

## Resistência do vírus da imunodeficiência humana tipo 1 aos inibidores de protease em amostragem do Laboratório Central de Saúde Pública do Distrito Federal no ano de 2002

Resistance of the human immunodeficiency virus type 1 to protease inhibitors in samples from Laboratório Central de Saúde Pública do Distrito Federal from 2002

### RESUMO

<sup>1</sup> Nazle Mendonça Collaço Veras <sup>1</sup>  
<sup>1</sup> Daniella de Sousa Moraes <sup>2</sup>  
<sup>1</sup> Claudiner Pereira de Oliveira <sup>3</sup>  
<sup>1</sup> Daniela Marreco Cerqueira <sup>1</sup>  
<sup>2</sup> Helena Toledo Kaminski Fink <sup>4</sup>  
<sup>1</sup> Ruitter Roberto Silva <sup>4</sup>  
<sup>1</sup> Cláudia Renata Fernandes Martins <sup>5</sup>

**Introdução:** A pandemia da AIDS é um dos maiores problemas de saúde pública no mundo e a resistência aos anti-retrovirais, um dos principais obstáculos para o tratamento efetivo da infecção pelo vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1). Os estudos sobre a análise da resistência a esses medicamentos são particularmente importantes para o manejo clínico de indivíduos infectados pelo HIV-1. O HIV codifica uma protease que é essencial para a maturação das partículas virais e, por isso, essa proteína é alvo de abordagens terapêuticas utilizando-se os inibidores de protease. Entretanto, muitas mutações no gene da protease do HIV-1 têm sido associadas à resistência aos anti-retrovirais, conduzindo à falhas do tratamento.

**Objetivo:** Descrever as mutações no gene da protease e os perfis de resistência genotípica em indivíduos infectados pelo HIV-1 provenientes do Distrito Federal e Entorno.

**Método:** O gene da protease de 28 isolados de indivíduos infectados por HIV-1 foi amplificado por *nested* PCR e seqüenciado. As seqüências foram analisadas utilizando-se o programa HIVdb para determinação da susceptibilidade às drogas.

**Resultados:** A mutação primária I50V foi a mais prevalente, ocorrendo em 28.57% das amostras. Esta mutação está associada ao medicamento Amprenavir, que apresentou um alto nível de resistência.

**Conclusão:** Esses resultados estão de acordo com uma descrição previamente realizada sobre a resistência aos inibidores de protease no Distrito Federal, e devem ser aprofundados para auxiliar no tratamento de indivíduos infectados pelo HIV-1.

<sup>1</sup> Biologia Molecular,  
Universidade de Brasília  
<sup>2</sup> Laboratório Central de Saúde  
Pública do Distrito Federal – LACEN-DF

Recebido em 29/maio/2006  
Aprovado em 24/abril/2007

**Palavras-chave:** AIDS, HIV-1, inibidores de proteases

#### **ABSTRACT**

**Introduction:** The pandemic of AIDS has become one of the major problems of public health in the world and the resistance to the anti-retroviral medicines is an important obstacle to the effective treatment of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection. Studies concerning the analysis of the resistance to these medicines are particularly important for a better clinical management of HIV-1 infected individuals. The virus encodes a protease that is essential for maturation of infectious virus particles and thus this protein is a target of the therapeutic approaches using protease inhibitors. However, many mutations in the protease gene of HIV-1 have been associated with antiretroviral drug resistance, leading to treatment failure.

**Objectives:** This work describes the prevalence of protease mutations and genotypic resistance profiles in HIV-1 infected individuals from the Federal District and Entorno.

**Methodology:** The viral protease gene of 28 isolates from HIV-1 infected individuals was amplified by nested PCR and sequenced. The sequences were analyzed with the HIVdb program for drug susceptibility determination.

**Results:** The major mutation I50V was the most prevalent, occurring in 28.57% of the samples. This mutation is associated to Amprenavir, which showed the highest level of resistance.

**Conclusion:** These results are in agreement with a previous description of protease inhibitors resistance in the Federal District, and must be deepened to assist in the treatment of HIV-1 infected individuals.

**Key words:** AIDS, HIV-1, protease inhibitors

## **INTRODUÇÃO**

A síndrome da imunodeficiência adquirida (*Acquired Immunodeficiency Syndrome* – AIDS) foi responsável pela mortalidade de mais de 25 milhões de pessoas desde que foi descrita, na década de 80, tornando-se uma das pandemias mais graves registradas na história. De acordo com os dados publicados pelo *Joint United Nations Programme on HIV/AIDS* (UNAIDS) e pela *World Health Organization* (WHO), estima-se que 40.3 milhões de indivíduos estavam infectados pelo HIV em 2005, registrando-se 3.1 milhões de óbitos no mesmo ano. Já foram notificadas aproximadamente 1.8 milhões de pessoas vivendo com o HIV na América Latina, e o Brasil contabilizou mais de um terço dessas infecções<sup>1</sup>.

O vírus da imunodeficiência humana (*Human immunodeficiency virus* – HIV) pertence à família *Retroviridae*, gênero *Lentivirus*<sup>2</sup>. Atualmente, são descritos dois tipos antigênicos: o HIV-1 e o HIV-2. O HIV-1 é o tipo mais virulento e responsável pela pandemia da AIDS. A entrada do HIV-1 na célula é mediada pela ligação da partícula viral ao receptor celular CD4, expresso na superfície de linfócitos T, monócitos, células dendríticas e da microglia, que são as principais células alvo dos vírus da imunodeficiência em primatas<sup>3</sup>.

A terapia anti-retroviral diminuiu significativamente a mortalidade e melhorou a qualidade de vida dos indivíduos infectados pelo HIV-1. Até

o momento, a transcriptase reversa e a protease são os principais alvos do tratamento. Entretanto, a resistência dessas enzimas aos seus respectivos inibidores é um importante fator que limita a eficiência da terapia<sup>4</sup>.

A protease (PR) é uma enzima aspártica composta por 2 cadeias de 99 aminoácidos e apresenta um papel fundamental para a maturação viral, sendo necessária para o processamento das poliproteínas Gag-Pol<sup>5</sup>. Os inibidores de protease (PIs) se ligam à enzima com mais afinidade do que o substrato natural, promovendo a inibição por competição<sup>6</sup>. Os principais inibidores de protease são o Amprenavir (APV), o Atazanavir (ATV), o Indinavir (IDV), o Lopinavir (LPV), o Nelfinavir (NFV), o Ritonavir (RTV) e o Saquinavir (SQV). Na presença de um inibidor de protease, as novas partículas virais geradas são defectivas e incapazes de infectar novas células<sup>7</sup>.

As mutações que conferem resistência aos inibidores de protease podem ser classificadas como primárias ou secundárias. As primárias são as primeiras a serem selecionadas na presença da droga e conferem mudanças fenotípicas que prejudicam a ação do anti-retroviral. Normalmente, ocorrem no sítio de ligação da droga. Já as secundárias, emergem tardiamente, em relação às primárias. Elas, por si só, não apresentam um efeito significativo no fenótipo e podem, quando em conjunto com mutações primárias, melhorar a capacidade de replicação do vírus<sup>8</sup>.

A resistência aos medicamentos atualmente disponíveis tem contribuído para o aumento da pandemia da AIDS, enfatizando a necessidade de desenvolvimento de novas estratégias preventivas que possam ser mais efetivas contra o HIV e a necessidade de uma vigilância quanto à resistência aos medicamentos. O presente trabalho teve como objetivo analisar as mutações associadas à protease, e em especial avaliar a prevalência da mutação I50V. Estudos realizados por Cerqueira<sup>9</sup> no Distrito Federal relataram uma alta prevalência dessa mutação, relacionada à resistência ao Amprenavir (APV), um dos anti-retrovirais usados na terapia de resgate. No banco genômico de protease e transcriptase reversa do HIV-1 de Stanford, esta mutação ocorre em apenas 1% das seqüências do subtipo B depositadas<sup>10</sup>. Portanto, a possibilidade da presença da mutação I50V ocorrer como uma assinatura característica das linhagens do HIV-1 que circulam no DF merece uma investigação detalhada.

## METODOLOGIA

### Amostragem

Foram analisadas 28 amostras de RNA viral coletadas aleatoriamente no Laboratório Central de Saúde Pública do Distrito Federal (LACEN-DF). As amostras são provenientes de indivíduos HIV-1 positivos com carga viral acima de 50.000 cópias/ml, residentes no DF e Entorno, sendo excluídas amostras de quaisquer outras localidades. Trata-se de um estudo anônimo, onde foram utilizadas amostras de série histórica, correspondentes ao ano de 2002. Desse modo, não procede a identificação dos indivíduos por nome, sexo, idade ou qualquer outro dado pessoal, assim como o acesso aos registros dos pacientes. De acordo com o LACEN-DF, em 2002 foram realizados 4018 exames. No entanto, esse número é superior ao total de pacientes, uma vez que o teste de carga viral pode ser repetido para um mesmo indivíduo, especialmente em casos de resistência aos medicamentos. Este projeto de pesquisa foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Distrito Federal.

### Transcrição Reversa

A reação de transcrição reversa foi realizada em um volume final de 20 µl, a partir das amostras de RNA obtidas no LACEN-DF. Inicialmente, uma solução contendo 5 µl de RNA viral, 0,1 µg de *random primer* (*Promega*), 0,5 mM de dNTP e 1 µl de água Milli Q foi mantida a 65°C por 5 minutos. Adicionou-se, em seguida, 2,5x de tampão *First Strand* (*Invitrogen*), 0,02M de DTT (*Invitrogen*), 40 unidades de inibidor de RNase (*Invitrogen*) e 200 unidades da enzima transcriptase reversa Super Script III (*Invitrogen*). Essa reação foi incubada a 25°C por 5 minutos e, em seguida, a 50°C por 60 minutos, sendo inativada por aquecimento a 70°C por 15 minutos. O cDNA sintetizado foi armazenado a -20°C.

### Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A amplificação do cDNA foi realizada por *nested PCR* utilizando-se no primeiro ciclo os *primers* externos DP11/DP12, e no segundo ciclo os *primers* internos DP16/DP17<sup>11</sup>. A reação foi realizada a partir de 4 µl de cDNA, 0,25mM de dNTPs (*Gibco BRL*), 0,8 µM dos *primers* externos (*Integrated DNA Technologies*), 2U da enzima *Taq* polimerase (*Invitrogen*), 1x de tampão da enzima (*Invitrogen*) e 2,5mM de cloreto de magnésio (*Invitrogen*). Cinco microlitros do produto de PCR gerado no 1º ciclo foram submetidos a uma segunda amplificação com os *primers* internos, usando-se os mesmos ciclos de amplificação. Para os controles

negativos foi utilizada água destilada. As amostras amplificadas foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 1%, posteriormente corado com brometo de etídio para visualização dos fragmentos de DNA amplificado.

### Seqüenciamento Automático

Os produtos de PCR foram seqüenciados automaticamente, em ambas as direções, utilizando-se os *primers* internos DP16/DP17. As reações de seqüenciamento nucleotídico foram realizadas no Laboratório de Biologia Molecular da Universidade de Brasília pelo método “*Taq Dye-terminator*”, no Sistema *Megabace* (Amersham, Pharmacia).

### Análise das Seqüências

A qualidade das seqüências obtidas na reação de seqüenciamento automático foi verificada por PHRED<sup>12</sup>. As homologias das seqüências nucleotídicas foram determinadas pelo programa BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*)<sup>13</sup>, onde as mesmas são alinhadas com as seqüências do HIV-1 disponíveis no banco genômico dos Los Alamos (<http://hiv-web.lanl.gov/>). O alinhamento das seqüências em ambas as direções foi realizado pelo programa CLUSTAL W<sup>14</sup> e otimizado por inspeção visual. Após a correção das divergências, prosseguiu-se com a tradução e alinhamento com a seqüência de aminoácidos do consenso do subtipo B do HIV-1, que é utilizada como referência para estudos de resistência aos anti-retrovirais. Os resultados da análise genotípica foram interpretados por meio de consulta a lista de mutações associadas à resistência bem definidas na literatura<sup>8</sup> e utilizando-se um algoritmo computadorizado, o programa HIVdb (<http://hivdb.stanford.edu>), que compara a seqüência teste com a seqüência de consenso do subtipo B do HIV-1. Neste estudo, os níveis de resistência das amostras foram padronizados como suscetível, resistência intermediária e resistente.

## RESULTADOS

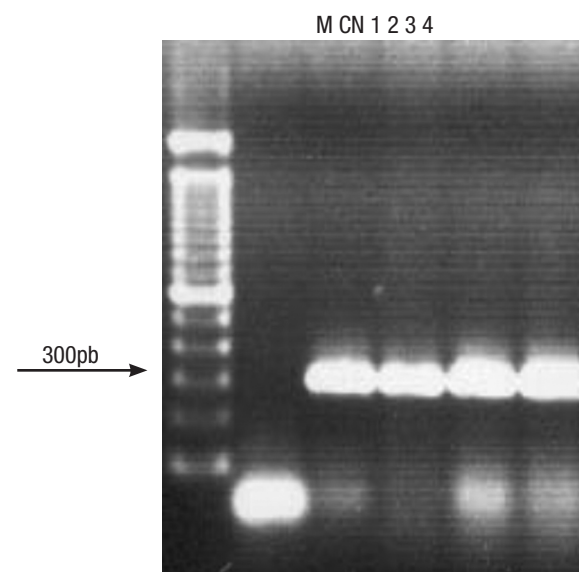
A amplificação por PCR foi realizada para as 28 amostras, obtendo-se fragmentos de aproximadamente 298 pares de base (pb), correspondente ao gene da protease, conforme mostra a figura 1.

A análise das seqüências de aminoácidos da protease revelou a presença de duas mutações primárias nas posições 50 (I50V) e 82 (V82A). A primeira foi encontrada em 8 amostras (28,57%) enquanto a segunda foi registrada apenas em uma amostra (3,57%). Foram, ainda, identificadas oito

mutações secundárias nas posições 10 (L10I) em uma amostra (3,57%); 13 (I13V) em uma amostra (3,57%); 20 (K20R) em uma amostra (3,57%); 36 (M36I) em seis amostras (21,43%); 54 (I54V) em uma amostra (3,57%); 60 (D60E) em uma amostra (3,57%); 63 (L63P) em quatro amostras (14,28%) e 77 (V77I) em 2 amostras (7,14%). A figura 2 apresenta a freqüência de cada mutação.

Figura 1.

Análise eletroforética dos produtos de PCR em gel de agarose 1%. Os poços enumerados representam os fragmentos amplificados para o gene da protease. M = marcador de 100pb e CN = controle negativo.



Além disso, foram identificados 35 polimorfismos não associados à resistência, sendo que os mais prevalentes ocorreram nas posições N37 (67,86%) e L63 (32,14%). Essas posições foram consideradas as mais polimórficas da protease das linhagens circulantes no Distrito Federal. Com exceção do sítio 37, todas essas variações foram descritas na região Sudeste, sendo a L63 considerada a mais polimórfica, ocorrendo em aproximadamente 80% das infecções<sup>15-18</sup>.

Das 28 amostras analisadas quanto à resistência aos inibidores da protease, 19 (67,86%) mostraram-se suscetíveis a todos os PI. O Amprenavir (APV) foi o anti-retroviral para o qual houve o maior número de amostras (28,57%) com linhagens virais resistentes. No entanto, nenhuma amostra apresentou vírus resistente ao Saquinavir (SQV), para o qual apenas uma amostra (3,57%) possuía vírus com resistência intermediária. Para os demais cinco inibidores, 3,57% das amostras foram classificadas como resistentes. Uma parcela de 28,57% da amostragem apresentou linhagens virais possível-

mente resistentes ao Lopinavir (LPV) e 3,57% ao Amprenavir (APV). A figura 3 apresenta as frequências dos níveis de resistência das amostras para cada um dos inibidores de protease.

## DISCUSSÃO

Neste estudo, 67,86% das amostras analisadas apresentaram mutações (primárias e/ou secundárias) associadas à resistência aos PI. Por meio da análise das seqüências de aminoácidos da protease, pôde-se identificar duas mutações primárias: I50V (28,57%) e V82A (3,57%). A I50V altera as interações hidrofóbicas da enzima com a droga, causando resistência ao Amprenavir (APV) e reduzindo, também, a suscetibilidade ao Lopinavir (LPV), Ritonavir (RTV) e Nelfinavir (NFV). A V82A está associada à resistência ao Indinavir (IDV), Ritonavir (RTV) e Lopinavir (LPV). No entanto, quando encontrada em conjunto com outras mutações também reduz a suscetibilidade ao Amprenavir (APV), Nelfinavir (NFV), Saquinavir (SQV) e Atazanavir (ATV)<sup>8,19,20</sup>.

Estudos conduzidos no Rio de Janeiro e São Paulo detectaram apenas alguns casos isolados de linhagens apresentando a mutação I50V, que está presente em apenas 1% das amostras do subtipo B do banco genômico de protease e transcriptase reversa de Stanford<sup>10,15</sup>. No entanto, um estudo realizado por Cerqueira et al. no Distrito Federal detectou a presença da substituição I50V em 38% das amostras<sup>9</sup>.

Os resultados da presente investigação devem ser vistos com cautela uma vez que o estudo apre-

senta uma série de limitações relativas à seleção amostral. O número de amostras do estudo é bastante reduzido em relação ao total analisado no ano de 2002 pelo Lacen. Também não foi possível informar o número total de pacientes e o número de pacientes após os critérios de exclusão, devido à dificuldade de acesso aos dados do Lacen.

Embora apresentando limitações, este estudo corrobora os resultados relatados previamente no Distrito Federal<sup>9</sup>, enfatizando a possibilidade da presença da mutação I50V ocorrer como uma assinatura nas amostras de HIV-1 da região. Portanto, consideramos que o monitoramento da resistência do HIV-1 aos inibidores de protease no Distrito Federal deverá contribuir para o tratamento dos indivíduos infectados. No entanto, será necessário analisar um maior número de amostras em estudos futuros para que os resultados possam ser aplicados com maior segurança.

## CONCLUSÃO

Esse estudo detectou a presença da substituição I50V em 28,57% das amostras, corroborando os dados obtidos por Cerqueira<sup>9</sup>, o que pode sugerir a existência de uma assinatura nas amostras de HIV-1 da região. Estudos complementares devem ser realizados no sentido de ampliar essa avaliação. Desse modo, a presença dessa mutação deve ser considerada na conduta terapêutica dos pacientes HIV-1 positivos do Distrito Federal, principalmente no que concerne à utilização do Amprenavir (APV).

Figura 2.

Frequência de mutações primárias e secundárias associadas à resistência aos inibidores de protease em amostras de HIV-1 isoladas de indivíduos do Distrito Federal.

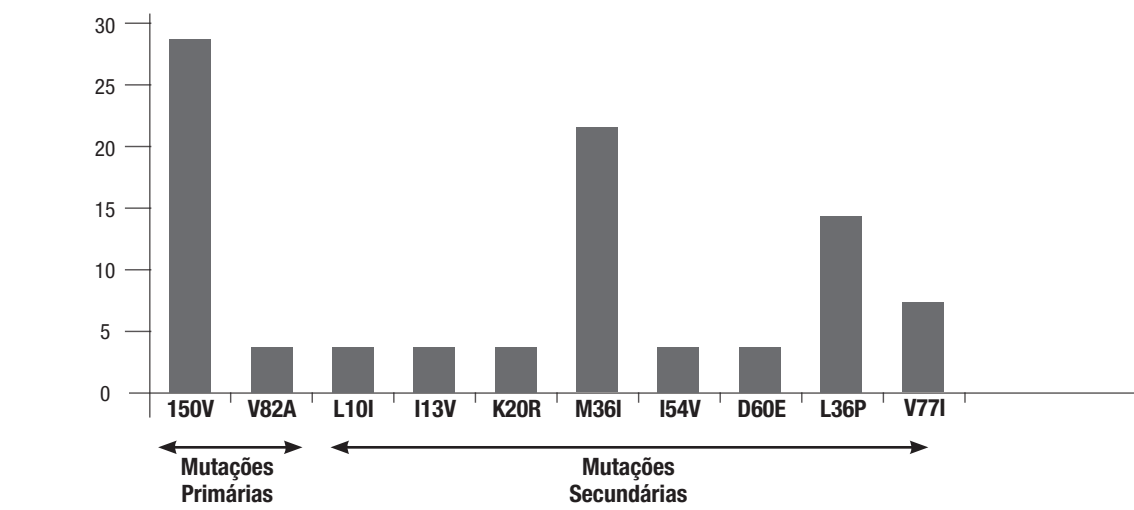
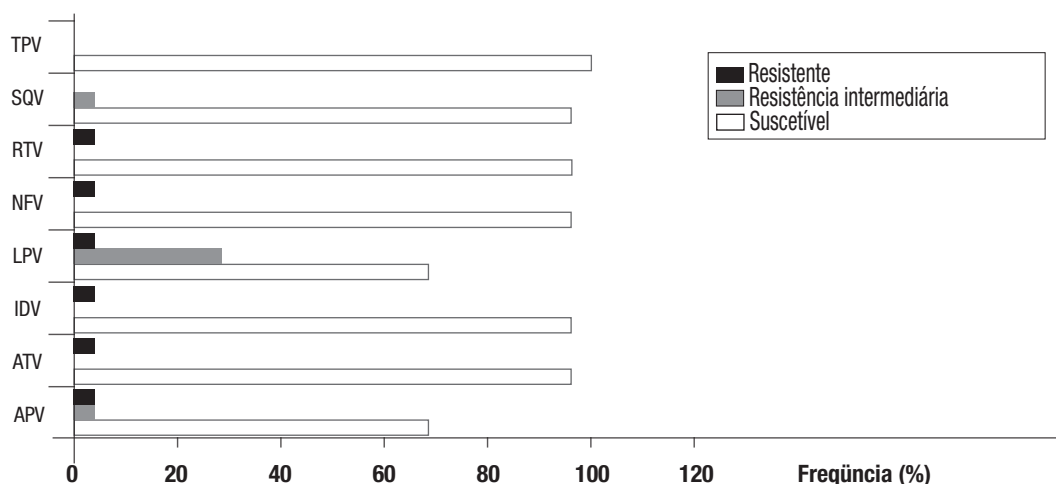


Figura 3.

Níveis de resistência das amostras de HIV-1 do Distrito Federal aos inibidores da protease. Dados obtidos utilizando-se o programa HIVdb. SQV, saquinavir; RTV, ritonavir; NFV, nelfinavir; LPV, lopinavir; IDV, indinavir; ATV, atazanavir; APV, amprenavir; TPV, tipranavir.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- UNAIDS/WHO. AIDS epidemic update: December 2005. 2005; 90.
- Van Regenmortel MHV, Fauquet CM, Bishop DHL, Carstens EB, Estes MK, Lemon SM, et al. Virus taxonomy – seventh report of the international committee of taxonomy of viruses. San Diego: Academic Press, 2000.
- Turner BG, Summers MF. Structural biology of HIV. *J Mol Biol* 1999; 285: 1-32.
- Hoffmann NG, Seillier-Moiseiwitsch F, Ahn JH, Walker JM, Swanstrom R. Variability in the human immunodeficiency virus type 1 gp120 Env protein linked to phenotype-associated changes in the V3 loop. *J Virol* 2002; 76(8): 3852-3864.
- Boden D, Markowitz M. Resistance to Human Immunodeficiency Virus Type 1 Protease Inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42(11): 2775–2783.
- Nielsen MH, Pedersen FS, J. K. Molecular strategies to inhibit HIV-1 replication. *Retrovirology* 2005; 2(1): 10.
- AIDSinfo. Guidelines for the use of antiretroviral agents in HIV-1-infected adults and adolescents. Panel on Clinical Practices for Treatment of HIV Infection e Department of Health and Human Services (DHHS). Disponível em: <http://AIDSinfo.nih.gov>, 2005.
- Johnson VA, Brun-Vézinet F, Clotet B, Conway B, Kuritzkes DR, Pillay D, et al. Update of the drug resistance mutations in HIV-1: fall 2005. *Top HIV Med* 2005; 13(4): 125-131.
- Cerqueira DM, Amorim RMS, Silva RR, Camara GNL, Brígido MM, Martins CRF. Antiretroviral resistance and genetic diversity of human immunodeficiency virus type 1 isolates from the Federal District, Central Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2004; 99(8): 877-882.
- HIV drug resistance database. Stanford University. Disponível em: <http://hivdb.stanford.edu/>, 2006.
- Brasil. Projeto piloto de monitoramento da resistência do HIV-1 aos anti-retrovirais. Apostila e protocolos do curso de genotipagem rápida do HIV-1. Ministério da Saúde. Coordenação Nacional de DST e AIDS, 1999.
- Ewing B, Hillier L, Wendl MC, Green P. Base-calling of automated sequencer traces using Phred. I. Accuracy Assessment. *Genome Res* 1998; 8: 175-185.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 1990; 215(3): 403-410.

14. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 1994; 22(22): 4673-4680.
  15. Couto-Fernandez JC, Silva-de-Jesus C, Veloso VG, Rachid M, Gracie RSG, Chequer-Fernandez SL, et al. Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) genotyping in Rio de Janeiro, Brazil: assessing subtype and drug-resistance associated mutations in HIV-1 infected individuals failing highly active antiretroviral therapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005; 100(1): 73-78.
  16. Machado ES, Lambert JS, Afonso AO, Cunha SM, Oliveira RH, Tanuri A, et al. Overview of genotypic and clinical profiles of human immunodeficiency virus type 1-infected children in Rio de Janeiro, Brazil. *An Acad Bras Cienc* 2004; 76(4): 727-741.
  17. Rodrigues R, Vazquez CMP, Colares JK, Custodio RM, Filho FB, Souza LdR, et al. Antiretroviral resistance mutations in human immunodeficiency virus type 1 infected patients enrolled in genotype testing at the Central Public Health Laboratory, São Paulo, Brazil: preliminary results. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005; 100(1): 97-102.
  18. Tanuri A, Caridea E, Dantas MC, Morgado MG. Prevalence of mutations related to HIV-1 antiretroviral resistance in Brazilian patients failing HAART. *J Clin Virol* 2002; 25: 39-46.
  19. Hirsch MS, Brun-Vezinet F, Clotet B, Conway B, Kuritzkes DR, D'Aquila RT, et al. Antiretroviral Drug Resistance Testing in Adults Infected with Human Immunodeficiency Virus Type 1: 2003 Recommendations of an International AIDS Society-USA Panel. *Clin Infect Dis* 2003; 37: 113-128.
  20. Larder B, Richman D, Vella S. HIV resistance and implications for therapy, Segunda edição ed. Atlanta: Medicom, 2001.
-