



## ESPECIAL GENOTIPAGEM

### Benefícios, limitações e critérios

A TARV aumentou o tempo e a qualidade de vida das pessoas com HIV/aids. O seu sucesso a longo prazo, porém, está comprometido pelo desenvolvimento da resistência aos anti-retrovirais, que leva à falha terapêutica. Além da adesão adequada ao tratamento, o teste de genotipagem é outra arma que pode prolongar a vida da TARV, e conseqüentemente a dos pacientes. Vários estudos já demonstraram que o teste tem benefícios na clínica, mas também tem limitações. Daí este número de **tratamento HOJE** sobre genotipagem, que esclarece pontos essenciais para o seu uso na clínica, como os critérios de indicação. O artigo foi elaborado pelos infectologistas Ricardo Diaz, do Laboratório de Retrovirologia e Microbiologia Molecular da Universidade Federal de São Paulo, e Rosana Del Bianco, do CRT-Aids e do Programa de Aids do Município de São Paulo.

PÁGS. 1 a 4

### Resistência do HIV aos anti-retrovirais: utilidade do teste na clínica atual

No mundo inteiro, todo médico que lida com HIV/aids vive hoje a mesma angústia: cresce a resistência do HIV às drogas da terapia anti-retroviral potente (TARV). No Brasil, pesquisa realizada com 500 pacientes da Rede Nacional de Genotipagem (Renageno) demonstrou que somente 7% não apresentavam resistência a nenhum dos anti-retrovirais. Em outro estudo realizado na Escola Paulista de Medicina com 791 pacientes, a não-resistência foi menor ainda: apenas 1%. O mesmo levantamento revelou que 94,7% eram resistentes aos inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeos (ITRN), 58%, aos inibidores da protease (IP), e 48%, aos inibidores da transcriptase reversa não-análogos de nucleosídeos (ITRNN).

Daí o nosso drama e o dos pacientes: a resistência do HIV aos anti-retrovirais está fortemente associada à falha do tratamento, o que exige resgate terapêutico. Nessa hora, o teste de genotipagem pode ser instrumento útil na seleção das drogas do novo esquema. Os estudos prospectivos Viradapt (europeu), Gart (americano), Narval (francês), Havana (espanhol) e Avanti (italiano) selecionaram pacientes com falha terapêutica e os randomizaram em dois grupos. Num deles a mudança do tratamento se baseou apenas na experiência clínica; no outro, também no teste de genotipagem. Resultados: 1. No grupo da genotipagem, o resgate foi significativamente melhor. Além da queda viral ter sido mais significativa, maior número de pacientes obteve carga viral indetectável, que é o efeito desejado da TARV; 2. O teste não era perfeito. Apenas cerca de 30% conseguiram o sucesso absoluto, que é a carga viral indetectável.

Em outras palavras: a genotipagem tem limitações em algumas situações. Mesmo assim, é o melhor instrumento diagnóstico que temos no momento para enfrentar a resistência do HIV aos anti-retrovirais. Logo, é preciso aprender a lidar com o teste, pois ele pode ajudar a prolongar a vida da TARV, e conseqüentemente a dos pacientes com HIV/aids.

### Conseqüência ou causa da falha terapêutica

Desde 1996, a TARV é uma realidade. Graças a ela, potencialmente não se morre mais de aids. Porém, ao menos por ora, os pacientes estão provavelmente fadados a usar os anti-retrovirais pelo resto da vida.

O efeito desse uso prolongado todos conhecem: em algum momento, por algum motivo, o remédio pode parar de funcionar. E, aí, pode haver a chamada resistência. Ela pode ser conseqüência da falha terapêutica: o anti-retroviral deixa de atuar devido à falta de boa adesão ao tratamento. Mas também pode parar de funcionar porque o vírus começa a ficar resistente, depois de muito contato com a droga. A resistência então é causa da falha terapêutica.

CONTINUA NA PÁG. 2

Por um ou por outro motivo, a resistência do HIV ao esquema anti-retroviral quase sempre leva o tratamento a fracassar. Existem três tipos de falha: a clínica, que é quando o paciente passa a apresentar sintomas; a imunológica, que se caracteriza pela queda dos linfócitos CD4; e a virológica, que se revela pelo aparecimento do vírus no sangue. Carga viral indetectável é a prova de que o HIV está sendo destruído eficazmente pelo esquema adotado. Assim, sempre que o HIV começa a ser detectado de novo num paciente usando TARV, estamos diante de uma falha virológica. É grande a possibilidade de ela estar relacionada com a resistência aos medicamentos. É exclusivamente da falha virológica que falaremos daqui em diante.

## Como o mecanismo de seleção torna o HIV resistente

A resistência é um fenômeno descrito em praticamente todas as áreas médicas onde se expõe algum microorganismo à pressão seletiva dos antimicrobianos. Com o HIV e os anti-retrovirais, acontece o mesmo. Existem dois tipos de resistência, a primária e a secundária.

A resistência primária é aquela presente antes do uso do remédio; normalmente, a pessoa foi infectada por um vírus resistente (veja o quadro *Resistência primária tende a crescer*). Já a resistência secundária aparece pela seleção que o próprio anti-retroviral proporciona no HIV.

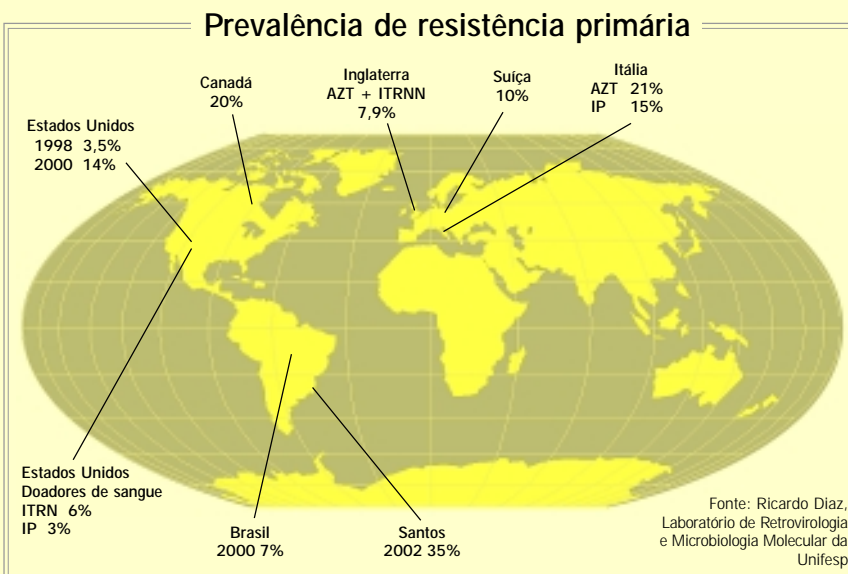
Explica-se. O HIV é um patógeno de sucesso, não só porque muda muito, mas também porque consegue se evadir do sistema imune e criar resistência às drogas. Uma pessoa infectada que não esteja fazendo uso da TARV gera 10 bilhões de vírus por dia. Isso significa que todas as mutações possíveis ocorrem todos os dias. Mais: diariamente aparecem vírus com mutação de resistência a todos os anti-retrovirais disponíveis.

Normalmente, o vírus com mutação de resistência não causa problema, porque não

## RESISTÊNCIA PRIMÁRIA TENDE A CRESCER

Em 1998, a resistência primária nos Estados Unidos era 3,5%; em 2000, 14%. No Brasil, subiu de 3,5% em 1997 para 7% em 2000.

Infelizmente, esta é a tendência: a resistência primária aumenta cada vez mais, já que mais pessoas estão usando anti-retrovirais. Junto, cresce a probabilidade de quem se infecta agora adquirir um HIV já com mutação de resistência. E, aí, a pergunta que especialistas se fazem no mundo inteiro: vale a pena fazer genotipagem em quem está iniciando a TARV?



O teste de genotipagem é fundamental para detectar a prevalência de resistência primária na população. Nesse caso, racionalmente, é feito em pessoas com infecção recente. Primeiro, para retratar o que está acontecendo no momento. Segundo, porque existe a possibilidade teórica de essa pessoa se infectar com um vírus resistente aos anti-retrovirais, e ele ficar invisível ao longo do tempo.

Hoje sabemos que o vírus mutante leva desvantagem em relação ao tipo selvagem: tem menos *fitness*, é um pouco "aleijado". Quando a pessoa é infectada pelo vírus resistente, ele é arquivado no sistema imune. Mas se aparece na circulação o selvagem, esse tem maior probabilidade de predominar. Conseqüentemente, talvez depois de alguns anos de infecção só seja possível detectar o vírus sensível. Porém, na hora em que essa pessoa começa a usar o anti-retroviral, o resistente, que está escondido, aparece com muita rapidez.

Isso é teórico. De qualquer forma, saber a prevalência da resistência primária é importante para ditar a política de saúde. Por exemplo, em Los Angeles (EUA), 17% dos recém-infectados já têm resistência aos inibidores da transcriptase reversa não-análogos de nucleosídeos (ITRNN). Portanto, se alguém for começar o tratamento naquela região sem a genotipagem, o melhor é não usar esquemas contendo os ITRNN.

No Brasil, com uma taxa de 7% de resistência primária, a genotipagem não faz sentido como política de saúde pública para o país. No entanto, é uma questão que deve ser examinada regionalmente. Pesquisa realizada em 2002 em Santos (SP) mostrou que 35% das pessoas com infecção recente já tinham vírus mutante. Nessa cidade, a genotipagem para começar a TARV talvez já se justifique.

se fixa, ou seja, não consegue infectar a próxima célula. Afinal, está competindo com 9,999 bilhões de outros vírus por um repertório limitado de células CD4. A probabilidade de ele achar um linfócito é a mesma que de achar uma agulha no palheiro. Porém, quando essa pessoa passa a usar anti-retroviral, todos os vírus sensíveis são eliminados; sobram os resistentes. É como se tirássemos a palha do palheiro; aumentaria, assim, a possibilidade de encontrar a agulha. Na hora em que isso acontece, o vírus com mutação de resistência infecta a célula CD4. Cada CD4 infectado produz, então, de 5 mil a 10 mil vírus idênticos àquele mutante.

Esse é o mecanismo de seleção. A pressão seletiva do anti-retroviral seleciona o vírus que preexiste e que já tem a mutação de resistência. Tal mutação pode ter três tipos de impacto no tratamento:

1. Diminuir a suscetibilidade a determinado anti-retroviral, fazendo com que o tratamento funcione menos.
2. Produzir resistência cruzada, impedindo ou reduzindo a ação de um anti-retroviral nunca utilizado. Isso acontece devido a semelhanças no mecanismo de ação, mas também por coincidência.
3. Aumentar a ação de outros anti-retrovirais.

A detecção do que está acontecendo pode ser feita tanto pelo teste de fenotipagem quanto pelo de genotipagem. Hoje em dia, o primeiro é exequível normalmente para pesquisa, o segundo pode ser adotado na prática clínica.

### Fenotipagem, comportamento; genotipagem, estrutura do HIV

Normalmente, verifica-se a resistência de bactéria ou fungo através de cultura. Material do paciente é coletado e posto para se multiplicar em meio de cultura. O microorganismo que cresce é testado então com certos antibióticos ou antifúngicos. Se na presença de determinada droga o

## COMO É O TESTE DE GENOTIPAGEM

Simplificadamente, o teste de genotipagem obedece às seguintes etapas:

- O sangue do paciente é coletado.
- Isola-se o vírion, que é o vírus livre no plasma sob a forma RNA.
- Usam-se então um método laboratorial para purificar o RNA desse vírion e outro para transformar esse RNA em DNA.
- Em seguida, amplificam-se pela técnica de PCR (reação de cadeia pela polimerase) as regiões do genoma do vírus que têm contato com os anti-retrovirais, ou seja, a transcriptase reversa e a protease. Com a ajuda de enzimas, utiliza-se aqui a mesma estratégia que o HIV usa para se replicar.
- A amplificação mostra quais as seqüências de nucleotídeos dessas regiões.
- Aí, comparam-se as seqüências identificadas com aquelas que são normais nessas posições no vírus selvagem. Descobre-se assim o que mudou e se tem relação com resistência.

patógeno continua se multiplicando, significa que está resistente a ela; se é inibido, a droga é sensível e pode ser usada para tratar a pessoa.

Com o HIV, pode-se fazer o mesmo. É o teste de fenotipagem: detecta o comportamento do HIV. Cultiva-se o vírus na presença de cada um dos anti-retrovirais, para saber se está resistente a algum deles e quantas vezes.

Só que, antes de haver a alteração do comportamento do HIV diante do remédio, o genoma do vírus altera-se. A mudança na estrutura genética do HIV pode prever qual será o seu comportamento. É exatamente o que verifica o teste de genotipagem: analisa as regiões do genoma do HIV que têm contato com os anti-retrovirais, ou seja, a transcriptase reversa e a protease. Em ambas, pesquisam-se os códons de mutação (veja o quadro *Como é o teste de genotipagem*). Códon é um grupo de três nucleotídeos. Cada três nucleotídeos codificam um aminoácido.

Por exemplo, a conhecida mutação M184V. Ela quer dizer que na posição 184 da transcriptase reversa, uma metionina, a proteína natural dessa posição, foi substituída por uma valina, que se encontra no vírus mutante. Quando isso acontece, o vírus ficou resistente à lamivudina ou 3TC.

### Valor preditivo positivo é alto; negativo, baixo

A genotipagem revela a quais anti-retrovirais o HIV está resistente, permitindo redirecionar o tratamento. Mas é preciso ficar bem claro que:

- A genotipagem não informa quais anti-retrovirais devem ser usados, mas quais não devem ser usados.
- Resistência não detectada não significa obrigatoriamente que ela não exista. Pode ser que a resistência esteja presente e o teste não a tenha “enxergado”. A genotipagem tropeça na falta de conhecimento completo dos códons. A todo instante, pesquisas mostram a importância de novos códons ainda não analisados. Portanto, o valor preditivo do teste negativo é baixo: resistência não detectada não quer dizer que necessariamente o remédio vai funcionar; pode ser que não funcione.
- Já o valor preditivo positivo é alto. Resistência presente é sinal quase certo de que o anti-retroviral não vai funcionar.
- Apenas parte dos pacientes se beneficia, e uma das razões é a disponibilidade de poucas drogas. Como dissemos no início, o sucesso total é possível somente em cerca de 30% dos casos. Ou seja, com base na genotipagem muda-se o esquema terapêutico e o paciente volta a ter carga

## GRAVIDEZ E OUTRAS URGÊNCIAS

A indicação do teste de genotipagem na falha terapêutica é unanimidade. Mas existem outras situações em que potencialmente ele pode ser útil:

- **Profilaxia da transmissão materno-fetal** – A maior parte dos consensos já recomenda o teste nas gestantes infectadas pelo HIV. Primeiro, porque é uma situação de urgência em que não se tem tempo para ajustar depois. Segundo, se não se diminuir logo a carga viral dessa mulher, o risco de transmissão para o feto é maior. Então, para reduzir ao mínimo a possibilidade de erro no esquema adotado, pode-se lançar mão da genotipagem.
- **Profilaxia após acidente ocupacional** – Alguns consensos já sugerem a genotipagem nessa urgência. O teste deve ser feito no paciente fonte. Só que, é claro, não se espera o resultado para iniciar o tratamento. O profissional de saúde começa a receber imediatamente o anti-retroviral e, dependendo do exame, muda-se o esquema.
- **Antes de iniciar a TARV** – Alguns consensos sugerem o teste em pacientes virgens de tratamento, para detectar a resistência primária. Isso talvez valha a pena em locais onde é alta a sua prevalência. Mas com esta ressalva: se transcorrer muito tempo entre a infecção e o teste, há a possibilidade teórica de o vírus resistente, que foi transmitido, não ser detectado (veja o quadro *Resistência primária tende a crescer*).

viral indetectável. Existe o sucesso parcial, que é reduzir a carga viral, embora ela não fique indetectável. Mas há casos em que o teste vai mostrar que não há mais nenhum anti-retroviral para ser usado, pois o HIV está resistente a todos. Isso, pelo menos, nos possibilita lidar de maneira mais realista com esse paciente.

### Na falha virológica, indicação da genotipagem é consenso

A genotipagem pode ser útil em várias situações clínicas, mas uma é unanimidade: falha terapêutica virológica (veja o quadro *Gravidez e outras urgências*).

Quando se opta pela introdução da TARV, recomenda-se nova carga viral após três a quatro semanas. O objetivo é documentar se o tratamento está funcionando ou não. Ela tem que cair ao menos 1 log. O efeito máximo ocorrerá em seis meses, quando se espera que fique indetectável. Depois, a cada três ou quatro meses o paciente precisa repetir o exame. Se nesse acompanhamento a carga viral ficar positiva, é aconselhável mudança no tratamento, pois há falha virológica.

Nessa hora, o médico tem dois caminhos: tentar prever qual é o próximo esquema com base no seu conhecimento ou lançar mão do teste de genotipagem. Por isso a Coordenação Nacional de DST/Aids implantou a Renageno, para executar e interpretar exames de pacientes atendidos no Sistema Único de Saúde. Para fazer o teste, o paciente deve apresentar falha terapêutica virológica e estar em uma das situações:

- Primeira falha com terapia dupla.
- Primeira falha com terapia tripla contendo ITRNN.
- Primeira ou segunda falha com IP.

### Cuidados essenciais para fazer e interpretar o teste

Dois cuidados, porém, são fundamentais para solicitação da genotipagem:

- A última carga viral precisa ter sido feita há, no máximo, dois meses. Às vezes, o exame é antigo e o resultado não reflete o momento.
- O exame tem que ser sempre na vigência do tratamento, pois quando o remédio é suspenso, o vírus resistente começa a ficar invisível. É que o vírus com mutação tem

menos *fitness* que o tipo selvagem, também arquivado. Ou seja, como ele é “aleijado”, existe a probabilidade de o vírus selvagem sobrepujá-lo em poucas semanas. O teste perde então sensibilidade. O vírus resistente está presente, mas o exame não o “vê”. Por isso, o ideal é o paciente tomar o remédio até o dia da coleta. Depois, você muda, suspende, faz o que achar mais adequado para o caso.

Muito cuidado também ao interpretar cada resultado. A genotipagem é um exame superespecializado, e não é fácil analisar a “sopa” de letrinhas e números. O estudo Havana mostrou bem essa dificuldade. Randomizou pacientes com falha terapêutica em dois grupos: um recebeu tratamento apenas com base na experiência clínica do médico; o outro, levando também em conta o teste de genotipagem. O grupo da genotipagem, por sua vez, foi dividido em dois subgrupos: num, o clínico teve orientação de um virologista para interpretar o resultado; no outro, apenas o laudo em mãos.

Adivinha o que aconteceu? O tratamento do grupo submetido ao teste de genotipagem, é claro, foi melhor. Mas o subgrupo sem aconselhamento virológico obteve o mesmo resultado que o sem genotipagem. Isso demonstra que: **1.** Além de fazer o teste, é preciso certa expertise para ele funcionar; **2.** Se o laudo não for suficientemente esclarecedor, o clínico deve buscar ajuda de um virologista para interpretar melhor o resultado; **3.** O médico precisa atualizar-se sempre para acompanhar esses avanços.

A genotipagem é uma realidade, e a tendência é ser usada cada vez mais na clínica. Por isso, nosso conselho: use o teste com bastante critério. É a melhor forma de preservar esse instrumento que pode ser muito útil para o resgate terapêutico.