

Capítulo 1

Introdução

1.1 – Dados epidemiológicos da infecção HIV

O HIV/SIDA (vírus da imunodeficiência humana/síndrome da imunodeficiência humana adquirida) constitui uma das principais causas de morte nos adultos a nível mundial e a principal causa de morte em África, onde na região mais afectada, a sub-Sahariana, 67% da população se encontra infectada, segundo dados revelados no relatório de 2008 da Organização Mundial de Saúde (OMS).

Segundo esse mesmo Relatório da OMS (UNAIDS- *Joint United Nations Programme on HIV/AIDS*), relativamente à prevalência da infecção, estima-se que 33,4 milhões de pessoas vivam com a doença:

- 31,3 milhões de adultos com idade superior a 14 anos;
- 2,1 milhões de crianças com idade inferior a 15 anos (aproximadamente 91% destas crianças vivem na África sub-Sahariana).

Verificou-se, contudo, em 2008, uma diminuição da incidência para 2,7 milhões, comparativamente a 2001 em que se registou 3 milhões de novos infectados. Destes novos casos, 430000 referem-se a crianças com idade inferior a 15 anos. Estima-se ainda que 2 milhões de pessoas terão morrido em consequência da doença.

Quanto à situação nacional, segundo o relatório do Centro de Vigilância Epidemiológica das Doenças Transmissíveis do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, em 31 de Dezembro de 2008 foram notificados em Portugal 34888 casos de infecção HIV / SIDA nos diferentes estadios de infecção. O total acumulado de casos de SIDA era de 15020 dos quais 14263 casos foram causados pelo vírus HIV-1, 485 causados pelo vírus HIV-2, 189 casos por co-infecção (associada aos vírus HIV-1 e HIV-2) e 83 casos em que o tipo de vírus não foi comunicado.

Na origem da escalada dos números da SIDA está a adopção de comportamentos de risco:

- 46,7% toxicoddependência (consumo de drogas por via endovenosa)
- 35,7% transmissão sexual (heterossexual)
- 12,7% transmissão sexual (homossexual masculina ou bissexual)
- 4,9% restantes formas de transmissão

No combate à doença, a OMS defende a criação de um programa urgente e alargado de apoio ao tratamento dos milhões de doentes e infectados, especialmente nos países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, considerando que a doença é actualmente «um dos maiores desafios» à comunidade internacional.

1.2 - Vírus da Imunodeficiência Humana

O vírus da imunodeficiência humana pertence à família *Retroviridae* e género *Lentivírus*.

Estão identificados 2 tipos de vírus da imunodeficiência humana (Soriano et al., 2007):

- tipo-1 (HIV-1): principal agente causador da síndrome de imunodeficiência humana adquirida (SIDA), isolado pela primeira vez em 1983 pelo grupo de Montagnier.
- tipo-2 (HIV-2): encontra-se mais confinado a África, tendo sido identificado em 1986 pelo grupo de Clavel.

1.2.1 - Estrutura do HIV-1

A partícula infectante do HIV-1, o virião, é de estrutura esférica, com cerca de 110 nm de diâmetro e possui (Soriano, 2005; Brunton et al., 2006; Levinson, 2004):

- **nucleocapsídeo ou core** - estrutura de natureza proteica (p24) que envolve:
 - **genoma viral:** constituído por duas cópias de RNA (ácido ribonucleico) idênticas, de cadeia simples (ssRNA), com 9300 pares de bases e polaridade positiva
 - **enzimas:** transcriptase reversa (TR), integrase e protease
- **matriz** - de natureza proteica
- **invólucro ou envelope** - bicamada fosfolipídica e proteínas (moléculas HLA classe I e II) constituintes da membrana plasmática da célula hospedeira, possuindo cerca de 72 espículas formadas por duas glicoproteínas (gp), uma superficial (gp120) e outra transmembranar (gp41).

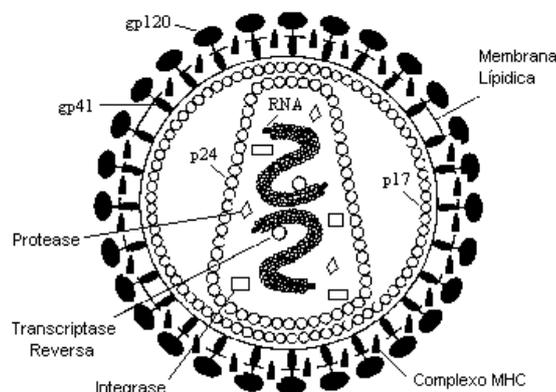


Figura 1 – Partícula vírica do HIV-1
Imagem adaptada da fonte: www.webmd.com, 2006

O genoma do HIV-1 é constituído por nove genes e por sequências terminais repetitivas (LTR) que se encontram nas extremidades 5' e 3' (Soriano, 2005; Murray et al., 2000; Levinson, 2004).

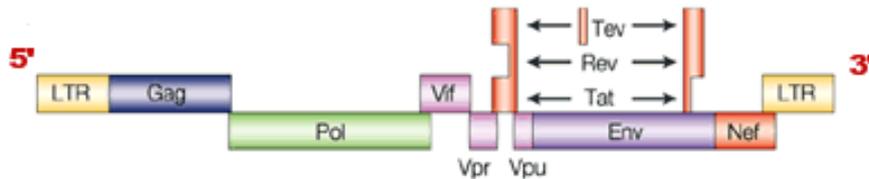


Figura 2 – Genoma do HIV-1

Imagem adaptada da fonte: en.wikipedia.org/wiki/HIV_structure_and_genome, 2006

Três dos genes são designados por *major genes*:

- ***gag*** (grupo antigénico específico) – que codifica proteínas estruturais do core (como a p24)
- ***pol*** (*polimerase*) – que codifica as enzimas TR (possui também actividade de ribonuclease H), integrase e protease
- ***env*** (envelope) – que codifica as glicoproteínas do envelope (a gp160, precursora da gp120 e gp41)

Os restantes seis genes exercem funções de regulação:

- ***vif*** (factor de infecciosidade viral) – inibe a acção da APOBEC3G, enzima que causa hipermutação do DNA (ácido desoxiribonucleico) viral
- ***vpr*** (proteína viral R) – relacionado com o transporte do DNA pró-viral para o núcleo
- ***tat*** (transactivador da transcrição) – regulador positivo da transcrição

- **rev** (regulador de expressão viral) – regula o processo de passagem dos transcritos do núcleo para o citoplasma
- **vpu** (proteína viral U) – promove a libertação dos viriões
- **nef** (factor de virulência) – reduz a síntese de proteínas MHC (*major histocomplex*) classe I diminuindo assim a capacidade de resposta do sistema imunológico no combate à infecção (ligação das células T citotóxicas com as células infectadas)

1.2.2 – Grupos e subtipos do HIV-1

Tendo em conta a sua grande variabilidade genética, o HIV-1 foi classificado, com base na análise do gene *env*, em três grandes grupos - grupo M (*major*), grupo O (*outlier*) e grupo N (não M e não O)) com vários subtipos. Podem também surgir formas recombinantes circulantes (CRF) resultantes de co-infecções (Antunes, 2004).

Tabela I – Classificação do HIV-1

Tipo	Grupo	Subtipos
HIV-1	M	9 (A, B, C, D, F, G, H, J, K) 16 CRF
	O	5 (I, II, III, IV, V)
	N	-

Os grupos O e N têm muito pouca expressão, sendo maioritariamente encontrados no continente africano. A grande maioria dos vírus circulantes pertence ao

grupo M do HIV-1, sendo a distribuição geográfica dos subtipos muito heterogénea (Antunes, 2004; APECS, 2001).



Figura 3 – Distribuição geográfica do HIV
Imagem adaptada da fonte: Hess G., Roche Diagnostics GmbH

Em Portugal, segundo um estudo realizado no Centro de Biologia Molecular do Serviço de Imuno-hemoterapia do Hospital de São João E.P.E. – Porto, onde foram genotipados 1275 doentes infectados pelo HIV-1 entre 2002 e 2005, a prevalência dos subtipos do HIV-1 apresenta a seguinte distribuição (Martins et al., 2008):

- subtipo B: 55%; subtipo G: 37%; subtipo C: 2,43%; CRF (formas recombinantes circulantes) G/B: 1,25%; subtipo F: 1,10%; outros subtipos: 4%.

1.2.3 - Tropismo do HIV-1

A capacidade que o HIV-1 tem para penetrar em determinadas células, conhecida como tropismo celular, é determinada pela expressão de receptores e co-receptores específicos existentes na membrana da célula hospedeira.

Existe um receptor específico e comum a todos os subtipos do HIV-1, a molécula CD4, e uma série de co-receptores, sendo os CXCR4 e CCR5 os mais importantes (Murray et al., 2000; Berger et al., 1999; Gorry et al., 2005).

A molécula CD4 é expressa em:

- linfócitos T CD4⁺
- macrófagos/monócitos
- células epiteliais de Langerhans
- células foliculares dendríticas
- células M das placas de Peyer

São reservatórios do vírus:

- células T CD4⁺ memória
- gânglios linfáticos
- sistema nervoso central (células da microglia)
- testículos

De acordo com a diferente afinidade para os co-receptores CXCR4 e CCR5 distinguem-se três tipos de variantes do HIV-1:

- ✓ “linfotrópicas” (variantes X4)
- ✓ “macrotrópicas” (variantes R5)
- ✓ “bi-trópicas” (variantes R5/X4)

A grande maioria dos indivíduos infectados possui predominantemente vírus macrotrópicos. A mudança fenotípica na utilização do co-receptor (de CCR5 para CXCR4) está associada à progressão da doença. A afinidade do HIV-1 para se ligar ao CXCR4 orienta a infecção para linfócitos T e acelera a perda de células T auxiliaadoras

(*helper*) CD4⁺ levando a um estado de imunossupressão, para o qual contribui o facto das variantes X4 do HIV-1 serem capazes de induzir a formação de sincícios (SI). Esta formação de sincícios (fusão das células infectadas), que não existe nas estirpes R5 (NSI – não indutores de sincícios), torna as variantes SI mais agressivas, provocando uma progressão mais rápida da doença (Hovden et al., 2002; Ruibal-Ares et al., 2004).

Não está ainda esclarecido se a referida mudança de afinidade para o co-receptor é causa ou consequência do avançar da doença (Brunton et al., 2006).

1.2.4 - Ciclo de replicação do HIV-1

O ciclo de replicação do HIV-1 consiste em várias etapas (Antunes, 2004; Soriano et al., 2007):

- 1) Adsorção - traduz-se na ligação do vírus à célula (mediada por interacção do complexo gp120/gp41 do vírus com os receptores CD4 e os co-receptores CXCR4 e/ou CCR5 da célula);
- 2) Penetração - consiste na entrada do vírus na célula, realizada em três fases:
 - endocitose
 - fusão do invólucro com a membrana plasmática
 - translocação (interiorização numa vesícula de endocitose)
- 3) Descorticação – consiste na libertação do material genético no citosol, por acidificação da vesícula;
- 4) Transcrição Reversa – consiste na síntese de cDNA (DNA complementar) a partir dos *primers* localizados nas LTR do RNA viral por acção da enzima

TR, seguida da síntese de DNA de cadeia dupla (DNA pró-viral) a partir do cDNA, processo igualmente mediado pela TR;

- 5) Integração - é a incorporação do DNA pró-viral no genoma da célula hospedeira por acção da enzima integrase;
- 6) Transcrição - configura a síntese do RNA mensageiro (mRNA), através das enzimas humanas;
- 7) Tradução - consiste na formação de polipeptídeos a partir do mRNA nos ribossomas;
- 8) Desenvolvimento e maturação viral - opera-se pela formação de diversas proteínas virais resultantes da clivagem dos polipeptídeos por acção da enzima protease;
- 9) Excreção do virião - realiza-se por evaginação precedida pela acumulação dos componentes víricos na membrana celular.

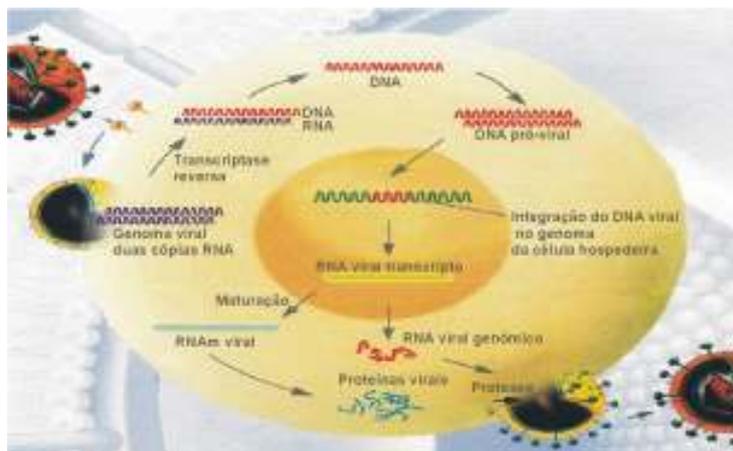


Figura 4 – Ciclo de replicação do HIV-1

1.3 - Infecção pelo HIV-1

1.3.1 - Evolução e manifestações clínicas da infecção pelo HIV-1

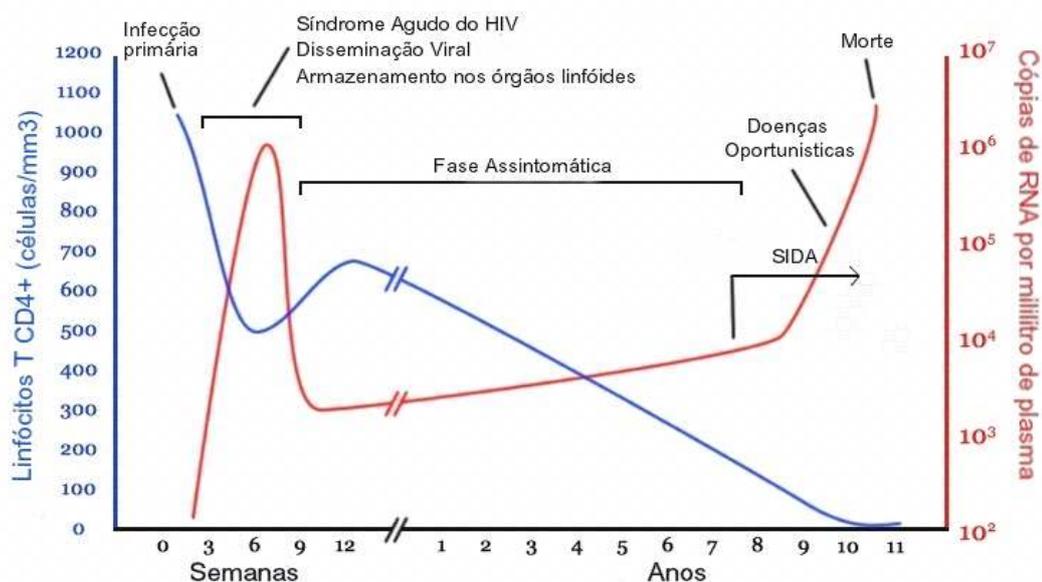


Figura 5 – Evolução da infecção pelo HIV-1
 Imagem adaptada da fonte: en.wikipedia.org/wiki/HIV, 2006

A infecção pelo HIV-1 caracteriza-se por ser uma doença crônica com evolução de vários anos ou décadas.

Apresenta três fases com distintas características clínicas, imunológicas e virológicas (Antunes, 2004; Soriano et al., 2007):

1. Primoinfecção

Corresponde ao período de acentuada replicação viral que se segue imediatamente à exposição do indivíduo ao HIV-1. Durante esta fase, a maioria dos doentes desenvolve uma síndrome aguda inespecífica caracterizada por febre, cefaleias, entre outros. A resposta imunológica

específica contra o HIV-1, denominada de seroconversão (detecção de anticorpos anti-HIV-1 no plasma), ocorre durante as primeiras quatro semanas.

2. Fase assintomática

Neste período ocorre replicação vírica contínua, deterioração progressiva do sistema imunológico (declínio do número de linfócitos T CD4⁺ de aproximadamente 50-100/ano) e latência clínica cujo período assintomático pode durar anos ou décadas.

3. Síndrome de imunodeficiência humana adquirida - SIDA

É a manifestação mais severa da infecção pelo HIV-1. Caracteriza-se por um número muito reduzido de células T CD4⁺ (estado de imunodeficiência grave) e pelo aparecimento de diversas doenças associadas, como infecções oportunistas, sarcoma de Kaposi, linfoma, encefalopatia, infecção oportunista com sarcoma de Kaposi, pneumonia intersticial linfóide, síndrome de emaciação por HIV, carcinoma invasivo do colo do útero, entre outras.

1.3.2 - Diagnóstico e monitorização da infecção pelo HIV-1

A detecção precoce da infecção pelo HIV-1 é essencial para um melhor prognóstico da doença e controlo da disseminação do vírus (APECS, 2001).

Em 1985 surge o primeiro teste de identificação de anticorpos anti-HIV.

Desde então, é constante a evolução e optimização das técnicas de diagnóstico e monitorização da infecção pelo HIV-1, sempre com o intuito de aumentar a sensibilidade e especificidade e diminuir o “período janela” (período de tempo desde o 1º contacto com o HIV-1 até à sua detecção) dos métodos existentes.

Actualmente um doente infectado pelo HIV-1 em tratamento deve ser monitorizado clínica e biologicamente em consultas de periodicidade de 3 a 6 meses (Antunes, 2004; Soriano et al., 2007).

Existem diversas técnicas para detectar e monitorizar a infecção HIV-1, entre as quais se destacam:

✓ Técnicas imunológicas

- pesquisa de antígenos e anticorpos
- contagem periódica do número de linfócitos T CD4⁺

✓ Técnicas de biologia molecular

- quantificação periódica do RNA do HIV-1
- pesquisa do DNA pró-viral
- genotipagem do HIV-1 para detecção de resistências aos anti-retrovíricos

Deve ser também avaliada a necessidade de estudos bioquímicos, hematológicos, Raio X pulmonar, ecocardiograma, entre outros.

Com estes meios de diagnóstico e monitorização é possível detectar e controlar a infecção e seus efeitos (Antunes, 2004; APECS, 2001).

1.4 - Terapêutica anti-retrovírica

A dificuldade de produção de vacinas decorre da enorme capacidade de diversificação genética que confere a este vírus sucesso como agente infeccioso. Com efeito, o HIV-1 caracteriza-se por possuir uma capacidade elevada de replicação (10^8 a 10^{10} partículas víricas/dia) e longos períodos de actividade (≥ 10 anos). Além disso a sua transcriptase reversa não possui actividade de *proofreading*, isto é, não possui capacidade de verificação e reparação de nucleótidos incorrectamente incorporados, o que origina aproximadamente 1 a 3 mutações por cada cópia de cDNA (Brunton et al., 2006).

Os inibidores da transcriptase reversa análogos dos nucleosídeos (NRTI) foram os primeiros fármacos utilizados como agentes anti-retrovíricos no tratamento da infecção pelo HIV (Soriano, 2005).

1.4.1 - Breve resenha histórica

-1987: aprovado o primeiro fármaco anti-HIV, denominado de Zidovudina (AZT), pertencente à classe dos NRTI, para tratamento de doentes sintomáticos.

-1988: extensão da indicação a doentes assintomáticos.

-1990: introdução de outros inibidores da transcriptase reversa: didanosina e zalcitabina.

-1993: indicação do tratamento combinado com inibidores da transcriptase reversa.

-1994/96: introdução da lamivudina, estavudina e aprovados os primeiros inibidores da protease (indicados no tratamento para máxima supressão da replicação vírica).

-1998/02: introdução de inibidores da transcriptase reversa não nucleosídicos e nucleotídicos.

-2003: introdução dos inibidores de fusão.

- 2008: introdução do antagonista do CCR5.

1.4.2 – Terapêutica actual

Existem neste momento, pelo menos quatro classes de fármacos, designados de anti-retrovíricos, para o tratamento da infecção pelo HIV-1 (Brunton et al., 2006; Guimarães et al., 2006):

- inibidores da transcriptase reversa análogos dos nucleosídeos ou dos nucleotídeos (NRTI) - são nucleosídeos ou nucleotídeos modificados que actuam ao nível da transcrição do vírus mediada pela transcriptase reversa
- inibidores da transcriptase reversa não nucleosídicos (NNRTI) - são compostos sintéticos que se ligam aos locais activos da transcriptase reversa inibindo a sua acção na transcrição reversa
- inibidores da protease (PI) - são péptidos sintéticos que se ligam aos locais activos da protease inibindo a sua acção de clivagem dos polipeptídeos virais traduzidos (clivagem das proteínas *gag* e *pol*)

- inibidores da entrada - são compostos sintetizados para bloquear a entrada do vírus na célula (inibidores da fusão e antagonista do co-receptor)

Tabela II – Anti-retrovíricos aprovados para o tratamento da infecção HIV-1

Inibidores da Transcriptase Reversa			Inibidores da Protease	Inibidores da Entrada	
Análogos Nucleosídicos	Análogos Nucleotídicos	Não Nucleosídicos		Inibidores de fusão	Antagonista do co-receptor
Zidovudina (AZT) Didanosina (ddI) Lamivudina (3TC) Estavudina (d4T) Abacavir (ABC) Entricitabina (FTC)	Tenofovir (TDF)	Nevirapina (NVP) Efavirenze (EFV)	Indinavir (IDV) Nelfinavir Ritonavir (RTV) Saquinavir (SQV) Fosamprenavir (FPV) Amprenavir Lopinavir (LPV) Atazanavir (ATV)	Enfuvirtida	Maraviroc

Encontram-se em desenvolvimento outros fármacos de acção variada, entre eles os inibidores da integrase.

As normas para o tratamento anti-retrovírico (*Highly Active Anti Retroviral Therapy*-HAART) assentam na combinação de pelo menos três fármacos, a saber:

- dois NRTI combinados com um ou dois PI potenciados (com ritonavir), ou
- dois NRTI combinados com um NNRTI, ou
- três NRTI.

A combinação terapêutica anti-retrovírica previne a progressão da doença, prolongando a vida destes doentes.

O controlo da replicação viral e do emergir de estirpes resistentes ao tratamento implica a administração apropriada e continuada da terapêutica (Soriano, 2005).

1.4.3 - Início da intervenção terapêutica

O principal objectivo do tratamento visa a supressão da replicação viral para níveis não detectáveis e tão prolongada quanto possível (Antunes, 2004; APECS, 2000).

A terapêutica combinada anti-retrovírica contribui para:

- reduzir a incidência das principais infecções oportunistas
- reduzir o número de hospitalizações e os custos
- reduzir a morbidade e mortalidade
- diminuir a taxa de mutações e desenvolvimento de resistências
- suprimir a acentuada replicação vírica
- reduzir o risco de transmissão do vírus e preservar a imunidade
- diminuir a disseminação do vírus pelo organismo e a gravidade clínica

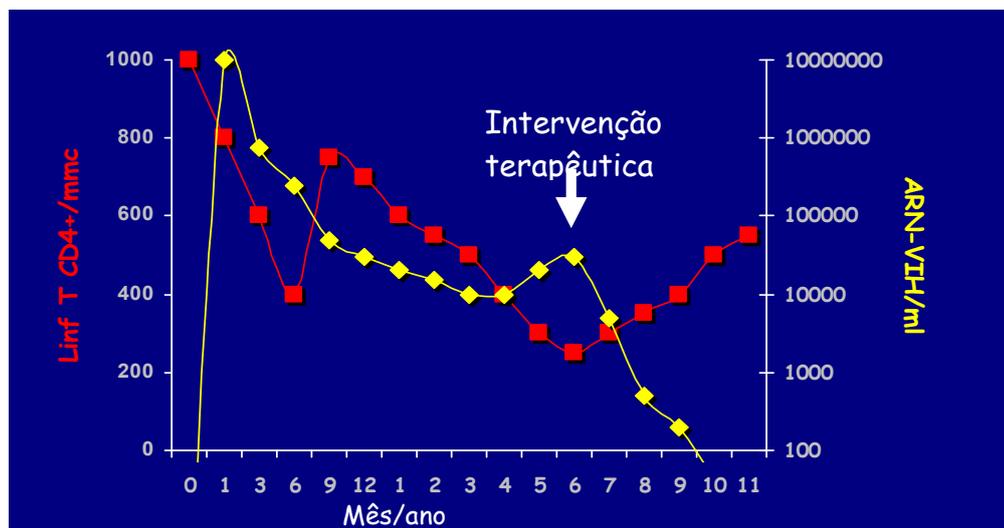


Figura 6 – Acção da intervenção terapêutica

A cura da infecção através desta terapêutica ainda não é possível uma vez que:

- a supressão total da replicação do HIV-1 não é conseguida com a HAART
- o vírus cria resistências aos anti-retrovíricos
- o início precoce da HAART não erradica o HIV-1
- existe um reservatório de células memória CD4⁺ latentes

A decisão para o início da terapêutica em doentes infectados pelo HIV-1 está relacionada com uma variedade de parâmetros clínicos e de diagnóstico, apresentados na figura 9.

Estão presentes sinais e sintomas associados à Infecção HIV?

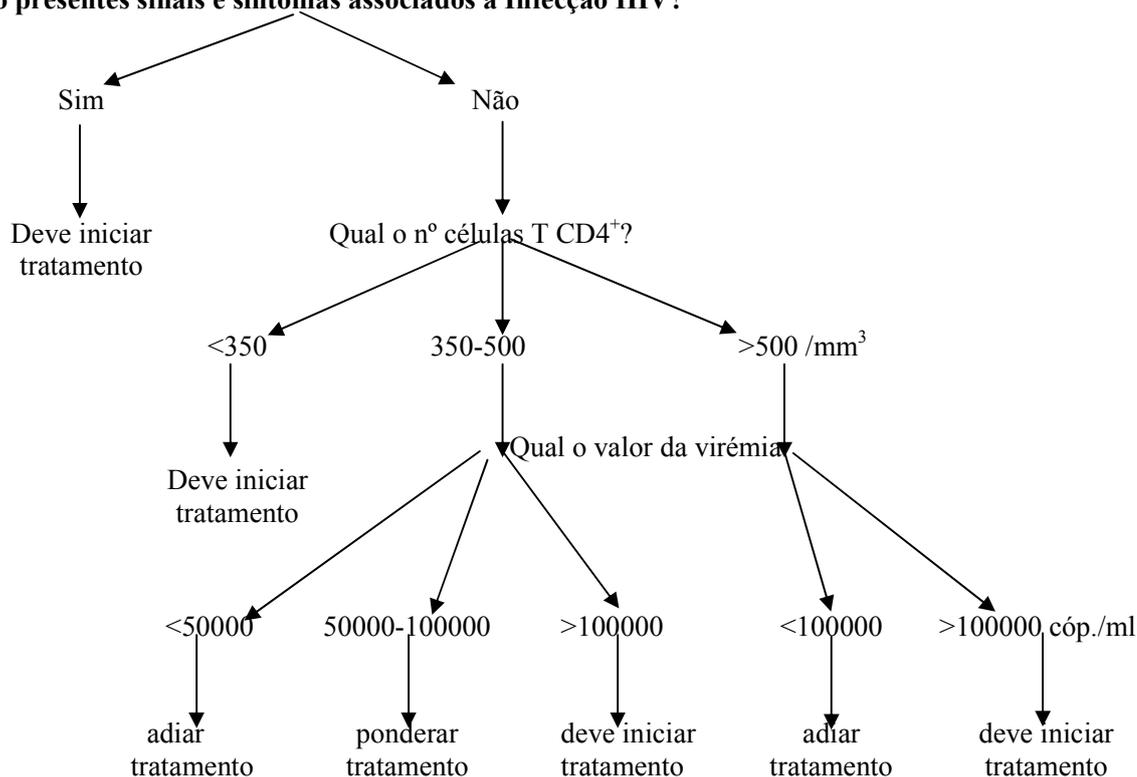


Figura 7 – Factores a ter em conta para o início da terapêutica na infecção HIV-1
 Imagem adaptada da fonte: The EACS Euroguidelines Group. European guidelines for the clinical management and treatment of HIV-infected adults in Europe. AIDS 2003; 17: S3-S26

1.4.4 - Falência terapêutica

Os principais motivos para o fracasso terapêutico estão relacionados com factores virológicos, imunológicos e clínicos, tais como (Soriano, 2005; Antunes, 2004; Soriano et al. 2007; APECS, 2000):

- tratamento inadequado
- resistência vírica inicial a um ou mais dos anti-retrovíricos
- absorção do fármaco alterada
- fraca difusão do fármaco para alguns locais de replicação viral (tecidos, compartimentos celulares, reservatórios)
- alterações farmacocinéticas que possam afectar os níveis plasmático e intracelular dos anti-retrovíricos
- fraca adesão terapêutica (complexidade dos esquemas terapêuticos)
- toxicidade significativa a longo prazo (factor que muito contribui para a não adesão ao tratamento ou descontinuada toma diária)
- interacções medicamentosas
- emergência de resistências/falência terapêutica (necessidade de ter à disposição testes de monitorização e detecção de resistências)
- sensibilidade individual de cada doente, especialmente nas variações da actividade metabólica e enzimática
- variabilidade genética.

1.4.5 – Mecanismos de resistências do HIV-1 ao tratamento

Actualmente, a ciência médica já desenvolveu técnicas que possibilitam a realização de testes genotípicos e fenotípicos para detecção de mutações que conferem ao vírus resistências ao tratamento anti-retrovírico, ferramentas consideradas imprescindíveis para o controlo e seguimento clínico destes doentes.

A resistência, por exemplo, aos NRTI ocorre mais frequentemente através de mutações que alteram a estrutura da TR de tal modo, que a forma TR mutante utiliza preferencialmente os nucleotídeos trifosfatados fisiológicos em vez dos análogos (Soriano, 2005).

Torna-se assim importante estabelecer, em situação de falência terapêutica, se as variantes originadas diariamente sob pressão selectiva (acção terapêutica) possuem mutações que conferem resistência aos fármacos. Estão descritos dois tipos de mutações, a considerar:

Mutações *major*

- as primeiras seleccionadas pelo fármaco
- demonstração a nível bioquímico ou virológico que provoca uma alteração no local de ligação do fármaco ou uma inibição da actividade vírica ou de replicação
- efeito no fenótipo

Mutações *minor*

- aparecem mais tarde
- isoladas, não provocam alterações significativas no fenótipo

- eventualmente melhoram a capacidade replicativa do vírus com mutações *major*

1.5 – Farmacocinética

Quando um fármaco é ingerido, o organismo começa imediatamente a processá-lo de acordo com as seguintes etapas: absorção/biodisponibilidade, distribuição, metabolismo (biotransformação) e eliminação. Todo este processo é denominado de farmacocinética (Brunton et al., 2006; Guimarães et al., 2006).

A absorção é a transferência do fármaco do seu local de administração para a corrente sanguínea. As características lipofílicas dos fármacos facilitam a sua passagem pelas membranas celulares para o seu local de acção. Os fármacos precisam de atravessar as membranas plasmáticas de muitas células até chegar ao seu local de acção. Por exemplo, um fármaco administrado por via oral precisa ser absorvido primeiramente pelo estômago e/ou intestino, passar pelo fígado, onde pode ocorrer metabolismo e excreção biliar, para chegar à circulação sanguínea. A biodisponibilidade do fármaco é a percentagem de fármaco administrado que chega à corrente sanguínea. A distribuição do fármaco da corrente sanguínea para os líquidos intersticiais e intracelulares depende também de alguns factores fisiológicos (como fluxo sanguíneo, permeabilidade capilar, volume tecidual, entre outros) e das propriedades físico-químicas específicas de cada fármaco. Alguns fármacos circulam na corrente sanguínea ligados a proteínas plasmáticas (os fármacos de pH ácido ligam-se tendencialmente à albumina e os de pH básico à

glicoproteína ácida $\alpha 1$). Esta ligação é geralmente reversível (Brunton et al., 2006; Guimarães et al., 2006).

O metabolismo dos fármacos em metabolitos mais hidrofílicos é essencial para a sua inactivação biológica e farmacológica, bem como para a sua excreção.

Estão descritos dois tipos de reacções de metabolismo/biotransformação dos fármacos:

- reacções de fase I (hidrólise, redução e oxidação) - introduzem ou expõem um grupo funcional do composto original, como ocorre nas reacções de hidrólise

- reacções de fase II (conjugação) – resultam na formação de uma ligação covalente entre um grupo funcional do composto original ou do metabolito da fase I e o ácido glicurónico, o sulfato, a glutatona, o metilo, o acetato ou aminoácidos, formados pelos processos endógenos (Brunton et al., 2006; Guimarães et al., 2006).

Os sistemas enzimáticos envolvidos na biotransformação dos fármacos estão localizados principalmente no fígado, embora de distribuição ubiqüitária.

Os pró-fármacos são compostos farmacologicamente inactivos produzidos a fim de maximizar a quantidade da substância activa que chega ao local de acção. Os pró-fármacos inactivos são convertidos em metabolitos biologicamente activos, em geral por hidrólise de uma ligação éster ou amina.

A ligação dos fármacos às proteínas plasmáticas em geral não limita a biotransformação, já que o processo de biotransformação reduz a concentração do fármaco livre. Esta redução conduz à dissociação do fármaco ligado às proteínas, restabelecendo assim o equilíbrio entre as fracções livre e ligada e consequente equilíbrio entre a concentração plasmática (da fracção livre) e intracelular.

No processo de excreção os fármacos são eliminados sem sofrer qualquer alteração, ou na maioria dos agentes terapêuticos, são convertidos em metabolitos. O rim é o principal órgão de excreção. A excreção renal inclui três processos independentes: - filtração glomerular, secreção tubular activa e reabsorção tubular passiva. Em situações de alteração da função renal estes três processos são afectados proporcionalmente. Mesmo nos indivíduos saudáveis a função renal não é constante (Brunton et al., 2006; Guimarães et al., 2006).

O princípio fundamental da farmacocinética clínica é que existe uma relação entre os efeitos farmacológicos e a concentração disponível dos fármacos. Na maioria dos casos a concentração do fármaco nos seus locais de acção está relacionada com a sua concentração na circulação sistémica (Brunton et al., 2006).

A farmacocinética clínica tenta estabelecer tanto uma relação quantitativa entre dose e efeito, quanto uma estrutura básica que permita interpretar as determinações das concentrações dos fármacos nos fluidos biológicos para benefício do paciente. A importância da farmacocinética na assistência ao paciente relaciona-se com o aumento da eficácia terapêutica e a redução dos efeitos indesejáveis. Os quatro parâmetros mais importantes que governam a disposição dos fármacos são a depuração, que é uma medida da eficácia do organismo na eliminação do fármaco; volume de distribuição, que é uma medida do espaço aparentemente disponível no organismo para conter o fármaco; semi-vida de eliminação, que é uma medida da taxa de remoção do fármaco do organismo; e biodisponibilidade, ou fracção do fármaco absorvido (Brunton et al., 2006; Guimarães et al., 2006).

1.6 - Caracterização dos NRTI

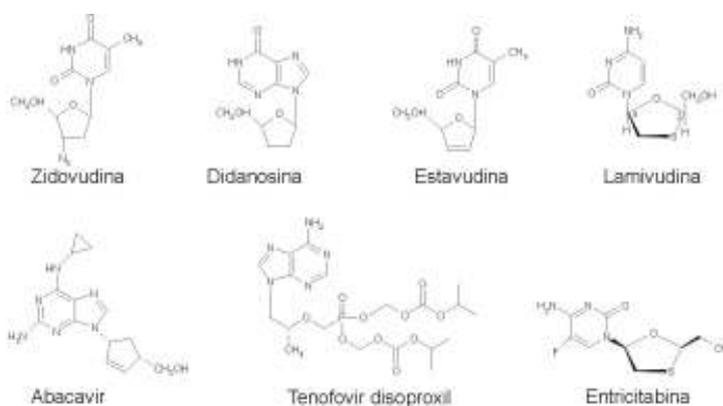


Figura 8 – Estrutura dos NRTI
Imagem adaptada da fonte: Brunton L., 2006

Os NRTI, objecto do presente trabalho, caracterizam-se por (Guimarães et al., 2006; Brunton et al., 2006):

- serem análogos dos nucleosídeos ou dos nucleotídeos
- actuarem ao nível da transcrição reversa
- serem pró-fármacos que requerem fosforilação intracelular (mediada por cínases), que consiste basicamente numa tripla fosforilação, para poderem actuar como análogos nucleotídicos trifosfatados
- diferirem por pequenas modificações ao nível do açúcar (perda do grupo hidroxilo no carbono 3')
- actuarem como substratos alternativos (competindo com os nucleotídeos fisiológicos)
- actuarem como terminadores da síntese de DNA pró-viral, impossibilitando as ligações fosfodiéster pela transcriptase reversa

1.6.1 - Metabolização dos NRTI

Ainda não estão totalmente entendidos todos os mecanismos, interações e vias de metabolização dos NRTI, sendo portanto necessários mais estudos para melhor percepção (Brunton et al., 2006).

Não obstante, é sabido que o influxo dos NRTI para a célula hospedeira se processa por difusão simples ou recorrendo a transportadores transmembranares de nucleosídeos (Lodish et al., 2004).

A difusão simples é a passagem de pequenas moléculas hidrofóbicas através da membrana celular plasmática sem recurso a qualquer transportador e sem dispêndio de energia metabólica pois o movimento é a favor do gradiente de concentração.

Os transportadores da família ABC (*ATP Binding Cassette*), frequentemente denominados de ATPases, estão também envolvidos no transporte dos NRTI através da membrana. Utilizam a energia da hidrólise de ATP para promover o movimento das moléculas pela membrana contra o gradiente de concentração química ou potencial da membrana ou de ambos (gradiente electroquímico). Sabe-se ainda que a glicoproteína-P (*Multidrug-Resistance (MDR) transport protein* - MDR1) está envolvida no efluxo dos NRTI. Esta proteína usa a energia proveniente da hidrólise de ATP para exportar uma grande variedade de substratos do citosol para o meio extracelular evitando assim a permanência do fármaco no interior da célula (fenómeno designado por *resistência*). Células com elevados níveis de MDR são células cujo gene *Mdr1* é amplamente expresso, resultando numa ampla produção de proteína MDR1. A grande maioria dos fármacos transportados pela MDR1 consta de pequenas moléculas hidrofóbicas que

difundem pela membrana plasmática. Para a destruição de células que sobre-expresssem MDR1 será necessária uma maior concentração extracelular do fármaco (Brunton et al., 2006; Lodish et al., 2004).

Para poderem exercer a sua acção, os NRTI necessitam de sofrer activação intracelular, mediada por cínases celulares e víricas, que consiste basicamente numa tripla fosforilação para assim se transformarem em análogos nucleotídicos trifosfatados. Não utilizam, portanto, a via CYP450 (citocromo P 450) (Brunton et al., 2006; Guimarães et al., 2006; Lodish et al., 2004).

A grande maioria dos NRTI é eliminado do organismo por excreção renal (Brunton et al., 2006).

Estão descritas mutações nos genes que codificam as proteínas envolvidas na metabolização dos NRTI. Este facto contribui em grande parte para alterações que conferem diferentes graus de resistência aos fármacos e, de acordo com a capacidade de metabolização, os doentes podem classificar-se em metabolizadores rápidos, intermédios ou lentos.

Actualmente, a farmacogenética é uma área em expansão cujo objecto de estudo se centra nas enzimas metabolizadoras de fármacos, proteínas transportadoras e nos seus genes reguladores (Soriano et al., 2007).

1.6.1.1 - Metabolização dos NRTI em estudo (FTC e TDF)

Estes dois fármacos são de administração oral e a posologia é normalmente a de um comprimido uma vez ao dia. Estes compostos podem ser tomados em separado

(associados a outras combinações terapêuticas) ou combinados (um comprimido já contém os dois fármacos) designando-se de Emtriva[®], Viread[®] ou Truvada[™]. Cada comprimido contém respectivamente: 200 mg de FTC; 245 mg de TDF; 200 mg de FTC + 300 mg TDF. O FTC pode ser ingerido com ou sem alimentos o TDF com alimentos.

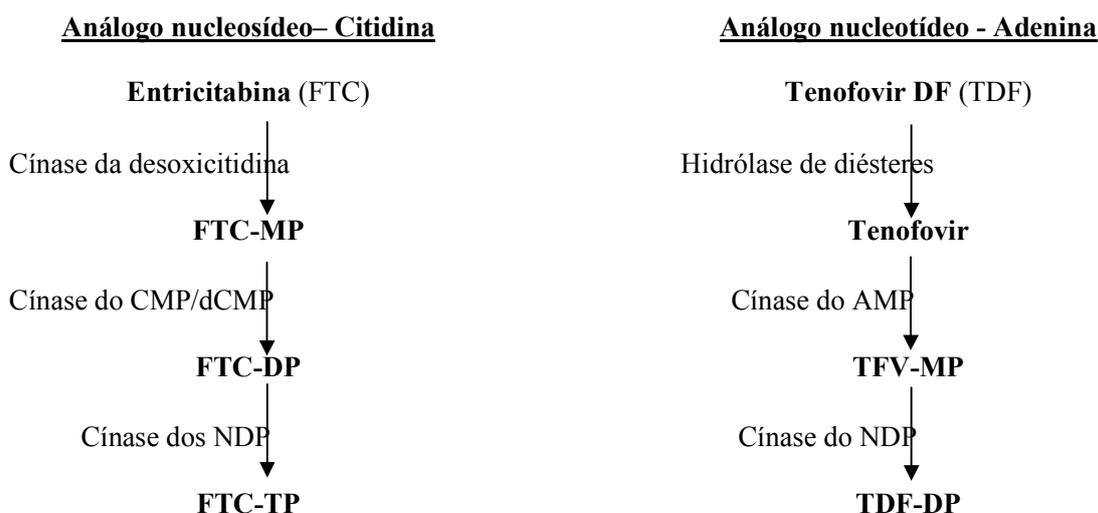


Figura 9 – Metabolização da Entricitabina e do Tenofovir
Imagem adaptada da fonte: Brunton L., 2006

1.6.2 - Mecanismos de toxicidade associada aos NRTI

A interação de um fármaco com o sistema biológico dá-se a dois níveis: acção do organismo sobre o fármaco (inclui a absorção, distribuição, metabolização e excreção) e do fármaco sobre o organismo (tanto ao nível celular como molecular). Ambos os mecanismos podem originar toxicidade (Timbrell, 2000).

Estão descritos dois tipos de factores que influenciam a distribuição e toxicidade (Timbrell, 2000), são eles: - factores químicos (como a afinidade lipídica, tamanho, estrutura, pKa, ionização, quiralidade) e factores biológicos (como a espécie, sexo, idade,

peso, factores genéticos, factores hormonais e enzimáticos, condições patológicas, *stress*, especificidades de tecidos e órgãos).

A toxicidade dos NRTI está dependente da capacidade destes fármacos conseguirem inibir a transcriptase reversa sem inibir as polimerases do DNA da célula hospedeira.

Estes análogos trifosfatados, apesar da baixa afinidade para as polimerases α e β do DNA (apenas inibidas por concentrações muito elevadas dos NRTI), são capazes de inibir a polimerase γ do DNA (enzima mitocondrial por excelência) promovendo efeitos citotóxicos ao nível das mitocôndrias (Brunton et al., 2006; Anderson et al., 2004).

Os NRTI inibem a actividade da polimerase γ do DNA por dois mecanismos:

- competindo com os nucleotídeos fisiológicos
- terminando a extensão da cadeia de DNA mitocondrial

A diminuição da síntese de DNA mitocondrial compromete a síntese dos complexos (I, III, IV e V) da cadeia respiratória. Como consequência dá-se a acumulação de ácidos gordos livres e de piruvato que se traduz numa menor produção de ATP (adenina tri-fosfatada) e numa deficiente eliminação de radicais livres, promovendo um efeito citotóxico. Assim, esta inibição da polimerase γ pelos NRTI causa:

- alterações estruturais na mitocôndria
- diminuição da quantidade de DNA mitocondrial
- mutações no DNA mitocondrial
- alteração do funcionamento da cadeia respiratória mitocondrial

O nucleosídeo com maior afinidade para a polimerase DNA γ é o ddI, seguindo-se o d4T > 3TC > AZT > ABC.

Os últimos NRTI aprovados, TDF e FTC, apresentam indícios de menor toxicidade (Brunton et al., 2006; Anderson et al., 2004).

Os efeitos adversos desta citotoxicidade manifestam-se clinicamente por: neuropatia periférica, pancreatite, acidose láctica/metabólica (normalmente associada a hepatomegalia e esteatose), insuficiência hepática, falência renal, aumento rápido dos valores das transaminases (ALT/AST >5 vezes o limite normal superior), elevação da lipase (~2,1 vezes o limite normal superior) lipodistrofia e distúrbios metabólicos (hiperlactacidemia, hiperlipidemia), disfunção/lesão mitocondrial de grau variável, afecções hematológicas (anemia, neutropenia, trombocitopenia), síndrome de reactivação imunológica (reacção inflamatória a infecções oportunistas assintomáticas ou residuais).

O HIV-1 induz a apoptose por diferentes mecanismos (Brunton et al., 2006; Anderson et al., 2004):

- indução da via das caspases através de determinadas proteínas virais como *tat*, *vpr* y *gp120*
- acção ao nível da cadeia respiratória mitocondrial
- acção das proteínas virais sobre as proteínas celulares (bloqueando a sua síntese e promovendo a lise) e sobre o mRNA (degradando-o e impedindo o seu transporte para o citoplasma)

1.7 - Monitorização da terapêutica anti-retrovírica

Nos últimos anos aumentou o interesse nos factores farmacológicos que podem afectar a acção dos anti-retrovíricos (Soriano et al., 2007).

Um dos princípios fundamentais da farmacologia é que existe uma relação quantificável entre as doses dos fármacos, as concentrações nos fluidos biológicos (farmacocinética) e o efeito terapêutico (farmacodinâmica).

A monitorização da terapêutica anti-retrovírica (TDM – *Therapeutic Drug Monitoring*) consiste na determinação das concentrações plasmáticas e/ou intracelulares dos anti-retrovíricos. Uma TDM apropriada assegura a eficácia e previne resistências ao tratamento.

A monitorização terapêutica torna-se importante no estudo farmacocinético de doentes em tratamento pois permite (Murray et al., 2000; Bahrami et al., 2005; Ferrer et al., 2004; Pélerin et al., 2005; Poirier et al., 2005):

- determinar qual a dose que melhor se adapta a cada doente e assim reduzir o risco de recidiva infecciosa e prevenir resistências ao tratamento por insuficiente concentração do fármaco
- diminuir a toxicidade associada a elevadas concentrações plasmática e intracelular dos anti-retrovíricos
- ajustar a dose em doentes com alterações gastrointestinais, patologia renal e hepática, entre outras alterações
- avaliar interacções medicamentosas e alimentares

- ajustar a terapêutica em doentes “experimentados” que possam ter estirpes virais com reduzida susceptibilidade à HAART
- avaliar o tratamento em doentes sob regimes terapêuticos alternativos cuja segurança e eficácia ainda não foram estabelecidas em ensaios clínicos
- avaliar o tratamento em doentes *naïve* sem resposta virológica
- ajustar a terapêutica em situações especiais como a gravidez ou pediatria
- avaliar a adesão aos NRTI (em estudos realizados foram já observadas discordâncias entre as doses dos fármacos prescritas e as que realmente os doentes ingeriam)

Ainda não está bem clara a correlação entre a concentração plasmática dos NRTI e a concentração intracelular dos análogos trifosfatados correspondentes.

Como os NRTI requerem uma fosforilação intracelular para iniciarem a sua actividade anti-vírica, pensa-se que os seus efeitos anti-HIV estarão mais bem correlacionados com a concentração intracelular quando trifosfatados do que com a sua concentração plasmática. No entanto, a monitorização das concentrações plasmáticas dos NRTI pode ser útil na avaliação e gestão das interacções fármaco-fármaco que afectam as concentrações plasmáticas.

A administração destes anti-víricos requer um cuidadoso e continuado *follow-up* destes doentes pois são múltiplos os efeitos secundários adversos, factor que muito contribui para a não adesão ao tratamento ou descontinuada toma diária (Soriano et al., 2007).

Os estudos para monitorização terapêutica requerem que o doente tenha atingido o estado estacionário, o que normalmente acontece 2 semanas após o início da administração do fármaco.

Com o aumento do número de anti-retrovíricos disponíveis no mercado e a combinação cada vez maior de fármacos a administrar em doentes infectados, a implementação de uma metodologia por Cromatografia Líquida de Alta Resolução (*high-performance liquid chromatography*, HPLC) otimizada para a determinação plasmática/intracelular dos NRTI será muito útil (Murray et al., 2000; Soriano et al., 2007; Bahrami et al., 2005; Ferrer et al., 2004; Pélerin et al., 2005; Poirier et al., 2005).

Além da cromatografia, existem outras técnicas analíticas que se podem utilizar, como técnicas imunológicas, espectroscopia de massa, entre outras. As técnicas por HPLC são as mais utilizadas pelos laboratórios clínicos pois permitem a determinação em simultâneo de vários fármacos, o que as torna relativamente mais económicas (Soriano et al., 2007).

1.7.1 –HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*)

A cromatografia é uma técnica analítica que permite separar os componentes de uma mistura atendendo a propriedades como a solubilidade, tamanho e massa (Lima et al., 2003).

Primeiramente é necessária uma purificação da amostra para posterior análise cromatográfica. A separação cromatográfica está relacionada com o fenómeno de adsorção de moléculas, que constituem a mistura líquida, à fase estacionária - coluna. A

separação torna-se possível recorrendo-se a eluentes apropriados. No final, a identificação dos compostos separados é registada num pico que, idealmente, deve ter um formato Gaussiano.

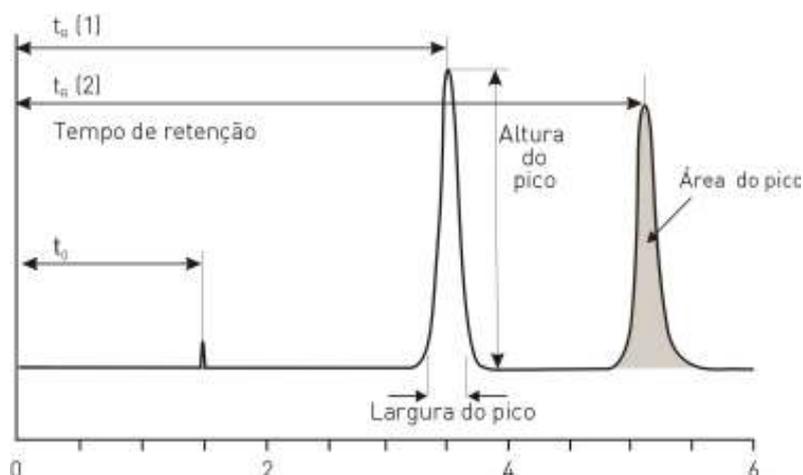


Figura 10 – Resultados da detecção por HPLC e respectivas medições

As soluções padrão de cada um dos NRTI que se pretende quantificar são submetidas a uma análise cromatográfica a fim de se obter uma curva analítica que relaciona as áreas com as concentrações (Bahrami et al., 2005; Ferrer et al., 2004; Pélerin et al., 2005; Poirier et al., 2005; Lima et al., 2003).

Dispondo da equação da curva analítica, e por interpolação, consegue-se determinar a concentração dos analitos presentes nas amostras.

O método de padronização interna (MPI) consiste em adicionar um composto, denominado de padrão interno, cuja concentração será a mesma em todas as soluções. Assim, qualquer oscilação de volume de uma aplicação para outra irá afectar na mesma proporção as áreas de ambos e o efeito da variação do volume aplicado é atenuado (Lima et al., 2003).

1.8 - Objectivo do estudo

O presente estudo experimental consistiu na determinação da concentração intracelular de TFV-DP e FTC-TP (NRTI) em doentes infectados pelo HIV-1 a fazer tratamento com Truvada™ ou Viread®, há pelo menos 1 mês, e que não apresentassem alterações hepáticas ou renais.

Capítulo 2

Material e Métodos

2.1 - Identificação da população em estudo

O estudo foi realizado em 34 doentes portadores da infecção pelo HIV-1 seguidos nas consultas do Hospital de Dia do Serviço de Doenças Infecciosas do Hospital de São João E.P.E. – Porto, seleccionados de acordo com os critérios referidos adiante, e após consentimento informado (ver anexo 1). Foi aprovado pela Comissão de Ética e autorizado pelo Conselho de Administração do mesmo Hospital, em 6 de Dezembro de 2006. Foi respeitada a confidencialidade, de acordo com o sigilo profissional, relativamente à identificação e respectiva informação clínica recolhida (ver tabelas do anexo 2).

2.2 - Parâmetros de selecção dos doentes

Os doentes foram seleccionados de acordo com os seguintes critérios:

- Infecção pelo HIV-1;
- Tratamento com TruvadaTM ou Viread[®] por um período mínimo de 1 mês;
- Ausência de alterações hepáticas (ALT, AST <1,5× os valores normais);
- Ausência de alterações renais (*clearance* da creatinina <90 ml/s/m²).

2.3 - Informação recolhida

- Sexo, idade e peso dos doentes

- Virémia (*Real time PCR*), nº linfócitos T CD4⁺ (Citometria de fluxo) e genotipagem do HIV-1 (Sequenciação).
- Registo da hora em que foi efectuada a colheita de sangue
- Resultados das últimas análises bioquímicas (transamínases e creatinina) e imunoquímicas (HIV, HCV - vírus da hepatite C e HBV - vírus da hepatite B) realizadas até 3 semanas antes das colheitas
- Fármacos instituídos no tratamento
- Dose e frequência das tomas
- Hora da última toma de cada um dos fármacos prescritos
- Co-medicações.

2.4 – Material usado no estudo

Foram realizadas 2 colheitas de sangue por doente, distanciadas entre 5 a 20 dias.

Das amostras de sangue procedeu-se à separação do plasma e das células mononucleares (*Peripheral Blood Mononuclear Cells* – PBMC) para a determinação da concentração dos seguintes analitos/fármacos:

- Plasma: Entricitabina (FTC) e Tenofovir (TDF);
- PBMC: Entricitabina tri-fosforilada (FTC-TP) e Tenofovir di-fosforilado (TDF-DP).

2.5 - Metodologias aplicadas

De acordo com o descrito por Becher (2002) procedeu-se à colheita da amostra de sangue por punção venosa, em tubos de citrato de sódio CPTTM (Mononuclear Cell Preparation Tube) de 8 ml da BD Vacutainer[®] (referência 362782).

Homogeneizou-se a amostra por inversão e centrifugou-se entre 1500 g a 1600 g durante 30 min a 20°C, nunca excedendo o período de duas horas após a colheita. Com a amostra diferenciada nos seus vários componentes procedeu-se da seguinte forma:

- Separou-se o plasma em tubos de 3 ml e armazenou-se a -20°C para a determinação da concentração de FCT e TDF no plasma. A metodologia aplicada foi adaptada de Verweij-van Wissen (2005) e poderá ser consultada em anexo (anexo 3). Não será feita uma descrição detalhada pois não se obtiveram resultados conclusivos, provavelmente pelo facto de se ter utilizado o mesmo tubo de colheita para as duas determinações (em nenhuma da bibliografia consultada para a determinação no plasma era referida a utilização deste tipo de tubos de separação celular).

- Separou-se o anel de células PBMC (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*) para um tubo *Falcon* de 15 ml para determinação da concentração intracelular de TFV-DP e FTC-TP de acordo com o descrito por Becher (2002).

Recolheu-se o máximo possível de células PBMC, adicionando 1 ml de NaCl 0,9% a 4°C ao tubo de CPT, ressuspendeu-se e transferiu-se para o respectivo tubo de *Falcon*. Toda a manipulação seguinte foi realizada a 4°C. Adicionou-se mais solução de NaCl 0,9% até perfazer um volume de 15 ml e inverteu-se o tubo 3 a 4 vezes centrifugando-se de imediato durante 10 minutos a 800 g. Removeu-se o sobrenadante

sem perturbar a *pellet* de células (se necessário centrifugou-se novamente durante 10 minutos a 300 g) e adicionou-se 2 ml de solução de sal de amónio ressuspendendo as células por aspiração. Incubou-se durante 3 minutos. Adicionou-se a solução a 0,9% de NaCl, de forma a perfazer um volume de 15 ml, e inverteu-se o tubo 3 a 4 vezes, centrifugando-se de imediato durante 10 minutos a 800 g. Removeu-se o sobrenadante sem perturbar a *pellet* de células (se necessário centrifugou-se novamente durante 10 minutos a 300 g), adicionou-se à *pellet* de células 700 µl da solução de NaCl a 0,9%, ressuspendendo as células por aspiração e transferiu-se para um tubo de rosca de 1,5 ml. Repetiu-se este procedimento.

Centrifugou-se a suspensão de células durante 10 minutos a 1800 g. Removeu-se o sobrenadante sem perturbar a *pellet* de células e armazenou-se de imediato a *pellet* de células a -80° C (se armazenada a -20° C deve-se proceder à determinação por um período máximo de 1 mês).*

Removeram-se as PBMC do congelador armazenando-as em gelo picado e sem deixar descongelar as células, adicionou-se 1 ml de solução de Tris HCl (0,05 M, pH 7,4) /MeOH numa proporção de 30:70 (v/v) a -20°C e 20µl de Controlo Interno (ABC a 160ng/ml a 4°C). Dissolveu-se a *pellet* de células por fricção do tubo contra uma superfície metálica para promover a lise das células por vibração metálica e centrifugaram-se os tubos a 18000 g durante 15 min, a 4°C. Transferiu-se rapidamente o sobrenadante para microtubos de 1,5 ml. Procedeu-se à evaporação do metanol no

* Nota: As etapas seguintes do procedimento para a deteção intracelular foram realizadas no Departamento de Imunologia do CEA (Centro de Energia Atómica) de Saclay – França. De salientar que em Janeiro de 2008 realizei um estágio de 3 dias, durante o qual pude observar e participar na realização desta parte da metodologia.

TurboVap *evaporator* (Zymark, France) durante 1h a 40°C. No final adicionaram-se 100 µl de Tris HCl (0,05M, pH 7,4), homogeneizou-se no vortex e centrifugou-se a 18000 g durante 15 min, a 4°C. Utilizaram-se 40 µl do sobrenadante para a injeção em HPLC-MS/MS. Injectaram-se primeiro os padrões, seguidamente as amostras, e terminou-se com nova injeção dos padrões.

Da análise cromatográfica determinou-se a área do pico dos fármacos nos padrões e nas amostras. Relacionaram-se as áreas dos padrões com as respectivas concentrações e obteve-se a equação da recta padrão. Por fim, determinou-se a concentração dos fármacos presentes nas amostras por interpolação das áreas com a recta padrão.

2.6 - Tratamento estatístico

Foram aplicados aos resultados vários testes estatísticos, incluindo testes não paramétricos devido ao tamanho da amostra e à assimetria das variáveis. Assim, para comparar as concentrações obtidas na 1ª colheita com as da 2ª colheita foi utilizado o teste de Wilcoxon para amostras emparelhadas. Para relacionar as concentrações obtidas na 1ª colheita com as variáveis em estudo foram utilizados os testes Mann-Whitney U e Kruskal-Wallis dependendo do número de categorias a comparar. Para comparar variáveis contínuas foi aplicado o teste de correlação de Spearman.

A análise foi efectuada utilizando o programa de análise estatística SPSS® v.18.0. Foi utilizado um nível de significância de 0,05 para todos os testes de hipótese.

Os resultados obtidos da determinação intracelular estão representados nas seguintes tabelas:

Tabela III – Caracterização relativa à idade e peso dos doentes

	Mediana	Mínimo	Máximo	P25	P75	n
Idade	42	30	69	38	46	34
Peso (kg)	68	51	105	57	78	33

Tabela IV – Concentração de TFV-DP e FTC-TP em função da idade

Idade	n	TFV-DP (fmol/10 ⁶ cells)			FTC-TP (pmol/10 ⁶ cells)		
		Mediana	p*	p***	Mediana	p*	p***
<40	11 (32,4%)	145,8	0,515	0,987	8,0	0,237	0,166
40-50	17 (50,0%)	124,2	0,053		10,6	0,352	
>50	6 (17,6%)	179,3	0,225		14,7	0,686	

* Teste de Wilcoxon; *** teste de Kruskal-Wallis

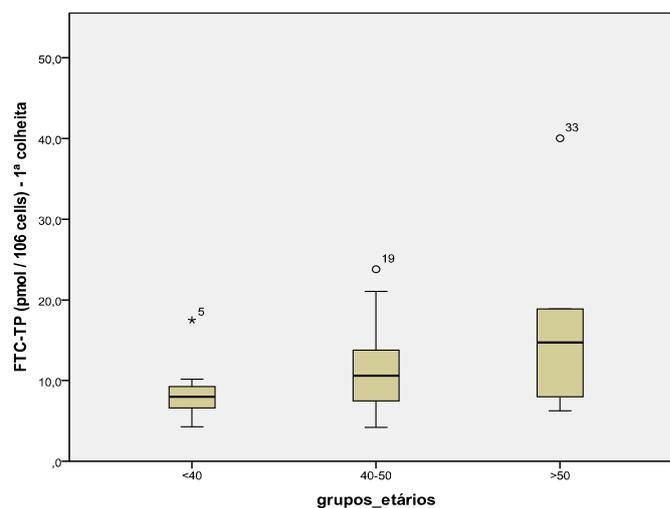
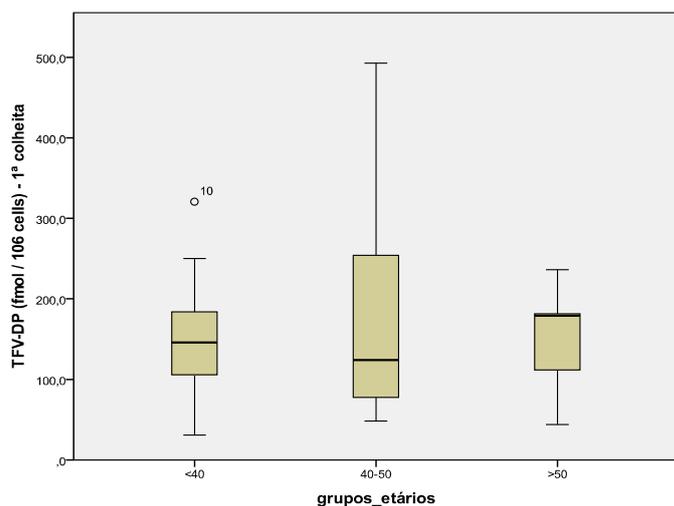


Gráfico 1 – Distribuição da concentração de TFV-DP e FTC-TP em função da idade

Relativamente à idade dos doentes verificou-se que:

- a mediana era de 42 anos, compreendida entre os 30 e os 69 anos
- 50% dos doentes estavam na quinta década de vida
- não houve diferenças estatisticamente significativas nos valores da concentração de TFV-DP e FTC-TP encontradas entre as primeiras e as segundas colheitas,
- não se verificaram diferenças estatisticamente significativas de concentração entre os vários grupos etários, contudo no gráfico 1 verifica-se tendência para um aumento da concentração de FTC-TP com o avançar da idade.

Tabela V – Concentração de TFV-DP e FTC-TP em função do peso

Peso (kg)	n	TFV-DP (fmol/10 ⁶ cells)			FTC-TP (pmol/10 ⁶ cells)		
		Mediana	p*	p***	Mediana	p*	p***
<65	16 (48,5%)	151,1	0,691	0,291	9,0	0,638	0,010
65-80	10 (30,3%)	72,0	0,612		8,3	0,176	
>80	7 (21,2%)	177,3	0,091		16,5	0,345	

* Teste de Wilcoxon; *** teste de Kruskal-Wallis

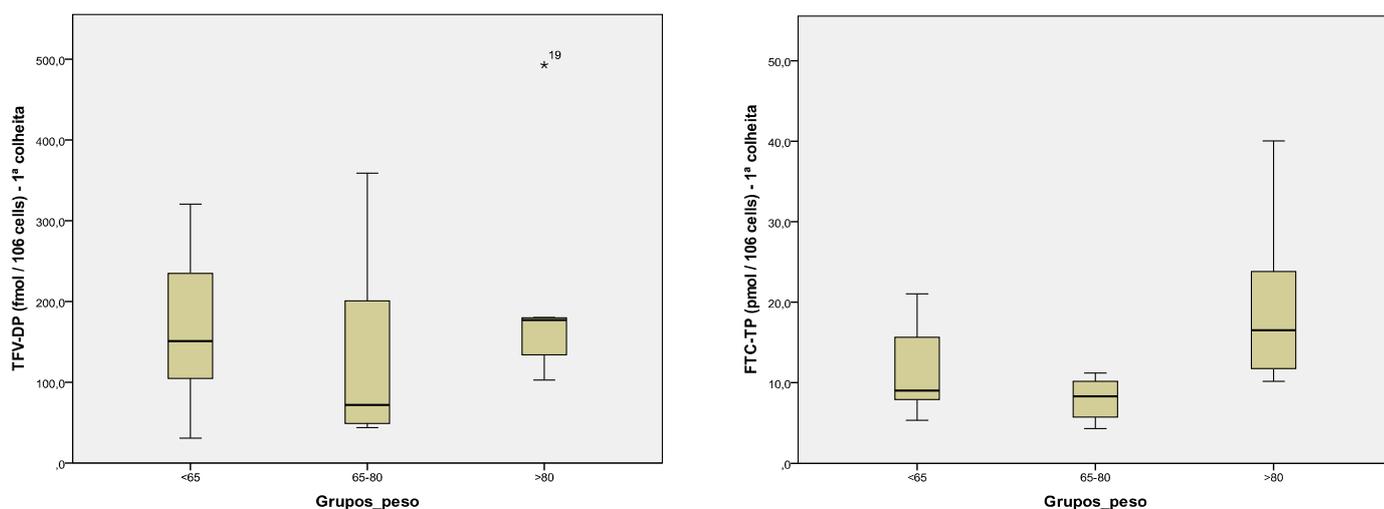


Gráfico 2 – Distribuição da concentração de TFV-DP e FTC-TP em função do peso

Relativamente ao peso dos doentes verificou-se que:

- a mediana era de 68 kg (compreendidos entre os 51 kg e os 105 kg)
- em 25% o peso era superior a 78 kg
- não houve diferenças estatisticamente significativas entre os valores encontrados nas primeiras e nas segundas colheitas
- no tratamento com FTC-TP verificou-se um aumento estatisticamente significativo da concentração a partir dos 80 kg ($p=0,01$), não se tendo verificado o mesmo no tratamento com TFV-DP.

Tabela VI – Concentração de TFV-DP e FTC-TP em função do sexo

Sexo	n	TFV-DP (fmol/10 ⁶ cells)			FTC-TP (pmol/10 ⁶ cells)		
		Mediana	p*	p**	Mediana	p*	p**
Masculino	28 (82,4%)	127,1	0,977	0,177	9,0	0,670	0,147
Feminino	6 (17,6%)	212,9	0,080		14,1	0,225	

* Teste de Wilcoxon; ** Teste de Mann-Whitney U

Dos 34 doentes seleccionados 6 eram do sexo feminino (17,6%) e 28 do sexo masculino (82,4%),

Conforme se pode verificar na tabela VI, não houve diferenças estatisticamente significativas nos valores da concentração de TFV-DP e FTC-TP encontrados entre as primeiras e as segundas colheitas. Igualmente não se verificaram diferenças de concentração relacionadas com o sexo.

Determinação da concentração dos NRTI por HPLC

Tabela VII – Concentração de TFV-DP e FTC-TP na primeira e na segunda colheitas

	Mediana	Mínimo	Máximo	P25	P75	n	p*
TFV-DP (fmol / 10 ⁶ cells) - 1ª colheita	135,2	31,0	493,0	87,4	233,6	31	0,347
TFV-DP (fmol / 10 ⁶ cells) - 2ª colheita	100,1	32,7	492,5	74,9	189,2	29	
FTC-TP (pmol / 10 ⁶ cells) - 1ª colheita	10,2	4,2	40,0	7,5	14,2	31	0,350
FTC-TP (pmol / 10 ⁶ cells) - 2ª colheita	9,3	4,1	27,1	6,2	11,2	28	

* Teste de Wilcoxon;

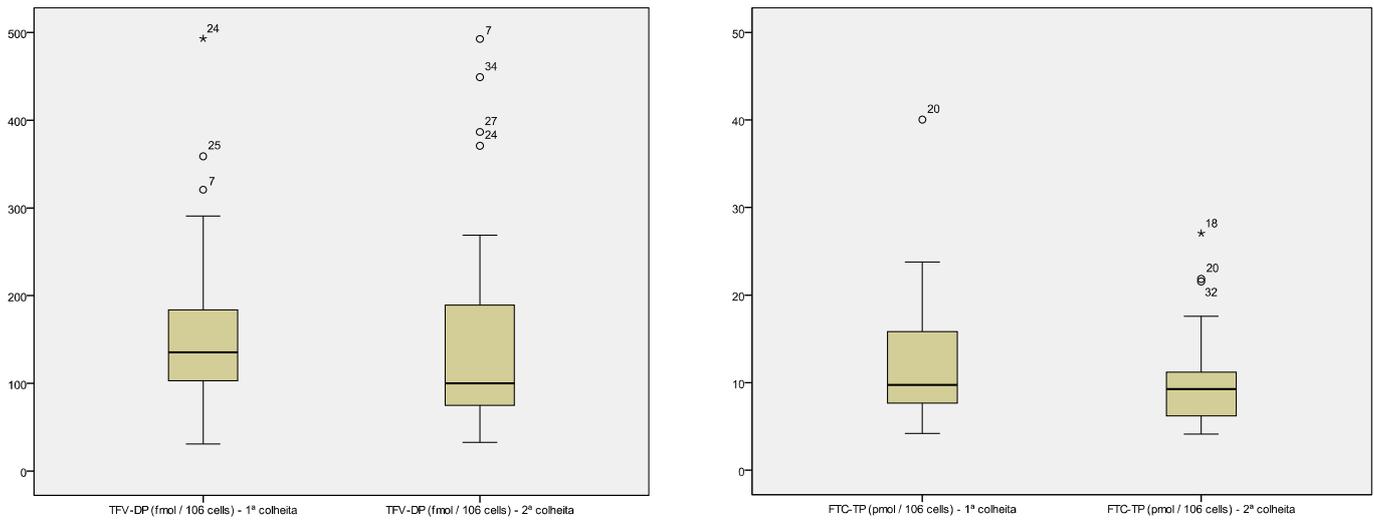


Gráfico 3 – Distribuição da concentração de TFV-DP e FTC-TP na primeira e segunda colheitas

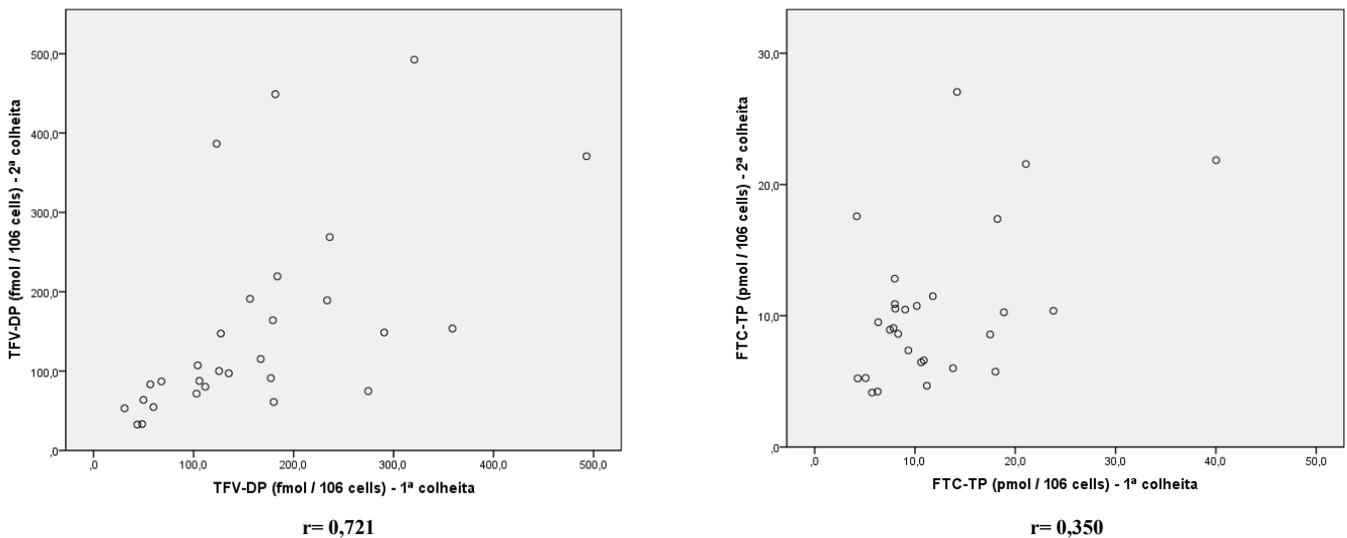


Gráfico 4 – Correlação entre as concentrações obtidas nas primeiras e segundas colheitas de ambos os fármacos

A distribuição da concentração de TFV-DP e FTC-TP (gráfico 3) nas duas colheitas localizou-se entre 6,2 e 14,2 pmol/10⁶ células e 74,9 e 233,6 fmol/10⁶ células respectivamente, em mais de 50% dos casos. A maioria das amostras apresentou concentrações de TFV-DP inferiores a 300 fmol/10⁶ células (excepto 7 amostras - *outliers*) e de FTC-TP inferiores a 25 pmol/10⁶ células (excepto 2 amostras - *outliers*).

Conforme se pode verificar no gráfico 4, regista-se correlação entre os valores da concentração nas primeiras e nas segundas colheitas em ambos os fármacos.

Tabela VIII – Concentração de TFV-DP e FTC-TP quando combinados ou separados

FTC e/ou TDF	n	TFV-DP (fmol/10 ⁶ cells)			FTC-TP (pmol/10 ⁶ cells)		
		Mediana	p*	p**	Mediana	p*	p**
FTC e TDF	31 (91,2%)	130,3	0,238	0,256	10,2	0,350	#
TDF	3 (8,8%)	180,2	0,593		#	#	

* Teste de Wilcoxon; ** Teste de Mann-Whitney U; # - não aplicável

Tabela IX – Concentração de TFV-DP e FTC-TP quando combinados com o RTV

RTV	n	TFV-DP (fmol/10 ⁶ cells)			FTC-TP (pmol/10 ⁶ cells)		
		Mediana	p*	p**	Mediana	p*	p**
Não	24 (70,6%)	131,2	0,931	0,794	9,3	0,627	0,673
Sim	10 (29,4%)	167,1	0,093		10,5	0,327	

* Teste de Wilcoxon; ** Teste de Mann-Whitney U

Tabela X – Concentração de TFV-DP e FTC-TP quando combinados com o EFV

EFV	n	TFV-DP (fmol/10 ⁶ cells)			FTC-TP (pmol/10 ⁶ cells)		
		Mediana	p*	p**	Mediana	p*	p**
Não	26 (76,5%)	156,4	0,263	0,443	10,2	0,305	0,718
Sim	8 (23,5%)	114,8	0,735		9,8	0,866	

* Teste de Wilcoxon; ** Teste de Mann-Whitney U

Determinação da concentração dos NRTI por HPLC

Tabela XI – Concentração de TFV-DP e FTC-TP quando combinados com o AZT

AZT	n	TFV-DP (fmol/10 ⁶ cells)			FTC-TP (pmol/10 ⁶ cells)		
		Mediana	p*	p**	Mediana	p*	p**
Não	24 (70,6%)	130,3	0,249	0,925	10,2	0,291	0,369
Sim	10 (29,4%)	167,1	0,735		8,3	0,917	

* Teste de Wilcoxon; ** Teste de Mann-Whitney U

Tabela XII – Concentração de TFV-DP e FTC-TP quando combinados com o LPV

LPV	n	TFV-DP (fmol/10 ⁶ cells)			FTC-TP (pmol/10 ⁶ cells)		
		Mediana	p*	p**	Mediana	p*	p**
Não	23 (67,6%)	140,9	0,647	0,710	10,2	0,737	0,470
Sim	11 (32,4%)	135,2	0,374		10,3	0,208	

* Teste de Wilcoxon; ** Teste de Mann-Whitney U

Relativamente ao tratamento com NRTI, 31 doentes (91,2%) estavam a tomar Truvada™ (FTC + TDF) e 3 doentes (8,8%) a tomar Viread® (TDF), combinados com outros anti-retrovíricos, dos quais os mais expressivos o LPV (32,4%), o RTV (29,4%), o AZT (29,4%) e o EFV (23,5%).

Não se registaram diferenças estatisticamente significativas nas concentrações de TFV-DP e FTC-TP entre as primeiras e as segundas colheitas nem com quaisquer associações anti-retrovíricas analisadas.

Tabela XIII – parâmetros relativos à colheita e respectivas amostras

	Mediana	Mínimo	Máximo	P25	P75	n
Horas (toma à colheita) - 1ª colheita	17,5	9,0	27,3	13,4	24,0	34
Horas (toma à colheita) - 2ª colheita	20,0	9,3	38,0	13,0	24,0	31
Nº dias (da 1ª à 2ª colheita)	7	3	20	7	8	31
Nº células x 10 ⁶ - 1ª colheita	10,2	1,8	27,3	8,1	15,2	34
Nº células x 10 ⁶ - 2ª colheita	12,2	2,1	27,0	9,0	18,5	31

Tabela XIV – Concentração de TFV-DP e FTC-TP em função do tempo decorrido desde a última toma à colheita

Nº horas (da toma à colheita)	n	TFV-DP (fmol/10 ⁶ cells)				FTC-TP (pmol/10 ⁶ cells)	
		Mediana 1ª colheita	Mediana 2ª colheita	p*** 1ª colheita	p*** 2ª colheita	Mediana	p***
<12	6 (17,6%)	123,4	97,3			10,7	
12_24	21 (61,8%)	124,2	89,4	0,031	0,048	9,0	0,536
>24	7 (20,6%)	250,3	280,0			9,8	

*** teste de Kruskal-Wallis

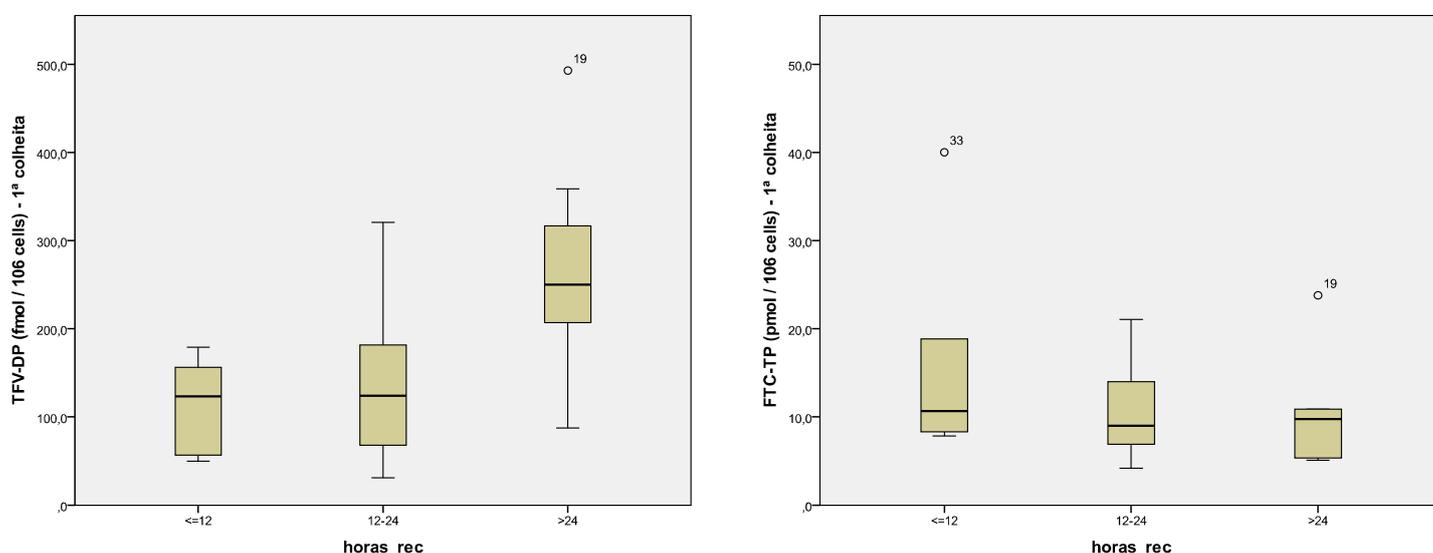


Gráfico 5 – Distribuição da concentração de TFV-DP e FTC-TP em função do tempo decorrido desde a última toma à colheita

O tempo decorrido desde a última toma à colheita resultou numa mediana de 17h50 (o mínimo 9h e o máximo 38h).

Não se registaram diferenças estatisticamente significativas nas concentrações de TFV-DP e FTC-TP entre as primeiras e as segundas colheitas, mas observaram-se diferenças estatisticamente significativas nas concentrações de TFV-DP relacionadas com o tempo decorrido entre a última toma e a colheita, tendo-se registado um aumento

estatisticamente significativo da concentração ($p=0,031$) em períodos superiores a 24h. O mesmo não se verificou com o FTC-TP (tabela XIV).

Tabela XV – Concentração de TFV-DP e FTC-TP em função da hora da toma dos mesmos

Hora da toma	n	TFV-DP (fmol/10 ⁶ cells)					FTC-TP (pmol/10 ⁶ cells)		
		Mediana 1 ^a colheita	Mediana 2 ^a colheita	p*	p** 1 ^a colheita	p** 2 ^a colheita	Mediana	p*	p**
Noite	19 (56%)	105,8	87,7	0,653	0,003	0,042	10,6	0,711	0,394
Dia	15 (44%)	208,7	151,2	0,347			9,2	0,285	

* Teste de Wilcoxon; ** Teste de Mann-Whitney U

Estes dados revelam uma tendência dos doentes para tomarem a sua medicação à noite (56%).

Não se registaram diferenças estatisticamente significativas nas concentrações de ambos os fármacos entre a primeira e a segunda colheitas. E observou-se um aumento estatisticamente significativo da concentração de TFV-DP ($p=0,003$) quando tomado durante o dia. O mesmo não se verificou com o FTC-TP (tabela XV).

XVI – Concentração de TFV-DP e FTC-TP em função do nº de dias que separa a 1^a da 2^a colheita

Nº dias (da 1 ^a à 2 ^a colheita)	n	TFV-DP (fmol/10 ⁶ cells)			FTC-TP (pmol/10 ⁶ cells)		
		Mediana	p*	p**	Mediana	p*	p**
3 a 7	23 (74,2%)	127,1	0,230	0,733	9,3	0,543	0,894
8 a 20	8 (25,8%)	145,8	0,889		10,2	0,499	

* Teste de Wilcoxon; ** Teste de Mann-Whitney U

A mediana do tempo decorrido entre a 1^a e a 2^a colheita foi de 7 dias (o mínimo 3 dias e o máximo 20).

Apesar da distância entre a 1ª e a 2ª colheita não se registaram diferenças estatisticamente significativas nas concentrações de TFV-DP e FTC-TP entre a primeira e a segunda colheitas, nem entre doentes agrupados por diferentes intervalos de dias (que separa a 1ª da 2ª colheita).

Tabela XVII – Concentração de TFV-DP e FTC-TP em função do nº de células (PBMC)

Nº células x 10 ⁶	n	TFV-DP (fmol/10 ⁶ cells)		FTC-TP (pmol/10 ⁶ cells)	
		Mediana	p***	Mediana	p***
<8	8 (23,5%)	241,9	0,150	10,5	0,564
8_15	17 (50%)	117,3		10,6	
>15	9 (26,5%)	180,2		8,7	

*** teste de Kruskal-Wallis

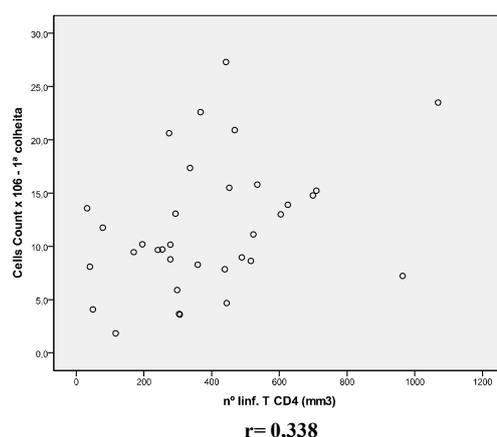


Gráfico 6 – Correlação do nº células (PBMC) extraídas com o nº de linfócitos do doente

A correlação encontrada é positiva, o que significa que quanto maior o nº de células extraídas maior o número de linfócitos, mas é uma correlação fraca ($r = 0,338$), não havendo portanto uma relação tão directa de uma variável com a outra.

Também não se registaram diferenças estatisticamente significativas nas concentrações de TFV-DP e FTC-TP em doentes com diferente nº de células (PBMC).

Tabela XVIII – Parâmetros de avaliação da infecção pelo HIV-1

	Mediana	Mínimo	Máximo	P25	P75	n
Nº linf. T CD4 ⁺ (mm ³)	348	32	1069	254	516	34
Virémia (cópias/ml)	238	54	1420	63	492	13

Tabela XIX – Concentração de TFV-DP e FTC-TP em função do nº linfócitos T CD4⁺

Nº linf. T CD4 ⁺ (mm ³)	n	TFV-DP (fmol/10 ⁶ cells)			FTC-TP (pmol/10 ⁶ cells)		
		Mediana	p*	p***	Mediana	p*	p***
<350	17 (50%)	178,3	0,551	0,311	11,2	0,397	0,531
350-500	8 (23,5%)	153,6	0,917		8,7	0,463	
>500	9 (26,5%)	111,7	0,594		9,3	0,263	

* Teste de Wilcoxon; *** teste de Kruskal-Wallis

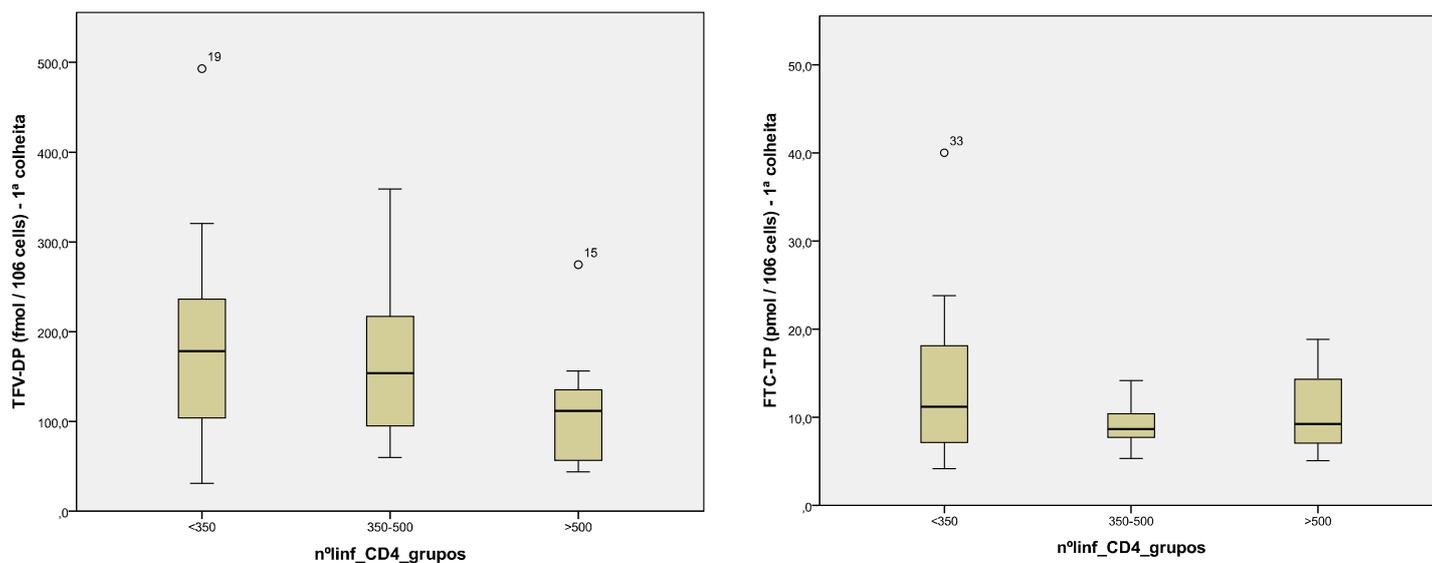


Gráfico 7 – Distribuição da concentração de TFV-DP e FTC-TP em função do nº de linfócitos T CD4⁺

O nº de linfócitos T CD4⁺ dos doentes em estudo variou entre 32/mm³ e 1069/mm³, apresentando uma mediana de 348/mm³.

Não se registaram diferenças estatisticamente significativas nas concentrações de TFV-DP e FTC-TP entre a primeira e a segunda colheitas, nem entre os doentes com

diferente nº de linfócitos T CD4⁺, contudo no gráfico 7 verifica-se tendência para uma descida da concentração de TFV-DP com o aumento do nº de linfócitos T CD4⁺.

Tabela XX – Concentração de TFV-DP e FTC-TP em função da virémia do HIV-1

virémia (qualitativo)	n	TFV-DP (fmol/10 ⁶ cells)			FTC-TP (pmol/10 ⁶ cells)		
		Mediana	p*	p**	Mediana	p*	p**
Não detectado	21 (61,8%)	135,2	0,149	0,839	10,6	0,157	0,422
Detectado	13 (38,2%)	147,1	0,754		8,2	0,445	

* Teste de Wilcoxon; ** Teste de Mann-Whitney U

Em 13 dos 34 doentes estudados (38.2%) foram detectadas virémias (de 54 cópias/ml a 1420 cópias/ml).

Não houve diferenças estatisticamente significativas nas concentrações de TFV-DP e FTC-TP entre a primeira e a segunda colheitas, nem entre os doentes com diferentes virémias do HIV-1.

Tabela XXI – Concentração de TFV-DP e FTC-TP em função do subtipo do HIV-1

Subtipo	n	TFV-DP (fmol/10 ⁶ cells)			FTC-TP (pmol/10 ⁶ cells)		
		Mediana	p*	p***	Mediana	p*	p***
B/B	9 (53%)	117,5	0,401	0,779	8,5	0,889	0,673
G/G	6 (35%)	177,3	0,686		10,9	0,686	
CRF20_BG	2 (12%)	150,0	0,317		6,8	0,317	

* Teste de Wilcoxon; *** teste de Kruskal-Wallis

Em 17 doentes (50%) a quem foi determinado o subtipo do HIV-1, verificou-se que:

- 9 doentes (53%) estavam infectados com o subtipo B/B, 6 doentes (35%) com o subtipo G/G e 2 doentes (12%) com uma forma recombinante (CRF20_BG).

- não houve diferenças, estatisticamente significativas, nas concentrações de TFV-DP e FTC-TP entre a primeira e a segunda colheitas, nem entre os diversos subtipos do HIV-1.

Tabela XXII – Concentração de TFV-DP e FTC-TP em doentes com e sem co-infecção

Co-infecção	n	TFV-DP (fmol/10 ⁶ cells)			FTC-TP (pmol/10 ⁶ cells)		
		Mediana	p*	p**	Mediana	p*	p**
Não	17 (50%)	156,4	0,363	0,429	9,3	0,717	0,751
Sim	17 (50%)	116,4	0,975		10,5	0,272	

* Teste de Wilcoxon; ** Teste de Mann-Whitney U

Na população estudada, dezassete doentes (50%) estavam co-infectados pelo HBV e/ou HCV.

Não se evidenciaram diferenças estatisticamente significativas nas concentrações de TFV-DP e FTC-TP entre a primeira e a segunda colheitas, nem entre os doentes com e sem co-infecção.

Com o presente estudo experimental pretendia-se determinar as concentrações intracelular e plasmática do TDF e FTC (NRTI) por HPLC em doentes infectados pelo HIV-1 a fazer tratamento com TruvadaTM ou Viread[®] e assim permitir correlacioná-las com o efeito terapêutico. Contudo, não nos foi possível apresentar resultados das concentrações plasmáticas por dificuldades encontradas na optimização da metodologia. Uma explicação possível dever-se-á ao facto de termos utilizado o mesmo tubo de colheita para as duas determinações, uma vez que na bibliografia consultada, não há referência à utilização de tubos de separação celular (CPT) nas determinações plasmáticas. Serão necessários estudos posteriores para esclarecer as dificuldades acima referidas.

Dos resultados acima apresentados conclui-se que a concentração intracelular de TFV-DP e FTC-TP não revelou ser dependente de factores como:

- idade, sexo, algumas combinações terapêuticas, nº de dias que separaram a 1ª da 2ª colheita, nº de células (PBMC) extraídas (metodologia aplicada), parâmetros de avaliação da infecção (nº de linfócitos T CD4⁺ e virémia do HIV-1) e parâmetros virológicos (subtipos do HIV-1 e doentes com e sem co-infecção).

Por sua vez encontraram-se diferenças estatisticamente significativas para:

- as concentrações de FTC-TP a partir dos 80kg (p=0,01),
- as concentrações de TFV-DP em função dos tempos decorridos entre as últimas tomas e as colheitas, para valores superiores a 24h (p=0,031),
- as concentrações de TFV-DP dependendo da toma ser de dia ou de noite (p=0,003).

Relativamente à **idade**, segundo o documento Infecção VIH/SIDA (2009) a média dos doentes infectados em Portugal tem vindo a aumentar de forma gradual. Desse documento, foi determinada a percentagem referente aos doentes com idades compreendidas entre os 30 e os 69 foi de 71,5%, com a seguinte distribuição: 30 - 39 anos (38,1%); 40-49 anos (19,1%); 50 ->65 anos (14,3%). Dados que diferem dos do presente estudo no que toca aos valores referentes à quarta e quinta década de vida.

Inicialmente pensava-se que a infecção HIV estava ligada à homossexualidade e à toxicodpendência no **sexo** masculino, contudo ao longo dos anos verificamos que a doença pode afectar seja quem for independentemente do sexo, idade, ou classe social.

Relativamente à distribuição das mortes por categorias de infecção, em Portugal até Dezembro de 2008 (Infecção VIH/SIDA, 2009), a transmissão por via sexual foi a dominante na mulher com 47% seguida, por escassa diferença, da toxicod dependência com 45%. No sexo masculino a toxicod dependência é o comportamento de risco mais prevalente com 51% seguida da transmissão sexual (heterossexual e homo ou bissexual) com 41%.

Em Portugal, até Dezembro de 2008 (Infecção VIH/SIDA, 2009), 81,7% dos infectados são do sexo masculino, e só 18,3% do sexo feminino, distribuição muito semelhante à encontrada neste estudo (17,6% do sexo feminino e 82,4% do sexo masculino).

Ao nível do **tratamento anti-retrovírico** recomenda-se que o esquema inicial seja composto por 3 fármacos: 2 NRTI, associados a um NNRTI ou a um IP (potenciado por ritonavir). Neste estudo em que foram seleccionados doentes infectados pelo HIV-1 a fazer tratamento com TruvadaTM ou Viread[®] por um período mínimo de 1 mês, encontramos 91,2% dos doentes a tomar TruvadaTM (FTC + TDF) e 8,8% a tomar Viread[®] (TDF) combinado com:

- LPV (32.4%) – IP (NRTI + IP)
- RTV (29.4%) – IP (NRTI + IP)
- AZT (29.4%) – NRTI
- EFV (23.5%) – NNRTI (NRTI + NNRTI)

Dado que com as combinações terapêuticas usadas nos doentes em estudo, não resultaram diferenças ao nível da concentração intracelular de TDF e FTC, julgamos poder concluir que não se verificaram interacções medicamentosas.

Uma vez que a monitorização das concentrações terapêuticas usada não é uma metodologia IVD (*in vitro diagnostic*), não oferece garantias ao nível da padronização dos resultados e do controle de qualidade. Este facto, influencia a interpretação dos resultados e os custos associados, o que obriga a uma racionalização do seu uso. Não obstante, pode-se constatar que, no método usado, o **nº células (PBMC) extraídas** não está associado a diferenças nas concentrações dos fármacos usados e tem relação directa com o número de linfócitos. Além disso, todo o procedimento realizado no CEA-Saclay foi devidamente controlado (controlo interno, controlo externo e padrões).

A estabilidade observada nos valores da concentração em ambos os fármacos, traduz que não houve interferências de outros factores num dado **período de tempo** que separou a 1ª da 2ª colheita.

Relativamente aos parâmetros de avaliação da infecção analisados neste estudo (virémia do HIV-1 e nº de linfócitos T CD4⁺), as **virémias** apresentadas pelos doentes foram baixas (21 com virémias não detectáveis e 13 com virémias ≤ 1420 cóp./ml) o que indica eficácia do tratamento, tendo em conta que o seu principal objectivo visa a supressão para níveis não detectáveis e tão prolongada quanto possível da replicação viral, enquanto que o **nº de linfócitos T CD4⁺** foi muito variável (mínimo 32 e máximo 1069 /mm³) o que estará relacionado com as diferentes fases de progressão da doença.

Da análise genotípica para detecção de **mutações e subtipos** do HIV-1 não nos foi possível tirar conclusões acerca da influência de **mutações** anti-retrovíricas nas concentrações dos fármacos em estudo, dado o número restrito de doentes com resistência. Com efeito:

- só dois deles apresentaram resistência ao FTC e TDF, pelas seguintes mutações no gene da TR:

M41L, A62V, V75I, M194V, T215C, K103N, V106A, F227L

A62V, D67N, K70R, Q151M, T215Y, K219E, G190A

- e três apresentaram resistência ao FTC (1 dos doentes já só fazia TDF), pelas seguintes mutações no gene da TR:

K70KR, M184MV, K219KQ, K103KN, K238KT

D67N, K70R, M184V, K219Q

M184I, Y181C

Face à escassez destes resultados não foi possível confirmar a relação entre a resistência aos fármacos e a elevada concentração intracelular dos mesmos.

No que toca aos **subtipos** do HIV-1, os resultados encontrados assemelham-se aos do Centro de Biologia Molecular do HSJ – Porto (já discriminados na introdução deste trabalho) não tendo sido detectada relação entre as concentrações intracelulares dos fármacos analisados e os diferentes subtipos.

A presença de **co-infecções** (HBV e/ou HCV) condiciona a selecção dos fármacos do esquema terapêutico anti-retrovírico e está associada a um maior risco de efeitos adversos dos medicamentos. Do seu tratamento concomitante com o da infecção HIV-1, podem decorrer interacções e conseqüente potenciação da toxicidade farmacológica. Não obstante no presente estudo não constatamos influências deste tipo.

Para o aumento da concentração de FTC-TP, estatisticamente significativo, registado nos doentes com **pesos** superiores a 80kg ($p=0,01$) não dispomos de dados que

nos permitam uma explicação segura deste achado, o qual não se verifica em pesos inferiores. Também não se encontrou na literatura qualquer referência a este respeito. É um tema que merece estudos complementares.

Com efeito, como mero exercício intelectual, pode aventar-se que o teor intracelular de nucleotídeos fisiológicos aumente em casos de obesidade. Nestas circunstâncias poder-se-ia suspeitar de uma possível competição entre os nucleotídeos fisiológicos e os análogos.

Em todo o caso na análise da relação da concentração com o peso não nos é possível ir além de mera especulação, tanto mais que a associação acima referida para pesos elevados com FTC, não se verificou com o TDF.

Tabela XXIII – Distribuição dos doentes atendendo à hora da toma da medicação e do tempo decorrido desde a última toma à 1ª colheita

Hora da toma	Nº horas (da toma à 1ª colheita)			Total
	<12	12-24	>24	
Noite	6	13	0	19
Dia	0	8	7	15
Total	6	21	7	34

Para a associação, aparentemente paradoxal, entre o aumento da concentração intracelular de TFV-DP e os **tempos** decorridos desde a última toma até à colheita, para valores superiores a 24h (p=0,031) não encontramos qualquer explicação lógica, tanto mais que o tempo de semi-vida intracelular do TFV-DP é inferior ao do FTC-TP para o qual não se registou o mesmo facto (ver anexo 4). Contudo, e de acordo com o observado na tabela XXIII, podemos relacionar este aumento da concentração de TFV-DP, quando o

tempo decorrido desde a última toma até à colheita é superior a 24h, com o facto da toma ser diurna.

Por sua vez, o aumento da concentração de TFV-DP dependente da **toma diurna** ($p=0,003$), poderá estar relacionado com o ciclo alimentar dos doentes ou com os factores que fazem diferir o modo de ingestão dos fármacos (o FTC pode ser ingerido com ou sem alimentos o TDF com alimentos), ou seja por razões de natureza metabólica.

Concluindo, aparte estas diferenças não explicadas, o presente estudo permitiu-nos constatar que os diferentes factores analisados não interferiram nas concentrações intracelulares dos fármacos utilizados.

Teria sido importante uma avaliação comparativa da concentração plasmática *versus* a intracelular. Contudo, parece-nos que a determinação intracelular seja mais fiável que a plasmática, atendendo a que a acção destes medicamentos se processa no interior da célula.

Capítulo 4

Conclusão

A infecção HIV configura uma doença crónica grave, cuja evolução pode durar de vários anos a décadas de vida, e constitui uma das principais causas de morte dos adultos a nível mundial. Pode ser causada por dois tipos de vírus - tipo 1 (HIV-1) e tipo 2 (HIV-2) - sendo a infecção pelo HIV-1 a mais grave e a mais difundida.

Apesar dos inúmeros estudos realizados ao longo das últimas três décadas, até ao momento não foi possível encontrar tratamento curativo, nem qualquer tipo de vacina. Os medicamentos usados têm logrado um assinalável prolongamento do tempo médio de vida dos doentes, além de atenuarem substancialmente os efeitos da infecção. Há, pelo menos, quatro classes de fármacos anti-retrovíricos disponíveis. Destes, os primeiros utilizados foram os inibidores da transcriptase reversa análogos dos nucleosídeos ou nucleotídeos (NRTI), os quais continuam a ser os mais usados, fazendo parte de todas as combinações terapêuticas actuais.

A monitorização da terapêutica anti-retrovírica implica a determinação das concentrações plasmática e/ou intracelular dos fármacos usados, prática que entre nós ainda não entrou na rotina clínica. Por este motivo propusemo-nos realizar o estudo da concentração intracelular de FTC-TP e TFV-DP, pertencentes à classe dos NRTI. A opção por estes dois fármacos deveu-se à disponibilidade do respectivo fornecedor. Não foi possível realizar a determinação plasmática dos mesmos por dificuldades técnicas inerentes à metodologia usada.

As concentrações intracelulares de TFV-DP e FTC-TP obtidas revelaram-se independentes da idade, do sexo, das combinações terapêuticas usadas, do número de dias decorridos entre a 1ª e a 2ª colheita, do número de células - PBMC, do número de linfócitos T CD4⁺, da virémia, dos subtipos do HIV-1 encontrados e da ocorrência ou não

de co-infecção. Verificou-se correlação entre as concentrações nas primeiras e segundas amostras de sangue dos doentes sob terapêutica.

Registou-se um aumento, estatisticamente significativo, das concentrações de FTC-TP para pesos a partir dos 80 kg. Também se registou aumento das concentrações de TFV-DP em função do tempo decorrido entre a última toma e a colheita (quando superior a 24h) e ainda em função da toma ser diurna.

Portanto, excluindo as diferenças referidas no último parágrafo, nenhum dos factores analisados interferiu nas concentrações intracelulares dos fármacos, as quais se revelaram estáveis.

Embora não nos tivesse sido possível comparar as concentrações intracelulares com as plasmáticas (por impossibilidade de determinar estas últimas) especulamos que a determinação intracelular seja mais fiável atendendo a que estes fármacos requerem fosforilação intracelular para iniciarem a sua actividade anti-vírica localizada, também ela, no interior da célula.

Não obstante, serão necessários mais estudos para uma melhor compreensão e interpretação dos resultados analíticos e respectivas margens terapêuticas, para que esta análise possa fazer parte integrante de uma abordagem clínica de monitorização terapêutica (TDM) permitindo alertar o médico para a necessidade de uma alteração da dose ou do regime terapêutico.

Referências bibliográficas

- Anderson P., Kakuda T., Lichtenstein K. (2004). The cellular pharmacology of nucleoside and nucleotide analogue reverse Transcriptase inhibitors and its relationship to clinical toxicities. *HIV/AIDS* 38: 743-751.
- Antunes F. (2004). Manual sobre SIDA. 2ª edição. P. Permanyer. Lisboa.
- Associação Portuguesa para o Estudo Clínico da SIDA (2000). Terapêutica Anti-Retrovírica da Infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (VIH). Portugal.
- Associação Portuguesa para o Estudo Clínico da SIDA (2001). Epidemiologia da Infecção por VIH - Passado e Futuro. Alentejo.
- Bahrami G., Mirzaeei S., Kiani A., Mohammadi B. (2005). High-performance liquid chromatographic determination of lamivudine in human serum using liquid-liquid extraction; application to pharmacokinetic studies. *Journal of chromatography B* 823: 213-217.
- Becher F., Pruvost A., Goujard C., et al (2002). Improved method for the simultaneous determination of d4T, 3TC and ddI intracellular phosphorylated anabolites in human peripheral-blood mononuclear cells using high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Communication Mass Spectrometry* 16: 555-565.
- Berger E., Murphy P., Farber J. (1999). Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease - Review. *Annu Rev Immunol* 17: 657-700.
- Brunton L., Lazo J., Parker K. (2006). Goodman and Gilman's – The pharmacological Basis of Therapeutics. 11th edition. McGraw-Hill. New York.

- Departamento de Doenças Infecciosas - Unidade de Referência e Vigilância Epidemiológica (2008). Infecção VIH/SIDA – A situação em Portugal. Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge.
- Ferrer S., Modamio P., Lastra C., Mariño E. (2004). Determination of abacavir in human plasma by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection and the analytical error function. *Biomedical Chromatography* 18: 862-865.
- Gorry P., Churchill M., Crowe S., et al (2005). Pathogenesis of macrophage tropic HIV-1 - Review. *Curr HIV Res* 3(1): 53-60.
- Guimarães S., Moura D., Soares da Silva P. (2006). Terapêutica medicamentosa e suas bases farmacológicas. 5ª edição. Porto Editora. Porto.
- Hess G.. Diagnosis and management of HIV infection. Roche Diagnostics GmbH. Germany.
- Hovden A., Sommerfelt M. (2002). The influence of CD4 and CXCR4 on maedi-visna virus-induced syncytium formation. *APMIS* 110(10): 697-708.
- Levinson W. (2004). *Medical Microbiology & Immunology: Examination & Board Review*. 8th edition. Mc Graw-Hill. USA.
- Lima N., Mota M. (2003). *Biotecnologia – Fundamentos e aplicações*. Lidel. Lisboa.
- Lodish H., Berk A., Matsudaira P., et al (2004). *Molecular Cell Biology*. 5ª edition. W. H. Freeman and company. New York.
- Murray R., Rosenthal S., Kobayashi S., Pfaller A. (2000). *Microbiologia Médica*. 3ª edição. Guanabara Koogans SA. Rio de Janeiro.

- Martins A.H., Monteiro F., Ferreira M., et al (2008). Prevalência dos Subtipo do Vírus da Imunodeficiência Humana Tipo 1 na região Norte de Portugal. Revista Portuguesa de Ciências Biomédicas 3: 82.
- Nettles R., Kieffer T., Parsons T., et al (2006). Marked Intraindividual Variability in Antiretroviral Concentrations May Limit the Utility of Therapeutic Drug Monitoring. Clinical Infectious Diseases 42:1189–96.
- Pèlerin H., Compain S., Duval X., et al (2005). Development of an assay method for the detection and quantification of protease and non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors in plasma and in peripheral blood mononuclear cells by liquid chromatography coupled with ultraviolet or tandem mass spectrometry detection. Journal of Chromatography B 819: 47-57.
- Poirier J., Robidou P., Jaillon P. (2005). Simple and simultaneous determination of the HIV-protease inhibitors amprenavir, atazanavir, indinavir, 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. Therapeutic Drug Monitoring 27(2): 186-192.
- Ruibal-Ares B., Belmonte L., Bare P., et al (2004). HIV-1 infection and chemokine receptor modulation - Review. Curr HIV Res 2(1): 39-50.
- Soriano V., Lahoz-González J. (2007). VI Curso de Biología Molecular para clínicos. P. Permanyer. Barcelona.
- Soriano V. (2005). Resistências a los antirretrovirales 2005. P. Permanyer. Barcelona.

Timbrell J. (2000). Principles of biochemical toxicology. 3rd Edition. Taylor & Francis Ltd. London.

UNAIDS (2009). AIDS Epidemic update. World Health Organization.

Vasconcelos C., Oliveira J., Casquilho J., et al (2009). Recomendações Portuguesas para o Tratamento da Infecção VIH/SIDA. Coordenação Nacional para a Infecção VIH/SIDA.

Verweij-van Wissen C., Aarnoutse R., Burger D. (2005). Simultaneous determination of the HIV nucleoside analogue reverse transcriptase inhibitors lamivudine, didanosine, stavudine, zidovudine and abacavir in human plasma by reversed phase high performance liquid chromatography. Journal of chromatography B 816: 121-129.

Anexos