número de mutações do que o exigido para o gene da transcriptase reversa. Outra justificativa pode ser encontrada no fato das mutações conferidoras de resistência poderem surgir nos reservatórios celulares de pacientes com carga viral indetectável ou baixa viremia. Entretanto nos estudos analisados, assim como no nosso, não foram realizadas análises de genotipagem nas células mononucleares do sangue periférico, local onde poderia ter sido encontrado um maior número de mutações associados à ocorrência de *blip*. Pacientes com baixa viremia freqüentemente têm aumento da replicação de vírus nos reservatórios celulares, locais esses que podem também ser considerados como alvo de cepas virais mutantes.

A detecção de falência virológica representa um momento crítico no acompanhamento clínico de pacientes em uso de HAART. Deve-se nessa circunstância investigar criteriosamente a adesão aos anti-retrovirais e buscar identificar eventual resistência medicamentosa, de modo a possibilitar ao clínico a correta tomada de decisão em relação ao manejo do paciente. Em nossa coorte observamos que mutações secundárias aos IP foram identificadas em 19 dos 20 sujeitos analisados com sucesso por ocasião da falência virológica, porém apenas em 10 (50%) indivíduos as mutações em conjunto, possuíam capacidade de conferir resistência terapêutica aos inibidores dessa enzima viral, segundo os critérios de interpretação utilizados pelo IAS⁶⁸.

Entretanto é importante ressaltar que sete (70%) deles estavam sob uso de IP, dois relatavam uso prévio de IP e um nunca havia utilizado essa

classe de medicamento até o momento analisado. Dos nove indivíduos que se apresentaram com vírus sensíveis aos inibidores dessa enzima, seis possuíam mutações conferidoras de resistência no gene da transcriptase reversa, dois não obtiveram sucesso na amplificação do gene da TR e outro não apresentava mutações conferidoras de resistência a nenhuma classe de ARV. Infelizmente, não se pôde realizar, nesse sujeito, a dosagem plasmática dos ARV para avaliar se a falência virológica poderia ter sido conseqüente a falha na adesão.

Mutações primárias conferidoras de resistência aos IP foram detectadas em situação de falência virológica somente entre indivíduos experimentados a essa classe de anti-retroviral, corroborando o conceito de que a persistência de vírus mutantes a essa classe de drogas exige manutenção de viremia detectável por mais tempo e/ou maior elevação de seus níveis⁹⁰.

Os sujeitos submetidos à análise genotípica de HIV para a enzima transcriptase reversa por ocasião de falência virológica apresentaram alto percentual de mutações conferidoras de resistência no gene que codifica essa enzima. Essa constatação pode ser explicada pela elevada prevalência de mutações que podem, isoladamente, conferir resistência fenotípica à droga em uso, por apresentarem baixa barreira genética, como K103N e M184V, as quais foram as mais freqüentemente detectadas nessa população. Soma-se a esse fato que a maioria já havia feito uso de outros ARV inibidores das classes dessa enzima, inclusive em esquemas com mono ou biterapia com INTR.

É interessante destacar que por ocasião da falência virológica, quatro participantes exibiam a mutação M184V associada às mutações A62V e Q151M, pertencentes ao complexo 151, conferidoras de resistência múltipla aos INTR⁶⁸, comprometendo assim a utilização dessa e justificando a necessidade do uso de novos anti-retrovirais, como os inibidores de entrada e da integrase em proposta de resgate terapêutico. Observou-se também que três indivíduos apresentaram a mutação A62V, atualmente reconhecida como conferidora de resistência múltipla aos inibidores da transcriptase reversa análogos dos nucleosídeos, quando presente em associação a mais mutações no gene que codifica a enzima⁶⁸. O maior número de mutações no gene da protease encontrado nesses indivíduos, quando comparados à análise genotípica conduzida no momento de *blip* pode ser justificado pelo fato dos primeiros terem sido mais experimentados, principalmente no tocante ao uso de INTR, como também por apresentarem viremia mais elevada e persistente por tempo mais prolongado, possibilitando a sustentabilidade do vírus mutante em adquirir capacidade replicativa, o que não aconteceria nos casos de *blip*.

Ainda por ocasião da falência virológica, nove indivíduos de nossa coorte apresentavam mutações conferidoras de resistência aos INNTR, dos quais um era virgem de tratamento com essa classe de anti-retrovirais. O vírus adquirido já poderia apresentar essa mutação ou a mesma teria desenvolvido espontaneamente, isto é, sem a pressão seletiva dos INNTR.

Não há estudos na literatura que avaliaram a ocorrência de *blip* e falência virológica, conjuntamente, e que também realizaram testes

genotípicos em sua população estudada, o que nos impossibilita confrontar nossos dados. No entanto, pode-se compará-los aos descritos no estudo brasileiro de epidemiologia molecular de HIV de autoria de Tanuri et al⁹, no qual havia participantes seguidos em São Paulo. Nesse estudo, foram encontradas 5 mutações no gene da transcriptase reversa, todas conferidoras de resistência apenas aos INTR, das quais as mais freqüentes foram M184V (48%), T69D/N (47%), T215Y/F (46%), M41L (39%) e L74V (7%) e duas mutações primárias no gene da protease, L90M e V82A. Os participantes também tinham utilizado, predominantemente, a associação AZT-3TC e, os IPs utilizados até então, foram os mesmos usados pelos nossos participantes. Por outro lado, a falência virológica e terapêutica foram consideradas a partir de um corte de carga viral de 30.000 cópias/mL, o que pode justificar um encontro por esses autores de maior freqüência de mutações primárias no gene da protease. Por outro lado, o que diferiu muito do nosso estudo foi a ausência tanto de mutações secundárias aos IP, quanto de mutações aos INNTR, mesmo o estudo tendo finalizado quatro anos após a liberação do uso dos INNTR pelo Ministério da Saúde do Brasil. Por fim, ressalta-se a menor prevalência de vírus selvagens nos indivíduos de São Paulo, quando comparados aos procedentes de outros estados, mostrando que os infectados por HIV avaliados do nosso estado são realmente mais experimentados à terapêutica anti-retroviral e conseqüentemente estão sob maior risco de apresentar resistência às drogas.

Na presente pesquisa, quinze dos indivíduos que apresentaram mutações conferidoras de resistência nos genes da protease e/ou TR no

momento da falência foram também submetidos à avaliação farmacológica, permitindo avaliação combinada dos resultados de ambas as análises, sendo que um deles obteve dosagem plasmática de ambas as medicações (INNTR e IP). Nessa aferição 10/16 (62,5%) dosagens revelaram concentrações adequadas dos fármacos, o que mostra que as mutações persistiram sob níveis ótimos de medicação, comprovando a existência de falência terapêutica ao composto em questão. Três dos quatro indivíduos que se apresentavam com vírus sensíveis aos inibidores de ambas as enzimas, obtiveram aferições plasmáticas dos medicamentos, sendo detectado em um deles concentrações inadequadas do fármaco, o que nos possibilita inferir que a má adesão pode ter sido um fator importante na evolução à falência virológica desse sujeito.

Ao observarmos os resultados de genotipagem obtidos no momento de falência virológica, haveria justificativa para recomendar troca de esquemas terapêuticos em 15 casos dos que apresentavam resistência a alguma das drogas. Porém, essa conduta foi tomada em apenas três indivíduos. Apesar de não terem sido feitas todas as trocas teoricamente necessárias, a maioria dos participantes que mantiveram o uso do esquema terapêutico voltou a apresentar carga viral abaixo do limite de detecção com o mesmo esquema até o final do acompanhamento do estudo. Esse fato pode ser explicado pela ausência de resistência fenotípica, apesar da existência de resistência genotípica comprovada. Caride et al⁸ relataram resultados semelhantes e confirmaram tal hipótese, ao demonstrarem em alguns casos discrepância de resultados entre a análise genotípica e teste fenotípico simultâneos.

O fato de termos identificado apenas três indivíduos que apresentaram mais de um *blip* durante o seguimento não nos permitiu tecer maiores considerações sobre o significado dessa observação. Karlsson et al¹⁴, contudo, alertaram que tais indivíduos têm maior chance de desenvolver falência virológica com conseqüente falha terapêutica, quando comparados àqueles que desenvolvem um único episódio de viremia transitória. Um de nossos casos nessas condições foi submetido à análise genotípica de HIV no segundo momento de viremia, quando apresentava elevada carga viral (89.400 cópias/mL), tendo sido identificado vírus sensível aos ARV. Cabe destacar, entretanto, que o mesmo referiu haver falhado no uso da medicação e apresentava dosagem plasmática indetectável dos inibidores de protease prescritos. A má adesão aos anti-retrovirais parece assim justificar seus episódios transitórios de viremia. Para buscar compreender melhor importância de episódios recorrentes de *blip*, seriam necessários novos estudos.

A epidemia de HIV/aids brasileira é caracterizada pela presença de infecção por vários subtipos de HIV-1 do grupo M, sendo o subtipo B o mais prevalente. O subtipo F é encontrado em 18% dos isolados de cepas de HIV-1 no sudeste brasileiro⁹¹⁻⁹³. Além desse, o subtipo C tem sido identificado com frequência na região sul do Brasil^{94,95}. Guimarães et al⁹⁶ detectaram a presença do subtipo D no sudeste brasileiro. No presente estudo, os subtipos encontrados foram B e F. Nossos dados são concordantes com a literatura no tocante ao predomínio de isolados do tipo B, porém houve prevalência menor do subtipo F, além da inexistência do

subtipo C e D já descritos na literatura nacional. O número de amostras analisadas foi pequeno e, por si só, já justificaria essa discrepância.

Nenhum episódio de viremia plasmática detectável durante o estudo foi sucedido por eventos clínicos e/ou doenças oportunistas, segundo os critérios do CDC de 1993⁹⁷, em consonância com o relatado na literatura^{17,18,20-26,29} reforçando o caráter benigno do evento *blip*.

Ao longo do seguimento da coorte, houve apenas três pacientes que apresentaram falência virológica precedida por *blip* e nenhum deles apresentou mais de um evento *blip*. A literatura permanece controversa no que se refere à relação entre *blip* e falência virológica. Os estudos que consideraram *blip* a determinação de carga viral maior que 400 cópias demonstraram haver correlação entre o evento *blip* e o desenvolvimento de falência virológica^{18,25}. Em contraste, os que se basearam num corte de 50 cópias/mL não evidenciaram qualquer associação preditiva entre ambos desfechos^{17,23,26,28,29}. Esse dado parece apontar para a possibilidade de que apenas os indivíduos que apresentam significativa elevação na carga viral estejam sob risco de evoluir para falência virológica.

Várias são as causas discutidas na literatura para explicar a ocorrência desses eventos. Quando vistas em conjunto, nota-se que a replicação viral persiste nos sujeitos com baixa viremia e que a completa supressão viral é raramente alcançada com as terapias existentes⁹⁸. Se a TARV é parcialmente eficaz na supressão da replicação viral, por que as mutações conferidoras de resistência e falência virológica são incomuns em pacientes com baixa intensidade de viremia? Uma razão pode estar

relacionada com a complexa interação entre resistência medicamentosa e capacidade replicativa do vírus. As mutações que ocorrem inicialmente em segmentos genômicos que se associam à resistência aos IP resultam em vírus incapazes de se replicar com eficiência, talvez em consequência de uma função danificada da enzima protease⁹⁰. Somente com o acúmulo de mutações compensatórias a protease viral recupera sua função eficazmente, fazendo com que o vírus recupere competência replicativa e conseqüentemente as mutações existentes se tornem conferidoras de resistência à droga⁹⁰. Portanto, é possível admitir que viremias de baixa intensidade e/ou que persistam por curto espaço de tempo possam ser insuficientes para gerar essas mutações compensatórias, o que explicaria o comportamento benigno dos *blips* em termos prognósticos.

Outro mecanismo plausível para explicar a ausência de evolução para falência virológica em pacientes com *blips* está relacionado com a imunidade específica contra o HIV. A progressão da doença por HIV está associada com perda da imunidade celular T específica, talvez como resultado do efeito citopático do HIV sobre as células T CD4+⁹⁹. A completa supressão viral com a terapia combinada leva ao resgate da função de células T, mas a ausência de exposição antigênica impede a geração de uma imunidade eficiente anti-HIV¹⁰⁰. Teoricamente, a supressão parcial da replicação viral reduzindo a carga viral para intensidades baixas, porém não zero, resulta em viremia suficiente para gerar imunidade anti-HIV eficaz, mas insuficiente para depletar as células TCD4+ infectadas por HIV. Por outro lado, a persistência de viremias mais

significativas - 400 a 1000 cópias/mL - talvez possa levar ao surgimento de resistência e conseqüente falência terapêutica⁹⁸.

No presente estudo foi utilizada uma ferramenta a mais, sobretudo, para uma melhor avaliação dos indivíduos quanto à adesão aos anti-retrovirais. Com as análises farmacológicas, pudemos destacar a existência de franca resistência medicamentosa, em situações em que o indivíduo apresentava mutações conferidoras de resistência e níveis plasmáticos adequados dos medicamentos. Em contrapartida, em outros pudemos comprovar que a presença de carga viral positiva na ausência de mutações foi devida à má adesão, uma vez que os níveis plasmáticos dos anti-retrovirais prescritos estavam inadequados ou até mesmo indetectáveis.

A análise comparativa dos dois métodos de aferição da adesão, (dosagem plasmática dos anti-retrovirais e auto-relato) revelou baixa concordância entre ambos. Em situações de discordância, nas quais o auto-relato apontava para uso adequado da medicação e a dosagem farmacológica mostrou-se inadequada, deve-se considerar imprecisa a informação obtida do paciente.

A dosagem plasmática dos anti-retrovirais é um método laboratorial que tem sido rotineiramente utilizado na França. Permite não apenas avaliar a adesão dos pacientes, como também pode orientar ajustes posológicos em situação de interação medicamentosa ou de condição que possa interferir na farmacocinética dos ARV (pacientes acometidos de má absorção, co-infectados pelos vírus da hepatite B ou C, portadores de insuficiência hepática ou renal, pacientes que apresentem pesos extremos e

gestantes). Pode também ser útil na investigação de toxicidade medicamentosa dose-dependente, como, por exemplo, frente a alterações neuropsiquiátricas sob uso de efavirenz, ou de citólise hepática em indivíduos que recebem IP. As dosagens são indicadas rotineiramente para os INNTR e IP no momento de início ou alteração do tratamento em situação de recrudescência de viremia, falência virológica precoce, ou quando a redução da carga viral for insuficiente⁷³.

A obtenção da concentração inibitória mínima (C_{min}) é o suficiente para avaliar a adequação dos níveis plasmáticos do medicamento, porém, para diferenciar a má adesão de uma má absorção ou interação medicamentosa, é recomendada a realização tanto da dosagem no vale (C_{min}) quanto no pico (C_{max})⁷³. Se a C_{max} não detectar níveis de drogas ou detectar níveis muito baixos podemos definir como falha na adesão, porém se a C_{max} se encontra com níveis corretos, porém a C_{min} inadequados, a causa pode ser má absorção ou interação medicamentosa e, para a realização deste diagnóstico diferencial, é necessário que o farmacêutico que realizará a interpretação dos resultados tenha todas as informações sobre os medicamentos em uso pelo paciente. Caso o mesmo não esteja em uso de outras medicações que sabidamente interagem com os anti-retrovirais, a conclusão é que o problema dos baixos níveis plasmáticos de anti-retrovirais encontrados seja devido à má absorção intestinal.

Os testes farmacológicos são de execução simples e fornecem resultados em menos de 72 horas. Como pudemos observar diferentemente das dificuldades técnicas encontradas com os testes genotípicos, foi

possível obter resultados em 100% das amostras submetidas à análise farmacológica, o que demonstra o bom desempenho do método.

Entre as limitações da técnica encontra-se a necessidade de obter junto aos fabricantes o princípio ativo do medicamento e a recente descrição de variabilidade intraindividual, detectando-se variação mínima nas concentrações plasmáticas de IP e INNTR, avaliadas no mesmo horário em dias diferentes¹⁰¹. Uma limitação importante da técnica diz respeito à dificuldade de dosar os INTR, tendo em vista que esses fármacos são prodrogas análogas de substratos da enzima, que dependem de metabolização intracelular para gerar derivados trifosforilados - farmacologicamente ativos¹⁰².

Uma vez detectados níveis plasmáticos adequados ou inadequados de INNTR ou IP, espera-se que o mesmo esteja ocorrendo com os níveis plasmáticos de INTR, ou seja, os indivíduos quando considerados aderentes, os seriam ao esquema ARV completo em uso e vice-versa. Portanto, a limitação do método em aferir dosagens de ARV apenas das classes de INNTR e IP não diminui e nem invalida sua eficácia em detectar falta de adesão. Logo, pode-se ainda considerá-lo, apesar de suas limitações, o melhor método que é possível dispor para avaliação de adesão. O mesmo poderia ser implantado na rotina de acompanhamento clínico como uma ferramenta de auxílio para detecção precoce de má adesão e conseqüente surgimento de viremias plasmáticas detectáveis induzindo a falência terapêutica. Assim, evitar-se-ia a necessidade de troca precipitada de ARV, postergando a necessidade de uso de novas classes de drogas

úteis para o resgate terapêutico, além de se evitar a realização desnecessária de testes genotípicos, diminuindo assim, o custo associado ao financiamento do tratamento da infecção por HIV/Aids.

A análise de nossos resultados deve ser efetuada à luz das limitações metodológicas do estudo. A menor frequência de *blip* e de falência virológica observada na amostra estudada, quando comparada a dados da literatura que orientaram o cálculo amostral, se por um lado reflete a eficiência das intervenções propostas a esses pacientes, em relação aos objetivos propostos para o estudo acarretou redução do poder estatístico em determinar fatores associados a esses eventos e, particularmente, o impacto da ocorrência de *blip* sobre a incidência de falência virológica. Além disso, a duração do seguimento após a identificação de *blip* pode ter sido insuficiente para analisar melhor essa última associação.

De fato, observou-se em nossa amostra alta frequência de participantes que se mantiveram com carga viral indetectável ao longo do estudo, devido ao uso adequado de anti-retrovirais. Esse resulta, por um lado, da política de acesso universal a medicamentos altamente eficazes praticada em nosso país, que determinou profunda alteração na dinâmica da epidemia brasileira com aumento da sobrevida e da qualidade de vida dos pacientes. Porém, devem também ter concorrido para esse cenário as intervenções conduzidas no SEAP-HC-FMUSP que visam reforçar a adesão ao tratamento anti-retroviral dos indivíduos acompanhados no serviço.

A avaliação da presença de mutações genotípicas conferidoras de resistência por ocasião dos desfechos de interesse foi limitada pela

indisponibilidade de amostras para análise em todos os momentos de viremia detectável. Além disso, não se obteve amplificação das seqüências de HIV em várias amostras, sobretudo no que diz respeito ao gene da transcriptase reversa. Tais impecilhos não permitiram que se comparasse, por exemplo, se o perfil de mutações observado no momento de *blip* coincide com o detectado na falência virológica.

De modo análogo, os resultados de dosagem plasmática de anti-retrovirais foram tratados apenas de modo descrito, em função de não se dispor de amostras dos participantes da coorte que se mantiveram avirêmicos.

5.1 Considerações finais e perspectivas futuras

Este foi o primeiro estudo longitudinal brasileiro que avaliou possíveis fatores associados ao surgimento de *blip* e falência virológica em indivíduos infectados por HIV sob terapia anti-retroviral e avirêmicos. Acompanhamos 350 participantes por 78 semanas, com perda de seguimento inferior a 7%. O desenho do estudo utilizou critérios para seguimento e aferição dos desfechos, compatíveis com as condições de infra-estrutura e organização do cuidado assistencial disponíveis no serviço, de modo a permitir que seus resultados sejam aplicáveis à prática clínica.

Destaca-se também o emprego dos testes de resistência genotípica e a avaliação de adesão ao tratamento baseada na determinação das concentrações plasmáticas de anti-retrovirais, inédita em estudos brasileiros.

A dosagem plasmática dos anti-retrovirais mostrou-se fácil e útil para identificar indivíduos com níveis plasmáticos subterapêuticos. Se implantado na rotina laboratorial de acompanhamento evolutivo dos pacientes infectados por HIV, poderia auxiliar na evidência de elevação da carga viral evitar a realização de testes genotípicos em pacientes que apresentassem concentração subterapêutica dos medicamentos. Em situações como essas, caberia ao clínico proceder a ajustes de doses ou reforços de adesão para otimizar o benefício do tratamento. Ao lado disso, o teste poderia contribuir na prevenção e no manejo toxicidade dos anti-retrovirais.

O presente estudo chamou também a atenção para o fato das práticas sexuais desprotegidas poderem ser preditoras de viremia detectável com possível indução de falência virológica futura. Estudos com abordagem multidisciplinar seriam, portanto, desejáveis para elucidar melhor o significado dessa constatação

6 Conclusões

Com base nos resultados do presente estudo de coorte, pode-se concluir que:

Observou-se incidência de 9,4 *blips*/100 pessoas-ano e de 4,2 falências virológicas /100 pessoas-ano em indivíduos infectados por HIV sob uso de anti-retrovirais.

No que se refere aos fatores associados aos desfechos *blip* e falência virológica, a não adesão às práticas de sexo mais seguro no mês precedente se mostrou independentemente associada à ocorrência de *blip* (OR 24,64, IC 95% 4,40 – 137,88, $p < 0,001$) e de falência virológica (OR 24,69, IC 95% 4,20 – 145,18, $p < 0,001$).

Adicionalmente, observou-se que a exposição prévia a maior número de esquemas anti-retrovirais foi preditora dos eventos *blip* (OR 1,82, IC 95% 1,41-2,36, $p < 0,001$) e falência virológica (OR 1,67, IC 95% 1,19-2,35, $p = 0,003$).

Em contraste, sexo, idade, exposição a imunizações, infecções concorrentes, doença de base, uso de álcool e drogas ilícitas, bem como o auto-relato de má adesão à terapia anti-retroviral, não se mostraram associados aos desfechos *blip* e falência virológica.

Três indivíduos apresentaram falência virológica precedida por *blip*. Porém, a ocorrência de *blip* não se associou ao desenvolvimento posterior de falência virológica.

Maior número de mutações conferidoras de resistência medicamentosa foi identificado no momento de falência virológica, quando comparado ao momento *blip*, com predomínio de mutações no gene da transcriptase reversa. Na população estudada, foram identificados vírus HIV-1 do grupo M subtipos B e F, com predomínio do subtipo B.

As concentrações plasmáticas de anti-retrovirais analisadas revelaram níveis terapêuticos adequados em 68,8% dos casos. Por ocasião dos desfechos de interesse do estudo, concentrações adequadas do fármaco foram detectadas em 83,3% dos eventos de *blip* e de 62,5% das falências virológicas.

A avaliação farmacológica e genotípica simultânea, conduzida em três indivíduos no momento do evento *blip*, revelou diminuição de sensibilidade a alguma droga do esquema anti-retroviral em uso, com dosagens plasmáticas adequadas dos fármacos em dois casos, enquanto no terceiro não se demonstrou detecção plasmática do INNTR prescrito.

No grupo falência virológica, obtiveram-se 20 amostras concomitantes ao evento para a realização dos testes genotípicos e farmacológicos. Sete (35%) apresentaram concentrações plasmáticas inadequadas de anti-retrovirais, sendo que em quatro não se demonstrou detecção do fármaco. Dos sete participantes que apresentaram mutações conferidoras de resistência aos INNTR em uso, cinco mostravam uma adequada dosagem do anti-retroviral, enquanto nos outros dois a mesma se encontrava inadequada. Dos 5 indivíduos que demonstraram mutações conferidoras de resistência aos IPs em uso, 3 apresentavam dosagem plasmática do IP adequada.

Os resultados das dosagens plasmáticas de INNTR e IP apresentaram apenas 69% de concordância com a adesão auto-referida à medicação.

7 Anexos

III - EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA

1. Justificativa e objetivos da pesquisa:

Você está sendo convidado a participar de um estudo, por ser paciente da Casa da AIDS do Hospital das Clínicas e estar usando medicamentos para tratamento da infecção pelo HIV. Sabemos que esse tratamento tem como finalidade inibir a multiplicação do vírus, o que pode ser verificado pelo teste de carga viral, que você realiza periodicamente e, que no seu caso, resultou indetectável. Entretanto, temos observado que alguns pacientes durante seu acompanhamento podem apresentar cargas virais baixas, mesmo após terem tido um resultado indetectável. Não sabemos o significado dessa variação, a longo prazo, sobre o resultado do tratamento. Desta forma, gostaríamos que você participasse do estudo para que possamos esclarecer essa questão.

2. Procedimentos que serão utilizados e propósitos:

Caso você, voluntariamente, decida participar da pesquisa, você será acompanhado durante 78 semanas, com realização de testes de carga viral a cada 3 meses e, se necessário, a um teste de genotipagem de HIV, isto é, uma verificação da existência de vírus resistente aos medicamentos em seu sangue. Para todos esses testes deverá ser colhida uma amostra de sangue de aproximadamente 10mL, por coleta de veia de seu braço. Ao lado disso, solicitaremos a você que responda a um questionário sobre dados relativos a seu estado de saúde e à forma pela qual você adquiriu o HIV, bem como informações sobre os medicamentos que você utilizou em seu tratamento.

3. Desconforto e riscos esperados:

Para sua participação no estudo você deverá dispor de cerca de 30 minutos para a entrevista e comparecer para a coleta de exames de controle laboratorial que serão marcados coincidentemente aos exames de rotina solicitados pelo médico que cuida de você. As coletas de sangue poderão causar a formação de uma mancha roxa no local da picada da agulha e provocam discreta dor no momento da retirada do sangue.

4. Benefícios que poderão ser obtidos:

Embora não esteja previsto nenhum benefício direto para você pela participação no estudo, a não ser a possibilidade de realizar o exame de genotipagem, se necessário, sua contribuição será valiosa para que possamos entender melhor o significado de uma carga viral baixa após um exame com resultado indetectável. Esses conhecimentos poderão ser úteis no futuro para o acompanhamento clínico e para o tratamento de pacientes com HIV/aids.

5. Esclarecimento sobre a liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem que isso traga prejuízo à continuação de seu cuidado e tratamento:

Sua participação é voluntária e seu consentimento poderá ser retirado, caso você assim decida, a qualquer momento do estudo, assim como no caso de decidir não participar do estudo, você continuará em seguimento na Casa da AIDS, com a supervisão do seu médico infectologista, como ocorre atualmente.

6. Compromisso sobre a segurança de que não se identificará o indivíduo e que se manterá o caráter confidencial da informação relacionada com a sua privacidade:

Os dados coletados nas entrevistas e em revisão de prontuário serão tratados com sigilo e anonimamente, respeitando assim, sua privacidade.

7. Esclarecimento sobre a garantia de receber resposta a qualquer pergunta, a qualquer dúvida acerca dos procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados com a pesquisa:

Caso você tenha alguma dúvida ou queira buscar novas informações sobre o estudo, você poderá procurar a Casa da AIDS diretamente ou pelo telefone 3120-5290, buscando contato com Dr. Karim Yaquib Ibrahim de segunda à sexta-feira das 16:00 às 20:00h. Se persistirem dúvidas poderá ainda consultar a Comissão de Ética e Pesquisa do Departamento de Doenças Infecciosas e Parasitárias do HCFMUSP, sob responsabilidade do Professor Antônio Alci Barone, pelo telefone 3069-6530, de Segunda à Sexta-feira, das 8:00 às 17:00h

IV - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa

São Paulo, de de 200 .

assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal

assinatura do pesquisador
(carimbo ou nome legível)

Nota: este termo deverá ser elaborado em duas vias, ficando uma via em poder do paciente ou seu representante legal e a outra anexada ao prontuário do paciente.

Anexo 2 – Questionário

Escape transitório da viremia plasmática de HIV-1 e falência virológica em indivíduos sob terapêutica anti-retroviral: incidência e fatores associados

I. IDENTIFICAÇÃO DO QUESTIONÁRIO:

1. Código do(a) entrevistado(a)	
2. Entrevistador(a)	
3. Data da entrevista ____/____/____	

II. IDENTIFICAÇÃO DO(A) ENTREVISTADO(A):

4. Iniciais:	
5. Registro HC:	
6. Data de nascimento ____/____/____	
7. Local de nascimento: _____ - _____	
8. Sexo : 1. Masculino () 2. Feminino ()	
9. Cor: 1. Branca () 2. Negra () 3. Parda () 4. Amarela ()	

III. SITUAÇÃO SÓCIO-ECONÔMICA:

1. ESCOLARIDADE

Até que série você estudou?	
1. () Analfabeto	
2. () 1º Grau Incompleto	
3. () 1º Grau Completo	
4. () 2º Grau Incompleto	
5. () 2º Grau Completo	
6. () 3º Grau Incompleto	
7. () 3º Grau Completo	

2. TRABALHO

Você está trabalhando no momento?	
1. () sim, emprego com carteira assinada	
2. () sim, "bicos"	
3. () sim, autônomo(a)	
4. () não, desempregado(a)	
5. () não, aposentado(a)	
6. () nunca trabalhou fora	
66. () outro: _____	
88. () não quer informar	

3. RENDA

<p>Quanto você ganha por mês? (Anotar em reais)</p> <p>_____ Reais</p> <p>77. () não sabe informar 88. () não quer informar 00. () não se aplica (não trabalha)</p>	
<p>No último mês, quanto somou a renda de todos na sua casa, incluindo a sua? (Anotar em reais)</p> <p>_____ Reais</p> <p>77. () não sabe informar 88. () não quer informar 00. () não se aplica (não trabalha)</p>	
<p>Quantas pessoas vivem com essa renda? (Incluir crianças, idosos, adultos que não trabalham, outras pessoas que não moram na casa mas que são sustentadas com esse dinheiro)</p> <p>_____ pessoas</p> <p>77. () não sabe informar 88. () não quer informar 00. () não se aplica (não trabalha)</p>	

4. FAMÍLIA:

<p>Você tem parceiro(a) fixo(a) no momento? Se sim, há quanto tempo? (Auto-definição)</p> <p>1. () sim, sexo masculino: _____ meses</p> <p>2. () sim, sexo feminino: _____ meses</p> <p>3. () não</p> <p>88. () não quer informar</p>	
<p>O (a) parceiro(a) atual tem HIV? (Seja o(a) parceiro(a) atual fixo(a) ou não)</p> <p>1. () sim</p> <p>2. () não</p> <p>3. () não sabe</p> <p>4. () não se aplica (não tem parceiro(a) no momento)</p>	

IV. CATEGORIAS DE EXPOSIÇÃO :

<p>1. () homossexual masculino</p> <p>2. () bissexual masculino</p> <p>3. () heterossexual masculino</p> <p>4. () heterossexual feminino</p> <p>5. () usuário de droga endovenosa</p> <p>6. () hemofílico</p> <p>7. () transfusão de hemoderivados (após 1980).</p> <p>8. () outra: _____</p> <p>77.() não sabe informar</p> <p>88.() não quer informar</p>	
<p>Depois do resultado positivo para o HIV com que frequência você usa camisinha? (Ler as alternativas)</p> <p>1. () nunca</p> <p>2. () às vezes</p> <p>3. () todas as vezes</p> <p>88. () não quer informar</p> <p>00. () não se aplica (não tem relações sexuais)</p>	

*V. ADESÃO e ANTI-RETROVIRAIS:

<p>Uso regular da medicação (na última semana):</p> <p>1. () Sim, tomei todos os comprimidos no horário correto.</p> <p>2. () Sim, tomei todos os comprimidos, porém com algum atraso no horário.</p> <p>3. () Não, falhei 1 a 3 doses, mas as demais tomei no horário correto.</p> <p>4. () Não, falhei 1 a 3 doses e nas que tomei, houve atraso no horário.</p> <p>5. () Não, falhei mais de 3 doses.</p> <p>77. () Não sabe informar</p> <p>88. () Não quer informar</p>	
<p>Observou a orientação quanto à alimentação concomitante (na última semana):</p> <p>1. () Sim</p> <p>2. () Não</p> <p>77. () Não sabe informar</p> <p>88. () Não quer informar</p>	
<p>Quantos esquemas anti-retrovirais já tomou antes do atual:</p> <p>1. () Nenhum. Este é o primeiro.</p> <p>2. () Um. A troca foi por intolerância</p> <p>3. () Um. A troca foi por falência terapêutica</p> <p>4. () Dois. As duas trocas foram por intolerância.</p> <p>5. () Dois. As duas trocas foram por falência terapêutica</p> <p>6. () Dois. Uma troca foi por intolerância e a outra por falência terapêutica.</p> <p>7. () Três. As três trocas foram por intolerância.</p> <p>8. () Três. As três trocas foram por falência terapêutica</p> <p>9. () Três. Uma troca foi por intolerância e duas por falência terapêutica.</p> <p>10. () Três. Duas trocas foram por intolerância e uma por falência terapêutica.</p> <p>11. () Quatro ou mais esquemas.</p> <p>77. () Não sabe informar</p> <p>88. () Não quer informar</p>	

*O formulário foi aplicado a partir desse item nas visitas de 2 a 6

VI. OUTRAS MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS:

<p>Doença de Base?</p> <p>1. () sim</p> <p>2. () não</p> <p>Qual(is)? _____</p> <p>77. () não sabe informar</p>	
<p>Uso de medicamentos concomitantes:</p> <p>1. () sim</p> <p>2. () não</p> <p>Qual(is)? _____</p> <p>77. () não sabe informar</p>	
<p>Uso de drogas ilícitas nos últimos 30 dias:</p> <p>1. () sim</p> <p>2. () não</p> <p>Qual(is)? _____</p> <p>77. () não sabe informar</p>	
<p>Ingesta de álcool:</p> <p>1. () sim</p> <p>2. () não</p> <p>Qual freqüência? _____</p> <p>77. () não sabe informar</p>	
<p>Apresentou diarreia ou Doença do Trato Gastrointestinal nos últimos 30 dias:</p> <p>1. () sim</p> <p>2. () não</p> <p>Qual freqüência? _____</p> <p>77. () não sabe informar</p>	
<p>Infecções próximo da data da coleta de sangue (\pm 30 dias):</p> <p>1. () sim</p> <p>2. () não</p> <p>Qual(is)? _____</p> <p>77. () não sabe informar</p>	
<p>Vacinas antes da data da coleta de sangue (até 30 dias):</p> <p>1. () sim</p> <p>2. () não</p> <p>Qual(is)? _____</p> <p>77. () não sabe informar</p>	

VII. DADOS LABORATORIAIS:

<p>01. Primeira Sorologia positiva: ELISA: ___/___/___ Western blot: ___/___/___</p> <p>01. CD4(cit.de fluxo) : _____(por mm3); _____% DATA: ___/___/___</p> <p>02. CD4(cit.de fluxo) : _____(por mm3); _____% DATA: ___/___/___</p> <p>03. CD4(cit.de fluxo) : _____(por mm3); _____% DATA: ___/___/___</p> <p>04. CD4(cit.de fluxo) : _____(por mm3); _____% DATA: ___/___/___</p> <p>05. CD4(cit.de fluxo) : _____(por mm3); _____% DATA: ___/___/___</p> <p>06. CD4(cit.de fluxo) : _____(por mm3); _____% DATA: ___/___/___</p> <p>07. CD4(cit.de fluxo) : _____(por mm3); _____% DATA: ___/___/___</p> <p>08. CD4(cit.de fluxo) : _____(por mm3); _____% DATA: ___/___/___ CD8(cit.de fluxo) : _____(por mm3); _____%</p> <p>01a. Carga Viral I: _____(cópias/mL); _____ Log 10 DATA: ___/___/___</p> <p>01b. Carga Viral II: _____(cópias/mL); _____ Log 10</p> <p>02. Carga Viral II: _____(cópias/mL); _____ Log 10 DATA: ___/___/___</p> <p>03. Carga Viral II: _____(cópias/mL); _____ Log 10 DATA: ___/___/___</p> <p>04. Carga Viral II: _____(cópias/mL); _____ Log 10 DATA: ___/___/___</p> <p>05. Carga Viral II: _____(cópias/mL); _____ Log 10 DATA: ___/___/___</p>	
--	--

<p>06. Carga Viral II: _____(cópias/mL); _____ Log 10 DATA: __/__/__</p> <p>07. Carga Viral II: _____(cópias/mL); _____ Log 10 DATA: __/__/__</p> <p>08. Carga Viral II: _____(cópias/mL); _____ Log 10 DATA: __/__/__</p> <p>OBSERVAÇÃO:</p> <p>DOSAGEM I: Monitor Roche versão 1.5 DOSAGEM II: ultrasensível</p> <p>50. Genotipagem: __/__/__</p>	
--	--

VIII. CONCLUSÃO:

<p>Apresentou "blip" durante o período de estudo:</p> <p>1. () sim 2. () não</p> <p>Data: __/__/__</p> <p>Apresentou falha durante o período de estudo:</p> <p>1. () sim 2. () não</p> <p>Data: __/__/__</p>	
--	--

Anexo 3 – Certificado de Aprovação do Comitê de Ética



APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em 24.03.05, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **024/05**, intitulado: "Escape transitório da viremia plasmática de HIV em pacientes sob terapêutica anti-retroviral de alta potência: incidência de fatores associados" apresentado pelo Departamento de **MOLÉSTIAS INFECCIOSAS E PARASITÁRIAS**, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador(a) Responsável: **Dr. Aluisio Augusto Cotrim Segurado**

Pesquisador(a) Executante: **Dra. Karim Yaqub Ibrahim**

CAPPesq, 24 de Março de 2005.

PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO
Presidente da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

Anexo 4 – Polimorfismos e dupla população encontrados nos indivíduos que apresentaram *blip*

	8	12	29	39	44	48	111	118	157	161	167	200	223	272	291	296
I3	IT
Q7	R
L10
T12	S	.	.	.	AT	.	.	AT	N	S	.	.	.	AS	.	.
I13	IV	.
K14	R
I15	IV	IV	.
G17	.	.	E
Q18
L19	I	I	.	.	.	I	LP	.
K20	EK
E21	D
T26	.	IT	A
D30	R	.	.	.	E
V32
E34
E35	DE	DE
M36	IM
N37	.	DN	.	T	DN
P39	S	.	.	.	S
R41	KR
K45
M46	IM
I47
I50
I54	IV
K55	E
R57	GR	KR	.
Q58
D60	DE	.	.	DE
Q61	R	.	H	.	R	.	.	.	H	.
I62	IV	.	.	.	IV	IV	.
L63	H	FL	H
I64
C67
H69	.	.	.	Q
K70	.	.	R	.	.	.	R
A71	AV
I72	.	.	.	V	.	.	.	IV	IV
G73
T74	ST
V75	AV	.
V77
V82
I84	IV
I85
L89
Q92	QR	QR	.
I93
C95
L97	F
P100

Polimorfismo

Dupla população

Anexo 5 – Polimorfismos e dupla população encontrados nos indivíduos que apresentaram falência virológica

	20	21	33	148	158	187	234	255	260	273	314	319	320	326	328	329	330	333	336	350	
I3
Q7	R
L10	IL	I	.	IV
T12	.	.	AS	.	AT	S	P
I13	IV
K14	R	.	KR	.	R
I15	.	.	IV
G17
Q18	H
L19	.	I	IL	I	.	.	I	.	.	I	Q	.	.	.	I
K20	T
E21	D
T26
D30
V32	IV
L33	IL
E34	EV	D
E35
M36	IM	IM
N37	E	.	.	.	S
P39	.	S	T
R41	KR	.	.	.	KR
K45	R	R
M46	IM
I47	IV
I50	IL
I54	.	IV	IV	IL
K55
R57
Q58	EQ
D60	.	.	DE	.	DE
Q61	E	E	.	.	.
I62	.	IL	IV	.	IV	IV
L63	.	AP	AP	.	AP	T
I64	.	.	IV	.	IM	M	IV
C67	D	CY
H69
K70	R
A71	.	AV	AV	.	AV
I72	.	.	.	V	.	.	.	L	V	L
G73	GR
T74
V75	.	.	.	A
V77	IV	IV
V82	.	FV	CF	AV
I84
I85	IV
L89	IL
Q92	K	R
I93
C95	.	.	G
L97
P100	.	.	D

Polimorfismo
Dupla população

8 Referências

1. UNAIDS/WHO AIDS Epidemic Update 2009. [cited 2009 dec 1]. Available from: http://data.unaids.org/pub/Report/2009/JC1700_Epi_Update_2009_en.pdf
2. Secretaria de Estado de Saúde de São Paulo. Programa Estadual de DST/AIDS Divisão de Vigilância Epidemiológica. *Boletim Epidemiológico CRT-DST/AIDS-CVE*. 2009;24(n 1).
3. Marins JRP, Jamal LF, Chen SY, Barros MB, Hudes ES, Barbosa AA, Chequer P, Teixeira PR, Hearst N. Dramatic improvement in survival among adults Brazilian AIDS patients. *AIDS*. 2003;17:1675-82.
4. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de DST e Aids. *Recomendações para terapia anti-retroviral em adultos e adolescentes infectados pelo HIV*. Brasília (DF): Ministério da Saúde; 2004.
5. Perry CM. Maraviroc: a review of its use in the management of CCR5-tropic HIV-1 infection. *Drugs*. 2010;70:1189-213.
6. da Silva D, Van Wesenbeeck L, Breilh D, Reigadas S, Anies G, Van Baelen K, Morlat P, Neau D, Dupon M, Wittkop L, Fleury H, Masquelier B. HIV-1 resistance patterns to integrase inhibitors in antiretroviral-experienced patients with virological failure on raltegravir-containing regimens. *J Antimicrob Chemother*. 2010;65:1262-9.
7. Perelson AS, Essunger P, Cao Y, Vesanen M, Hurley A, Saksela K, Markowitz M, Ho DD. Decay characteristics of HIV-1 infected compartments during combination therapy. *Nature*. 1997;387:188-91.

8. Raboud JM, Montaner JSG, Conway B, Rae S, Reiss P, Vella S, Cooper D, Lange J, Harris M, Wainberg MA, Robinson P, Myers M, Hall D. Suppression of plasma viral load below 20 copies/mL is required to achieve long term response to therapy. *AIDS*. 1998;12:1619-24.
9. Garcia F, Vidal C, Plana M, Cruceta A, Gallart MT, Pumarola T, Miro JM, Gatell JM. Residual low-level viral replication could explain discrepancies between viral load and CD4 cell response in human immunodeficiency virus-infected patients receiving antiretroviral therapy. *Clin Infect Dis*. 2000;30:392-4.
10. Dornadula G, Zhang H, VanUitert B, Stern J, Livornese L Jr, Ingerman MJ, Witek J, Kedanis RJ, Natkin J, DeSimone J, Pomerantz RJ. Residual HIV-1 RNA in blood plasma of patients taking suppressive Highly Active Antiretroviral Therapy. *JAMA*. 1999;282:1627-32.
11. Deeks SG, Grant RM, Beatty GW, Horton C, Detmer J, Eastman S. Activity of a ritonavir plus saquinavir-containing regimen in patients with virologic evidence of indinavir or ritonavir failure. *AIDS*. 1998;12:F97-F102.
12. Yonug B, Jhonson S, Bahktiari M, Shugarts D, Young RK, Allen M, Ramey RR 2nd, Kuritzkes DR. Resistance mutations in protease and reverse transcriptase genes of human immunodeficiency virus type 1 isolates from patients with combination antiretroviral therapy failure. *J Infect Dis*. 1998;178:1497-501.
13. Caride E, Brindeiro R, Hertogs K, Larder B, Dehertogh P, Machado E, Sa CAM, Eyer-Silva WA, Sion FS, Passioni LFC, Menezes JA, Calazans AR, Tanuri A. Drug resistance reverse transcriptase genotyping and phenotyping of B and non-B subtypes (F and A) of human immunodeficiency virus type I found in Brazilian patients failing HAART. *Virology*. 2000;275:107-15.

14. Tanuri A, Caridea E, Dantas MC, Morgado MG, Mello DLC, Borges S, Tavares M, Ferreira SB, Santoro-Lopes G, Martins CRF, Esteves ALC, Diaz RS, Andreo SMS, Ferreira LAP, Rodrigues R, Reuter T, Cavalcanti AMS, Oliveira SM, Barbosa HB, Teixeira PR, Chequer PN. Prevalence of mutations related to HIV-1 antiretroviral resistance in Brazilian patients failing HAART. *J Clin Virol.* 2002;25:39-46.
15. Saag MS. HIV Resistance testing in clinical practice: a Qaly-fied success. *Ann Intern Med.* 2001;134:475-77.
16. Raboud JM, Rae S, Woods R, Harris M, Montaner JSG, and the INCAS and AVANTI Study Groups. Consecutive rebounds in plasma viral load are associated with virological failure at 52 weeks among HIV-infected patients. *AIDS.* 2002;16:1627-32.
17. Havlir D, Basset R, Levitan D, Gilbert P, Tebas P, Collier AC, Hirsch MS, Ignacio C, Condra J, Günthard HF, Richman DD, Wong JK. Prevalence and predictive value of intermittent viremia in patients with combination HIV Therapy. *JAMA.* 2001; 286:171-9.
18. Moore AL, Youle M, Lipman M, Cozzi-Lepri A, Lampe F, Madge S, Nesaratnam S, Tyrer M, Cuthbertson Z, Ransom D, Loveday C, Johnson MA Phillips AN. Raised viral load in patients with viral suppression on highly active antiretroviral therapy: transient increase or treatment failure? *AIDS.* 2002;16:615-8.
19. Karlsson AC, Younger SR, Martin JN, Grossman Z, Sinclair E, Hunt PW, Hagos E, Nixon DF, Deeks SG. Immunologic and virologic evolution during periods of intermittent and persistent low-level viremia. *AIDS.* 2004;18:981-9.

20. Sungkanuparph S, Overton T, Seyfried W, Groger RK, Fraser VJ, Powderly WG. Intermittent episodes of detectable HIV viremia in patients receiving nonnucleoside reverse- transcriptase inhibitor – based or protease inhibitor – based highly active antiretroviral therapy regimens are equivalent in incidence and prognosis. *Clin Infect Dis*. 2005;41:1326-32.
21. Macias J, Palomares JC, Mira JA, Torres MJ, Garcia-Garcia JA, Rodriguez JM, Vergera S, Pineda JA. Transient rebounds of HIV plasma viremia are associated with the emergence of drug resistance mutations in patients on highly active antiretroviral therapy. *J Infect*. 2005;51:195-200.
22. Greub G, Cozzi-Lepri A, Ledergerber B, Staszewski S, Perrin L, Miller V, Francioli P, Furrer H, Battegay M, Vernazza P, Bernasconi E, Günthard HF, Hirschel B, Phillips AN, Telenti A, Telenti A. Intermittent and sustained low-level HIV viral rebound in patients receiving potent antiretroviral therapy. *AIDS*. 2002;16:1967-9.
23. Podsadecki TJ, Vrijens BC, Tousset EP, Rode RA, Hanna GJ. Decreased adherence to antiretroviral therapy observed prior to transient human immunodeficiency virus type 1 viremia. *J Infect Dis*. 2007;196:1773-8.
24. Miller LG, Golin CE, Liu H, Hays RD, Hua J, Wenger NS, Kaplan AH. No evidence of an association between transient HIV viremia (“blips”) and lower adherence to the antiretroviral medication regimen. *J Infect Dis*. 2004;189:1487-96.
25. Easterbrook PJ, Ives N, Waters A, Mullen J, O'Shea S, Peters B, Gazzard BG. The natural history and clinical significance of intermittent viraemia in patients with viral suppression to < 400 copies/ml. *AIDS*. 2002;16:1521-7.
26. Martinez V, Marcelin AG, Morini JP, Deleuze J, Krivine A, Gorin I, Yerly S, Perrin L, Peytavin G, Calvez V, Dupin N. HIV-1 intermittent viraemia in patients treated by non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor-based regimen. *AIDS*. 2005;19:1065-9.

27. Masquelier B, Pereira E, Peytavin G, Descamps D, Reynes J, Verdon R, Fleury H, Garraffo R, Chêne G, Raffi F, Brun-Vézinet F. Intermittent viremia during first-line, protease inhibitors containing therapy: significance and relationship with drug resistance. *J Clin Virol.* 2005;33:75-8.
28. Cohen Stuart JWT, Wensing AMJ, Kovacs C, Righart M, Jong D, Kaye S, Schuurman R, Visser CJT, Boucher CAB. Transient Relapses (“blips”) of plasma HIV RNA levels during HAART are associated with drug resistance. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2001;28:105-13.
29. Sklar PA, Ward DJ, Baker RK, Wood KC, Gafoor Z, Alzola CF, Moorman AC, Holmberg SD and the HIV Outpatients Study (HOPS) Investigators. Prevalence and clinical correlates of HIV viremia (“blips”) in patients with previous suppression below the limits of quantification. *AIDS.* 2002;16:2035-41.
30. Hellinger J. HIV blip synching: get the timing right. *Clin Infect Dis.* 2005;41:1333-4.
31. Percus JK, Percus OE, Di Mascio M. The amplitudes of viral blips in HIV-1 infected patients treated with antiretroviral therapy are power-law distributed. *J Theor Biol.* 2009;257:454-9.
32. Jones LE, Perelson AS. Transient viremia, plasma viral load, and reservoir replenishment in HIV-infected patients on antiretroviral therapy. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2007;45:483-93.
33. Deeks SG. Durable HIV treatment benefit despite low-level viremia. *JAMA.* 2001;286:224-6.
34. Tobin NH, Learn Gh, Holte SH, Wang Y, Melvin AJ, McKernan JL, Pawluk DM, Mohan KM, Lewis PF, Mullins JI, Frenkel LM. Evidence that low-level viremias during effective highly active antiretroviral therapy result from two processes: expression of archival virus and replication of virus. *J Virol.* 2005;79:9625-34.

35. Bailey JR, Sedaghat AR, Kieffer T, Brennan T, Lee PK, Wind-Rotolo M, Haggerty CM, Kamireddi AR, Liu Y, Lee J, Persaud D, Gallant JE, Cofrancesco J, Quinn TC, Wilke CO, Ray SC, Siliciano JD, Nettles RE, Siliciano RF. Residual human immunodeficiency virus type 1 viremia in some patients on antiretroviral therapy is dominated by small number of invariant clones rarely found in circulating CD4 T cells. *J Virol.* 2006;80:6441-57.
36. Goletti D, Weissman D, Jackson RW, Graham NMH, Vlahov D, Klein RS, Munsiff SS, Ortona L, Cauda R, Fauci AS. Effect of *Mycobacterium tuberculosis* on HIV replication? Role of immune activation. *J Immunol.* 1996;157:1271-8.
37. Orendi JM, Bloem AC, Borleffs JC, Wijnholds FJ, de Vos NM, Nottet HSLM, Visser MR, Snippe H, Verhoef J, Boucher CAB. Activation and cell cycle antigens in CD4+ and CD8+ T cells correlate with plasma Human Immunodeficiency Virus (HIV-1) RNA level in HIV-1 infection. *J Infect Dis.* 1998;178:1279-87.
38. Kovacs JA, Baseler M, Dewar RJ, Vogen S, Davey RT, Falloon J, Polis MA, Walker RE, Stevens R, Salzman NP, Metcalf JA, Masur H, Lane HC. Increases in CD4 T lymphocytes with intermittent courses of interleukin-2 in patients with immunodeficiency virus infection? A preliminary study. *N Engl J Med.* 1995;332:567-75.
39. Staprans SI, Hamilton BL, Follansbee SE, Elbeik T, Barbosa P, Grant RM, Feinberg MB. Activation of virus replication after vaccination of HIV-1 infected individuals. *J Exp Med.* 1995;182:1727-37.
40. Brichacek B, Swindells S, Jannof EM, Pirruccello S, Stevenson M. Increased plasma human immunodeficiency virus type 1 burden following antigenic challenge with pneumococcal vaccine. *J Infect Dis.* 1996;174:1191-9.

41. Fuller JD, Craven DE, Steger KA, Cox N, Heeren TC, Chernoff D. Influenza vaccination of Human Immunodeficiency Virus (HIV) infected adults: impact on plasma levels of HIV type 1 RNA and determinants of antibody response. *Clin Infect Dis*. 1999;28:541-7.
42. Gunthard HF, Wong JK, Spina CA, Ignacio C, Kwok S, Christopherson C, Hwang J, Haubrich R, Havlir R. Effect of influenza vaccination on viral replication and immune response in persons infected with human immunodeficiency virus receiving potent antiretroviral therapy. *J Infect Dis*. 2000;181:522-31.
43. O'Brien WA, Grovit-Ferbas K, Namazi A, Ovcak-Derzic S, Wang HJ, Park J, Yeramian C, Mao SH, Zack JA. Human immunodeficiency virus-type 1 replication can be increased in peripheral blood of seropositive patients after influenza vaccination. *Blood*. 1995;86:1082-9.
44. Ho DD. HIV-1 viraemia and influenza. *Lancet*. 1992;339:1549.
45. Rosok B, Voltersvik P, Bjerknes R, Axelsson M, Haaheim LR, Asjo B. Dynamics of HIV-1 replication follow influenza vaccination of HIV+ individuals. *Clin Exp Immunol*. 1996;104:203-7.
46. Nettles RE, Kieffer TL, Kwon P, Monie D, Han Y, Parsons T, Cofrancesco J, Gallant JE, Quinn TC, Jackson B, Flexner C, Carson K, Ray S, Persaud D, Siliciano RF. Intermittent HIV-1 viraemia ('blips') and drug resistance in patients receiving HAART. *JAMA*. 2005;293:17-29.
47. Lee PK, Kieffer TL, Siliciano RF, Nettles RE. HIV-1 viral load blips are of limited clinical significance. *J Antimicrob Chemother*. 2006;57:803-5.
48. Nettles RE, Kieffer TL, Simmons RP, Cofrancesco J, Moore RD, Gallant JE, Persaud D, Siliciano RF. Genotypic resistance in HIV-1 infected patients with persistently detectable low-level viremia receiving highly active antiretroviral therapy. *Clin Infect Dis*. 2004;39:1030-7.

49. Paterson DL, Swindells S, Mohr J, Brester M, Vergis EN, Squier C, Wagener MM, Singh N. Adherence to protease inhibitor therapy and outcomes in patients with HIV infection. *Ann Intern Med.* 2000;133:21-30.
50. Mannheimer S, Friedland G, Matts J, Child C, Chesney M. The consistency of adherence to antiretroviral therapy predicts biologic outcomes for human immunodeficiency virus-infected persons in clinical trials. *Clin Infect Dis.* 2002;34:1115-21.
51. Vriesendorp R, Cohen A, Kristanto P, Vrijens B, Rakesh P, Anand B. Adherence to HAART therapy measured by electronic monitoring in newly diagnosed HIV patients in Botswana. *Eur J Clin Pharmacol.* 2007;63:1115-21.
52. Grymonpre RE, Didur CD, Montgomery PR, Sitar DS. Pill count, self-report and pharmacy claims data to measure medication adherence in the elderly. *Ann Pharmacother.* 1998;32:749-54.
53. Tréluyer JM. Intérêt de la mesure des concentrations plasmatiques des antirétroviraux dans la prise en charge des patients infectés par le virus de l'immunodéficience humaine. *Ann Med Interne (Paris).* 2000;151:291-6.
54. Djabarouti S, Breilh D, Pellegrin I, Lavit Michel, Camou F, Caubet O, Fleury H, Saux MC, Pellegrin JL. Intracellular and plasma efavirenz concentrations in HIV-infected patients switching from successful protease inhibitor-based highly active antiretroviral therapy (HAART) to efavirenz-based HAART (SUSTIPHAR Study). *J Antimicrob Chemother.* 2006;58:1090-3.
55. Heeswijk RPG, Hoetelmans RMW, Harms R, Meenhorst PL, Mulder JW, Lange JMA, Beijnen. Simultaneous quantitative determination of the HIV protease inhibitors amprenavir, indinavir, nelfinavir, ritonavir and saquinavir in human plasma by ion-pair high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *J Chromatogr B.* 1998;719:159-68.

56. Aymard G, Legrand M, Trichereau N, Diquet B. Determination of twelve antiretroviral agents in human plasma sample using reverse-phase high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B*. 2000;744:227-40.
57. Rouzes A, Berthoin K, Xuereb F, Djabarouti S, Pellegrin I, Pellegrin JL, Coupet AC, Augagneur S, Budzinski H, Saux MC, Breilh D. Simultaneous determination of the antiretroviral agents: amprenavir, lopinavir, ritonavir, saquinavir, and efavirenz in human peripheral blood mononuclear cells by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B*. 2004;813:209-16.
58. Heeswijk RPG, Hoetelmans RMW, Meenhorst PL, Mulder JW, Beijnen JH. Rapid determination of nevirapine in human plasma by ion-pair reversed-phase high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *J Chromatogr B*. 1998;713:395-9.
59. Dailly E, Raffi F, Jolliet P. Determination of atazanavir and other antiretroviral drugs (indinavir, amprenavir, nelfinavir and its active metabolite M8, saquinavir, ritonavir, lopinavir, nevirapine and efavirenz) plasma levels by high performance liquid chromatography with UV detection. *J Chromatogr B*. 2004;813:353-8.
60. Poirier JM, Robidou P, Jaillon P. Simple and simultaneous determination of the HIV-protease inhibitors amprenavir, atazanavir, idinavir, lopinavir, nelfinavir, ritonavir and saquinavir plus M8 nelfinavir metabolite and the nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors efavirenz and nevirapine in human plasma by reversed-phase liquid chromatography. *Ther Drug Monit*. 2005;27:186-92.
61. Tribut O, Verdier MC, Arvieux C, Allain H, Michelet C, Bentué-Ferrer D. Simultaneous quantitative assay of atazanavir and 6 other HIV protease inhibitors by isocratic reversed-phase liquid chromatography in human plasma. *Ther Drug Monit*. 2005;27:265-9.

62. Gutierrez EB, Gomes V, Picone CM, Suga H, Atomiya AN. Active tuberculosis and Mycobacterium tuberculosis latent infection in patients with HIV/AIDS. *HIV Med.* 2009;10:564-72.
63. Mackie N, Dustan S, McClure MO, Weber JN, Clarke JR. Detection of HIV-1 antiretroviral resistance from patients with persistently low but detectable viraemia. *J Virol Methods.* 2004;119:73-8.
64. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de DST e Aids. *Recomendações para terapia anti-retroviral em adultos e adolescentes infectados pelo HIV.* Brasília (DF): Ministério da Saúde; 2008.
65. HIV Drug Resistance Database. Palo Alto : Stanford University. [cited 2008 nov]. Available at: <http://hivdb.stanford.edu>
66. Merel P, Pellegrin I, Garrigue I, Caumont A, Schrive MH, Birac V, Bonot P, Fleury H. Comparison of capillary electrophoresis sequencing with the new CEQ 2000 DNA analysis system to conventional gel based systems for HIV drug resistance analysis. *J Virol Methods.* 2001;98:9-16.
67. HIV Sequence Database. Los Alamos National Laboratory. [cited 2008 nov]. Available at <http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/mainpage.html>.
68. Johnson VA, Brun-Vézinet F, Clotet B, Günthard HF, Kuritzkes DR, Pillay D, Schapiro JM, Richman DD. Update of the drug resistance mutations in HIV-1: December; 2009. *Top HIV Med.* 2009;17:138-45.
69. Agresti A. *Categorical data analysis.* New York (NY): Wiley; 1990. p.558.
70. Bussab WO, Morettin PA. *Estatística básica.* 4ª ed. São Paulo: Atual; 1987. p.321.

-
71. Conover WJ. *Practical nonparametric statistics*. 2nd ed. New York (NY): Wiley; 1980. p.493.
 72. Neter J, Kutner MH, Nachtsheim CJ, Wasserman W. *Applied linear statistical models*. 4th ed. Illinois: Richard D. Irwing; 1996. p.1408.
 73. Lamotte C, Peytavin G, Farinotti R. Dosages pharmacologiques dans le suivi thérapeutiques des inhibiteurs de protéase et des inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse. In: Girard PM, Katlama C, Pialoux G. VIH. 6^e édition. Paris: Doin Editeurs; 2004. p.375-88.
 74. Wei X, Liang C, Gotte M, Wainberg MA. The M184V mutation in HIV-1 reverse transcriptase reduces the restoration of wild-type replication by attenuated virus. *AIDS*. 2002;16:2391-8.
 75. Mildvan D, Bosch RJ, Kim RS, Spritzler J, Haas DW, Kuritzkes D, Kagan J, Nokta M, DeGruttola V, Moreno M, Landay A. Immunophenotypic markers and antiretroviral therapy (IMART): T cell activation and maturation help predict treatment response. *J Infect Dis*. 2004;189:1811-20.
 76. Kim S, Hughes MD, Hammer SM, Jackson JB, DeGruttola V, Katzenstein DA. Both serum HIV type 1 RNA levels and CD4+ lymphocyte counts predict clinical outcome in HIV type 1-infected subjects with 200 to 500 CD4+ cells per cubic millimeter: AIDS clinical trials group study 175 virology study team. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2000;16:645-53.
 77. Fowke KR, D'Amico R, Chernoff DN, Pottage JC Jr, Benson CA, Sha BE, Kessler HA, Landay AL, Shearer GM. Immunologic and virologic evaluation after influenza vaccination of HIV-1 infected patients. *AIDS*. 1997;11:1013-21.

78. Glesby MJ, Hoover DR, Farzadegan H, Margolick JB, Saah AJ. The effect of influenza vaccination on human immunodeficiency virus type 1 load: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *J Infect Dis.* 1996;174:1332-6.
79. Nelson KE, Clements ML, Miotti P, Cohn S, Polk BF. The influence of human immunodeficiency virus (HIV) infection on antibody responses to influenza vaccines. *Ann Intern Med.* 1998;109:383-8.
80. Yerly S, Wunderli W, Wyler CA, Kaiser L, Hirschel B, Suter S, Perrin LH, Siegrist CA. Influenza immunization of HIV-1-infected patients does not increase HIV-1 viral load. *AIDS.* 1994;8:1503-4.
81. Willberg CB, McConnell JJ, Eriksson EM, Bragg LA, York VA, Liegler TJ, Hecht FM, Grant RM, Nixon DF. Immunity to HIV-1 is influenced by continued natural exposure to exogenous virus. *PLoS Pathog.* 2008;4:1-13.
82. Quinn TC, Wawer MJ, Sewankambo N, Serwadda D, Li C, Wabwire-Mangen F, Meehan MO, Lutalo T, Gray RH. Viral load and heterosexual transmission of human immunodeficiency virus type 1. Rakai Project Study Group. *N Engl J Med.* 2000;342:921-9.
83. Anderson BL, Cu-Uvin S. Determinants of HIV shedding in the lower genital tract of women. *Curr Infect Dis Rep.* 2008;10:505-11.
84. Kalichman SC, Rompa D. HIV treatment adherence and unprotected sex practices in people receiving antiretroviral therapy. *Sex Transm Infect.* 2003;79:59-61.
85. Mira JA, Macias J, Nogales C, Fernández-Rivera J, García-García JA, Ramos A, Pineda JA. Transient rebounds of low-level viraemia among HIV-infected patients under HAART are not associated with virological or immunological failure. *Antivir Ther.* 2002;7:251-6.

86. van Sighem A, Zhang S, Reiss P, Gras L, van der Machina E, Kroon F, Prins J, de Wolf F. On Behalf of the ATHENA National Observational Cohort Study. Immunologic, virologic, and clinical consequences of episodes of transient viremia during suppressive combination antiretroviral therapy. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2008;48:104-8.
87. Coffin JM. HIV-1 population dynamics *in vivo*: implications for genetic variation, pathogenesis, and therapy. *Science*. 1995;267:483-9.
88. Haase AT. Population biology of HIV-1 infection: viral and CD4+ T cell demographics and dynamics in lymphatic tissues. *Annu Rev Immunol*. 1999;17:625-56.
89. Perelson AS, Neumann AU, Markowitz M, Leonard JM, Ho DD. HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time. *Science*. 1996;271:1582-6.
90. Clavel F, Hance AJ. Medical progress : HIV drug resistance. *N Engl J Med*. 2004 ;350 :1023-35.
91. Morgado MG, Sabino EC, Shpaer EG, Bongertz V, Brigido L, Guimarães MD, Catilho EA, Galvão-Castro B, Mullins JI, Hendry RM, Mayer A. V3 region polymorphism in HIV-1 from Brazil: prevalence of subtype B strains divergent from North American/European prototype and detection of subtype F. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1994;10:569-76.
92. Sabino EC, Diaz RS, Brigido LF, Learn GH, Mullins JI, Reingold AL, Duarte AJ, Mayer A, Busch MP. Distribution of HIV-1 subtypes seen in an AIDS clinic in São Paulo City, Brazil. *AIDS*. 1996;10:1579-84.
93. Tanuri A, Swanson P, Devare S, Berro OJ, Savedra A, Costa LJ, Teles JG, Brindeiro R, Schable C, Pieniazek D, Rayfield M. HIV-1 subtypes among blood donors from Rio de Janeiro, Brazil. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol*. 1999;20:60-6.

94. Soares EA, Santos RP, Pellegrini JA, Sprinz E, Tanuri A, Soares MA. Epidemiologic and molecular characterization of human immunodeficiency virus type 1 in southern Brazil. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2003;34:520-6.
95. Locateli D, StocoPH, de Quieroz AT, Alcantara LC, Ferreira LG, Zanetti CR, Rodrigues R, Grisard EC, Pinto AR. Molecular epidemiology of HIV-1 in Santa Catarina State confirms increases of subtype C in Southern Brazil. *J Med Virol*. 2007;79:1455-63.
96. Guimarães ML, dos Santos Moreira A, Loureiro R, Galvão-Castro B, Morgado MG. High frequency of recombinant genomes in HIV type 1 samples from Brazilian southeastern and southern regiona. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2002;18 :1261-9.
97. Centers for Disease Control (CDC). 1993 Revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and adults. *Morbidity Mortal Week Rep*. 1992 ;41:1-19.
98. Hermankova M, Ray SC, Ruff C, Powell-Davis M, Ingersoll R, D'Aquila RT, Quinn TC, Siliciano JD, Siliciano RF, Persaud D. HIV-1 drug resistance profiles in children and adults with viral load of <50 copies/ml receiving combination therapy. *JAMA*. 2001;286:196-207.
99. Rosenberg ES, Billingsley JM, Caliendo AM, et al. Vigorous HIV-1-specific CD4 T cell responses associated with control of viremia. *Science*. 1997 ;278 :1447-50.
100. Ortiz GM, Nixon DF, Trkola A, Binley J, Jin X, BonhoefferS, Klueber PJ, et al. HIV-1 specific immune responses in subjects who temporarily contain virus replication after discontinuation of highly active antiretroviral therapy. *J Clin Invest*. 1999 ;104 :R13-R18.

101. Nettles RE, Kieffer TL, Parsons T, Johnson J, Cofrancesco J, Gallant JE, Carson KA, Siliciano RF, Flexner C. Marked intraindividual variability in antiretroviral concentrations may limit the utility of therapeutic drug monitoring. *Clin Infect Dis*. 2006;42:1189-96.

102. Boffito M, Acosta E, Burger D, Fletcher CV, Flexner C, Garaffo R, Gatti G, Kurowski M, Perno CF, Peytavin G, Regazzi M, Back D. Therapeutic drug monitoring and drug-drug interactions involving antiretroviral drugs. *Antivir Ther*. 2005;10:469-77.

Apêndices

Apêndice 1 – Descrição da técnica de dosagem plasmática de anti-retrovirais (INNTR e IP)

1. Pré-tratamento das amostras e extração do fármaco

Devido ao alto teor de proteínas e outras substâncias existentes no plasma que interferem na análise da presença e quantidade do fármaco existente no plasma, submetem-se as amostras a um procedimento de extração do fármaco, conhecido como fase sólido-líquida, utilizando-se cartuchos de filtração chamados de fase estacionária, constituídos por partículas de uma sílica enxertada de grupamentos químicos variáveis e a retenção das moléculas é feita em fase inversa através de trocas iônicas.

As etapas seguem-se descritas a seguir:

- condicionamento do cartucho (água e metanol)
- colocação da amostra contendo o fármaco a ser analisado
- lavagem para eliminar as impurezas das amostras (como as proteínas do plasma, por exemplo)
- eluição do fármaco como um solvente do tipo metanol
- evaporação sob azoto a 56°C e a recuperação do fármaco seco para concentrar a amostra a ser analisada.

2. Detecção do fármaco

A fase seguinte consiste na colocação das amostras no aparelho de HPLC para separação. Duas bombas são utilizadas para a circulação da fase dita “móvel” (líquido circulante no sistema cromatográfico). Os tubos de

teflon permitem a conexão das bombas ao sistema cromatográfico. A fase móvel é freqüentemente composta de vários solventes (metanol, acetonitrila, água) e sais (tampões, reativos, íons). O injetor é então colocado numa coluna cromatográfica (cilindro preenchido pela fase estacionária), que permite a separação. A coluna é seguida de um detector cromatográfico (UV barra de diodo). Um computador completa esse dispositivo para o comando cromatográfico.

Para a separação, a eluição dos fármacos foi feita em modo isocrático (proporção de débito de fase móvel constante), ou em gradiente de eluição. O gradiente de eluição se faz mais freqüentemente de modo binário (duas fases móveis em duas vias diferentes). Um solvente aquoso (água ou tampão) é misturado com um solvente orgânico (acetonitrila ou metanol) de tal modo que a porcentagem da fase orgânica aumenta com o tempo. Esse processo permite obter uma boa retenção dos compostos polares no início da corrida seguido da eluição dos compostos menos polares. Esse modo de eluição permite separar os compostos de polaridade muito diferente em um mesmo cromatograma. Além disso, para cada fármaco, o final do pico é eluído mais rapidamente do que o início, o que favorece uma boa resolução com picos finos. A função da bomba é levar a fase móvel com uma grande precisão de débito, condição essencial para a boa reprodutibilidade do tempo de retenção. O injetor tem como função injetar pequenos volumes de amostras (10 a 40 μL) para evitar sua dispersão no sistema cromatográfico, permitindo o escalonamento no cromatograma. A coluna deve receber a fase estacionária e geralmente são constituídas de acido inoxidável. A coluna

utilizada foi uma coluna clássica para a fase inversa com um marcador C18 melhorado, constituindo-se de: Protosil C18 AQ + 150 mm de extensão, 4,6 mm de diâmetro e 5 µm de granulometria.

O passo seguinte constitui-se no processo de detecção e quantificação. A detecção pela absorção de ultravioleta é o tipo de detecção mais utilizado para a dosagem de IPs e INNTRs. Trata-se de método muito sensível, cuja resposta é linear à concentração da amostra, segundo a lei de Beer-Lambert:

$$A = \text{D.O.} = \log(I_0/I) = \varepsilon L C$$

A = absorvância

D.O. = Densidade Óptica

I = intensidade luminosa incidente

I_0 = intensidade luminosa transmitida

ε = coeficiente de extinção molar característico da substância estudada a um dado comprimento de onda em $\text{L mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$

L: espessura em cm

C = concentração em mol.L^{-1}

O detector de ultravioleta (UV-VIS) a barras de dióxido de titânio é composto de uma lâmpada de deutério D2, que emite raios UV e uma lâmpada de tungstênio W, emitindo os raios na região visível. No sistema de UV a diferença de comprimentos de onda varia de 190 a 400 nm. O comprimento de onda para a detecção de todos os anti-retrovirais testados é de 210 nm.