

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE BIOCÊNCIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR**

**Jane Dagmar Pollo Renner**

**A influência dos polimorfismos do gene MDR1 na resposta virológica e imunológica no tratamento com Efavirenz durante os seis primeiros meses em pacientes HIV positivos**

**Porto Alegre  
Outubro, 2010**

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE BIOCÊNCIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR**

**A influência dos polimorfismos do gene MDR1 na resposta virológica e imunológica no tratamento com Efavirenz durante os seis primeiros meses em pacientes HIV positivos**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação em Biologia Celular e  
Molecular como requisito para a obtenção  
do grau de Doutor.**

**Autora  
Jane Dagmar Pollo Renner**

**Orientadora  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Virgínia Minghelli Schmitt**

**Porto Alegre  
Outubro, 2010**

## **AGRADECIMENTOS**

Eu quero agradecer a Deus por ter me dado mais uma chance de viver.

Quero agradecer ao meu filho Henrique e a meu marido Daniel por ter acreditado em mim nesta longa jornada.

Quero agradecer à minha família por nunca me deixar desistir.

Quero agradecer à minha orientadora Virgínia por ser uma excelente orientadora e acima de tudo uma amiga de verdade.

Quero agradecer a Professora Dra. Clarice Alho que me ajudou e acreditou no nosso trabalho.

Quero agradecer à minha grande amiga Andréia Rosane de Moura Valim que acreditou em mim quando eu nem sabia que eu seria Professora.

Quero agradecer a Lia Gonçalves Possuelo por sua amizade e por tudo que eu aprendi ao seu lado.

Quero agradecer à UNISC, ao Reitor, ao Setor de Recursos Humanos, às Faculdades de Farmácia e Medicina por acreditarem na minha recuperação.

Quero agradecer o Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular e Celular da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS) por ter me dado essa oportunidade.

Quero agradecer aos meus alunos queridos que me apoiaram e me deram muita força para eu recuperar a minha voz.

## RESUMO

Os transportadores de drogas são cada vez mais reconhecidos como importantes na disposição das drogas e na resposta terapêutica. A P-glicoproteína é um transportador, codificado pelo gene humano *MDR1* (ABCB1), de grande relevância clínica, pois apresenta ampla especificidade de substrato, incluindo uma variedade de drogas com diferentes estruturas atualmente em uso clínico. Efavirenz é substrato para a glicoproteína-P e é metabolizado pelo Citocromo P-450 (CYP) 2B6. No presente estudo, foi investigada, de forma prospectiva, a influência do genótipo para os diferentes polimorfismos do *MDR1* (1236C>T, 2677G>T, 3435C>T) sobre a resposta imunológica e virológica ao tratamento de pacientes infectados pelo HIV, sem tratamento prévio. O genótipo *MDR1* foi analisado em 81 pacientes do Centro Municipal de Atendimento à Sorologia (CEMAS), em Santa Cruz do Sul (RS, Brasil), que iniciaram terapia antiretroviral entre 2009 e 2010. Os dados foram obtidos ao início do tratamento e nas semanas 12 e 24 após o início da terapia. Os genótipos *MDR1* de cada indivíduo foram determinados com a utilização de reação em cadeia da polimerase, seguida de análise dos fragmentos de restrição (PCR-RFLP). Durante as primeiras semanas de terapia antiretroviral, o padrão de diminuição da carga viral foi similar para todos os pacientes após 12 e 24 semanas de tratamento com Efavirenz. A redução da carga viral em 12 e 24 semanas não se mostrou associada aos genótipos dos polimorfismos 1236C>T, 2677G>T e 3435C>T do gene *MDR1*. O padrão do aumento das células T CD4<sup>+</sup> foi similar para todos os pacientes após 12 e 24 semanas de tratamento com Efavirenz. O aumento no número de células T CD4<sup>+</sup> foi significativamente associado à presença do alelo 3435T, sendo mais elevado nos homozigotos 3435TT, intermediário em 3435CT e menos elevado em 3435CC em contrapartida, não se mostrou associado aos genótipos dos polimorfismos 1236C>T e 2677G>T do gene *MDR1*. A resposta individual ao tratamento antiretroviral é um fenômeno complexo que é influenciado por um grande número de variáveis biológicas. Novos estudos sobre o papel dos polimorfismos do transportador *MDR1* e enzimas envolvidas no metabolismo de drogas são necessários para elucidar o papel dos efeitos farmacogenéticos na terapêutica para o HIV.

**Palavras chaves:** *MDR1*, polimorfismos, tratamento antiretroviral

## ABSTRACT

Drug transporters are increasingly recognized to be important on drug disposition and therapeutic response. P-glycoprotein, encoded by the human *MDR1* (*ABCB1*) gene, is of particular clinical relevance in that this transporter has broad substrate specificity, including a variety of structurally divergent drugs in clinical use today. Efavirenz is a substrate for P-glycoprotein and is metabolized by cytochrome P-450 (CYP) 2B6. In this prospective study, we investigated the influence of the *MDR1* genotype polymorphisms (1236C>T, 2677G>T, 3435C>T) in the virological and immunological response to treatment of naïve HIV-infected patients. *MDR1* genotype was analyzed in 81 patients attending the Municipal Center for Serology Assistance (CEMAS) in Santa Cruz do Sul, RS, Brazil) who started antiretroviral therapy between 2009 and 2010. Data were obtained at baseline and week 12 and 24 post therapy initiation. *MDR1* genotypes were determined by means of polymerase chain reaction followed by analysis of restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). During the first weeks of antiretroviral therapy, the pattern of decrease in viral load was similar for all patients after 12 and 24 weeks of treatment with efavirenz. The reduction in viral load at 12 and 24 weeks was not associated with the genotypes of the polymorphisms 1236C> T, 2677G> T and 3435C> T *MDR1* gene. The pattern of increased CD4 + T cells was similar for all patients after 12 and 24 weeks of treatment with efavirenz. The increase in the number of CD4 + T cells was significantly associated with allele 3435T, and are higher in homozygous 3435TT, intermediate in 3435CT and lower in 3435CC however, was not associated with the genotypes of the polymorphisms 1236C> T and 2677G> T *MDR1* gene. Individual response to antiretroviral treatment is a complex phenomenon that is influenced by a large number of biological variables. Further studies on the role of polymorphisms of *MDR1* transporter and enzymes involved in drug metabolism are needed to elucidate the role of pharmacogenetic effects in HIV therapy.

**Keywords:** MRD1, Polymorphism, antiretroviral therapy

## LISTA DE ABREVIATURAS

3TC: Lamivudina

ABC: Abacavir

AIDS: Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

APV: Amprenavir

ARV: Antiretroviral

ATV: Atazanavir

AZT: Zidovudina

CCR5: Receptor de quimiocina

CYP (*Cytochrome P450 enzymes*) Citocromo P450

d4T: Estavudina

DdC: Zalcitabina

Ddl: Didanosina

DLV: Delavirdina

DNA: Ácido desoxirribonucleico

EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético

EFV: Efavirenz

HAART: Terapia Antiretroviral Potente

HIV: Vírus da Imunodeficiência Humana

IDV: Indinavir

ITRN: Inibidor da Transcriptase reversa análogos de nucleosídeos

ITRNN: Inibidor da Transcriptase reversa não análoga de nucleosídeos

IP: Inibidor de protease

LD (*Linkage Disequilibrium*): desequilíbrio de ligação

LPV/r: Lopinavir/r

µL: microlitro

mL: mililitro

MS: Ministério da Saúde

MTD: Monitorização terapêutica de fármacos

NFV: Nelfinavir

NVP: Nevirapina

OMS: Organização Mundial da Saúde

PCR: Reação da polimerase e cadeia

P-gp: Glicoproteína-P

*Primer*: Iniciadores

RAM: reações adversas aos medicamentos

RFLP: Análise de restrição de fragmentos polimórficos

RTV: Ritonavir

*SNPs (Single-Nucleotide Polymorphisms)*: polimorfismos de um único nucleotídeo

SQV: Saquinavir

SVS: Secretaria de vigilância sanitária

T CD4: Células T CD4

TDF: Tenofovir

UNAIDS: Programa das Nações Unidas da AIDS/HIV

## LISTA DE TABELAS E FIGURAS

<b>Tabela 1:</b> Variantes farmacogenéticas associadas com resposta terapêutica a Efavirenz em pacientes HIV positivos .....	14
<b>Tabela 2:</b> Principais fármacos licenciados em cada classe de antiretrovirais...	22
<b>Tabela 3:</b> Efeito do polimorfismo do gene MDR-1 sobre a evolução da infecção pelo HIV. Estudos em pacientes.....	41
<b>Figura 1.</b> Arranjo de proteínas transmembrana de efluxo ABC.....	31
<b>Figura 2.</b> Função da P-glicoproteína (P-gp). Este modelo mostra que o transporte de efluxo P-gp-mediada por substratos de drogas pode ocorrer ao nível da membrana do plasma ou do compartimento intracelular. ATP, adenosina trifosfato; ADP, adenosina difosfato; Pi, fosfato inorgânico.....	32
<b>Figura 3:</b> Esquema da proteína codificada pelo gene mostrando a localização dos SNPs.....	35



## SUMÁRIO

CAPÍTULO 1- INTRODUÇÃO E OBJETIVOS .....	10
1.1 INTRODUÇÃO .....	11
1.1.1 Epidemiologia de HIV .....	17
1.1.2 Tratamento antiretroviral .....	20
1.1.3 Avaliação da resposta terapêutica .....	26
1.1. 4 Efavirenz .....	27
1.4.1 Monitorização terapêutica de efavirenz .....	28
1.5 Efavirenz e Farmacogenética .....	29
1.2 OBJETIVOS.....	44
1.2.1 Objetivo Geral .....	44
1.2.2 Objetivos Específicos .....	44
1.3 HIPÓTESE .....	45
CAPÍTULO 2 - ARTIGO .....	46
CAPÍTULO 3 - CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÃO .....	61
3.1 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	62
3.2 CONCLUSÕES .....	67
REFERÊNCIAS .....	68
APÊNDICES.....	79
ANEXOS.....	85

## **CAPÍTULO 1**

### **INTRODUÇÃO E OBJETIVOS**

## 1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, o conceito de que variações no genoma humano são determinantes importantes que influenciam na susceptibilidade a doenças infecciosas vem se consolidando, sendo responsáveis pela grande variação interindividual na resposta imune do hospedeiro após infecções, bem como na resposta terapêutica a diferentes fármacos (HASS, 2005). A existência de grandes diferenças populacionais, bem como de pequenas variabilidades intrínsecas ao paciente, é consistente com a possibilidade de a herança genética ser um determinante na resposta aos fármacos. Estima-se que fatores genéticos sejam responsáveis por 20 a 95% da variabilidade na biodisponibilidade e efeitos terapêuticos dos fármacos (EVANS, 2003). Embora muitos fatores não genéticos possam influenciar as reações adversas aos medicamentos (RAM), tais como idade, etnia, capacidade funcional de órgãos (fígado e rins principalmente), terapia concomitante, interações medicamentosas, e a natureza da doença. Existem agora numerosos exemplos de casos nos quais diferenças individuais na resposta ao fármaco (eficácia e toxicidade) ocorrem devido a polimorfismos de genes que codificam enzimas responsáveis pela biotransformação do fármaco, transportadores, e/ou polimorfismos nos próprios alvos do fármaco (receptores e enzimas) (EVANS, 1999; WILSON, 2001; EVANS, 2003). A identificação de genes que influenciam nas variações interindividuais, na eficácia ou toxicidade de agentes terapêuticos, e a aplicação desta informação na prática clínica tem sido o alvo de estudos de farmacogenômica ou farmacogenética (EVANS, 2003).

Os genes são considerados funcionalmente “polimórficos” quando existem variantes alélicas de forma estável na população, alterando a atividade da proteína codificada em relação à seqüência do tipo-selvagem (GOLSTEIN et al., 2003).

Em alguns casos, o polimorfismo genético está associado à atividade reduzida da proteína codificada, mas existem também estudos demonstrando que a variante alélica codifica proteínas com atividade melhorada. Desde a clonagem e caracterização de CYP2D6 (debrisoquina hidroxilase), outros genes humanos envolvidos em alguns traços farmacogenéticos estão sendo isolados e seus mecanismos moleculares elucidados, permitindo que a sua importância clínica seja mais claramente definida (GOLSTEIN et al., 2003).

Diferentes capacidades de metabolização de fármacos são geralmente traços monogênicos herdados e a influência na farmacocinética e na ação farmacológica dos medicamentos está associada à velocidade de metabolização dos substratos. Os efeitos observados podem ser de toxicidade, no caso de medicações que tenham limitado índice terapêutico e são inativados por uma enzima polimórfica com menor atividade, ou de reduzida eficácia no caso de medicamentos que requerem ativação por uma enzima que apresente um polimorfismo genético que afete negativamente a sua atividade (EVANS, 1999).

Em geral, dois tipos de alterações genéticas são descritas: polimorfismos e mutações. Mutações são geralmente definidas como alterações no DNA (ácido desoxirribonucléico) que estão associadas à dano celular, ocorrendo numa frequência baixa na população (geralmente menos de 1%). Polimorfismos, por outro lado, são variantes genéticas mais frequentes, geralmente mais de 1% da população estudada. A maioria dos polimorfismos ocorre em nucleotídeos individuais, sendo chamados de polimorfismos de um único nucleotídeo (do inglês *Single Nucleotide Polymorphisms* - SNPs). Outros polimorfismos ocorrem como repetições de

dinucleotídeos ou como grandes inserções ou deleções. Estes polimorfismos podem ocorrer na região codificante dos genes, podendo ou não alterar o aminoácido codificado, ou nas regiões não codificantes, podendo modular a expressão de genes individuais (WEINSHILBOUM, 2003).

Mais de 1,4 milhão de SNPs foram identificados no seqüenciamento inicial do genoma humano, dos quais aproximadamente 60.000 se localizam em regiões codificantes. Muitos destes SNPs têm sido estudados visando à sua associação com alterações no metabolismo, com resposta diferenciada a medicamentos, ou utilizados como indicadores prognósticos da resposta clínica. Na Tabela 1, estão apresentadas diferentes variantes genéticas que têm sido significativamente associadas com respostas terapêuticas a Efavirenz em indivíduos HIV positivos.

**Tabela 1:** Variantes farmacogenéticas associadas com resposta terapêutica a Efavirenz em pacientes HIV positivos.

Referencias	CYP2B6		CYP2D6	CYP3A4	CYP3A5	MDR1	MDR1
	516G>T	983C>T	*3, *4, *6	*1B/(392 <sup>a</sup> >G)	*1 / (6986 <sup>a</sup> >G)	3435C>T	2677G>T
Haas et al. (2004)	TT: altas concentrações plasmáticas, Toxicidade do SNC em 1 semana	Não feito	Não feito	GG: altas concentrações plasmáticas, (Alguns sujeitos)	GG: altas concentrações plasmáticas, (Alguns sujeitos)	Nenhuma associação com níveis plasmáticos	Nenhuma associação com níveis plasmáticos
Tsuchiya et al. (2004)	TT: altas concentrações plasmáticas	Não feito	Não feito	Não feito	Não feito	Nenhuma associação com níveis plasmáticos	Não feito
Rotger et al. (2005a)	TT: altas concentrações plasmáticas e toxicidade neuropsicológica	Não feito	Não feito	Não feito	Não feito	Não feito	Não feito
Haas et al. (2005)	TT: altas concentrações plasmáticas. Nenhuma influencia na contagem de CD4 e na carga viral	Não feito	Nenhuma associação com níveis plasmáticos	Nenhuma associação com níveis plasmáticos	Nenhuma associação com níveis plasmáticos	Nenhuma associação com níveis plasmáticos. Resposta virológica favorável	Nenhuma associação com níveis plasmáticos
Saitoh et al. (2006)	TT: altas concentrações plasmáticas. Nenhuma influencia na contagem de CD4 e na carga viral	Não feito	Não feito	Não feito	Não feito	Não feito	Não feito
Kwara et al. (2008)	TT: altas concentrações plasmáticas	CC: Nenhuma associação com níveis plasmáticos	Não feito	Não feito	Não feito	Não feito	Não feito
Wyen et al. (2008)	TT: altas concentrações plasmáticas	CC: altas concentrações plasmáticas	Não feito	Não feito	Não feito	Não feito	Não feito
Cabrera et al. (2009)	TT: altas concentrações plasmáticas	Não feito	Não feito	Nenhuma associação com níveis plasmáticos	Não feito	Nenhuma associação com níveis plasmáticos	Não feito

A partir do mapeamento genômico de SNPs, uma questão interessante para estudos genéticos seria a possibilidade de utilizar o desequilíbrio de ligação (*LD-Linkage Disequilibrium*) para identificar genes que possam estar associados a doenças. O LD descreve uma situação em que algumas combinações de alelos ou marcadores genéticos ocorrem mais ou menos frequentemente numa população do que seria esperado pela formação aleatória de haplótipos, com base na frequência dos alelos. Associações não-aleatórias entre polimorfismos em *loci* diferentes são medidos pelo grau de LD e podem refletir haplótipos descendentes de um único cromossomo ancestral (REICH, 2001). Os haplótipos são combinações particulares de alelos observados em uma população após o surgimento de uma nova mutação, sendo esta associação entre cada alelo mutante e o haplótipo ancestral rompida somente por uma mutação e recombinação em gerações subseqüentes (GABRIEL, 2002). A determinação do haplótipo pode ser utilizada como um poderoso sistema para encontrar variantes que influenciem na resposta aos fármacos, existindo uma forte evidência de que estas variantes comuns possam desempenhar um papel importante na variabilidade de resposta aos diferentes fármacos administrados (GOLDSTEIN, 2003).

Um dos mais conhecidos polimorfismos na resposta terapêutica em pacientes HIV positivos é o do gene *MDR1* (ou *ABCB1*) que codifica a glicoproteína P (P-gp). A P-gp é uma proteína de efluxo ATP-dependente. A P-gp foi apenas o primeiro membro identificado de uma grande e diversificada superfamília que compreende cerca de cinqüenta cassetes humanos ATP-dependente (ABC), com proteínas que desempenham funções múltiplas e variadas (CHAN LM, LOWES S, HIRST BH, 2004). De particular interesse nesta análise são os membros da família envolvidos no transporte das drogas, como as proteínas de efluxo de drogas MDR (resistência a múltiplas drogas), uma vez que estas proteínas podem ter um grande impacto na

biodisponibilidade da droga e na resistência à quimioterapia, bem como na homeostase fisiológica (OUDE ELFERINK RP, DE WAART R, 2007).

Os transportadores de drogas tendem a ser super-expressos em tumores, mas estão em níveis normais em muitos tecidos, sobretudo em locais excretores como o fígado, rins e intestino, onde eles fornecem uma barreira contra a penetração da droga, ao propiciar um mecanismo para a sua eliminação. O arsenal de transportadores ABC envolvidos no efluxo de drogas é apoiado pela metabolização de drogas por enzimas que modificam a produção dos metabólitos destas drogas, que são eles próprios substratos para estes transportadores. Assim, um relacionamento sinérgico existe dentro de tecidos excretores ao proteger o corpo contra a invasão por compostos estranhos (CHAN LM, LOWES S, HIRST BH, 2004).

Apesar dos transportadores ABC serem diferencialmente expressos em determinados locais do corpo, sua expressão não acontece de forma estática, os tecidos têm uma notável capacidade de regular as quantidades de transportadores da membrana, tanto ao nível de transcrição como na pós-transcrição, a fim de atingir a homeostase (CHAN LM, LOWES S, HIRST BH, 2004; OUDE ELFERINK RP, DE WAART R, 2007).

Efavirenz (EFV) é um inibidor da transcriptase reversa não-nucleosídeo que tem demonstrado eficácia e segurança adequadas no tratamento da infecção pelo vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1). Por conseguinte é frequentemente usado na terapia antiretroviral potente (HAART) implementada para pacientes virgens e não virgens de tratamento que tipicamente fornece uma redução da carga viral e benefícios imunológicos (GULICK et al., 2004; GALLANT et al., 2006; RIDDLE et al., 2008). O efavirenz é metabolizado principalmente pelo citocromo P450 (CYP) 2B6 (WARD et al., 2003). Um freqüente polimorfismo não-sinônimo no exon 4 do *CYP2B6* (516G>T, rs3745274) prevê diminuição da depuração plasmática



de efavirenz e aumento no plasma no estado estacionário, como faz um menos freqüentes não-sinônimo exon 9 CYP2B6 polimorfismo 983T > C (Rs28399499) (HAAS et al., 2004; HAAS et al., 2005; ROTGER et al., 2005; WANG et al., 2006; ROTGER et al., 2007).

## 1.1 Epidemiologia do HIV

A Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (*Acquired Immunodeficiency Syndrome* - AIDS) foi reconhecida oficialmente como doença em 1981, pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) em função de uma explosão de casos inexplicados de sarcoma de Kaposi e de pneumonia por *Pneumocystis jiroveci* em homossexuais masculinos em diversas cidades dos Estados Unidos (RACHID & SCHECHTER, 2001). A epidemia de AIDS no Brasil experimentou modificações profundas desde o seu início na década de 80. De característica regional e restrita a determinados segmentos populacionais, passou a ser uma epidemia de caráter nacional nos anos 90.

Dados da UNAIDS (*Joint United Nations Programm on HIV/AIDS*) divulgados em julho de 2009 estimam que 33,4 milhões de pessoas vivam com o vírus no mundo (UNAIDS, 2009). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), o Brasil se mantém entre os países com epidemia de AIDS, com prevalência da infecção pelo HIV de 0,61% entre a população de 15 a 49 anos (UNAIDS, 2009).

A América Latina é a região que ocupa a quarta posição em número de infectados no mundo, sendo o Brasil o país que possui o maior número de casos de AIDS nesta região, com 506.499 casos de AIDS de janeiro de 1980 até junho de 2008 (Boletim Epidemiológico da AIDS, 2009). No Brasil, a AIDS foi responsável por 205.409 óbitos de 1980 até junho de 2007, sendo as taxas de mortalidade crescentes até meados da década de 90, estabilizando em cerca de 11 mil óbitos

anuais desde 1998. Após a introdução da política de acesso universal ao tratamento antiretroviral (ARV), observou-se uma importante queda na mortalidade. A partir do ano 2000, essa taxa se estabilizou em cerca de 6,0 óbitos por 100 mil habitantes (Boletim Epidemiológico da AIDS, 2009).

As regiões Sul e Sudeste concentram 80% dos casos. Dados do Boletim Epidemiológico de AIDS (2009) do Programa Nacional de AIDS do Ministério da Saúde e da Secretaria Estadual de Saúde do Rio Grande do Sul mostram que o RS foi o terceiro estado com maior incidência de casos de AIDS de 1983 a 2008, com 46.299. O município de Porto Alegre é o terceiro município brasileiro e o primeiro do Estado com maior número de casos de AIDS notificados (Boletim Epidemiológico da AIDS, 2009). Em Santa Cruz do Sul, numa população de 116.000 habitantes, tem 650 infectados com HIV.

A abordagem clínica da infecção pelo HIV e de suas complicações é bastante complexa (MS/SVS, 2009). Com o advento da terapia antiretroviral potente (HAART), as manifestações clínicas decorrentes da infecção pelo HIV tornaram-se menos freqüentes e houve melhora substancial do prognóstico e da qualidade de vida dos indivíduos infectados. Todavia, a resistência viral, a toxicidade dos fármacos, os efeitos adversos e a necessidade de alta adesão ao tratamento permanecem como importantes barreiras ao sucesso prolongado das terapias (MS/SVS, 2009; MU et al., 2007).

No Brasil, dentre as estratégias para combater a epidemia destaca-se a política de distribuição dos medicamentos antiretrovirais aos portadores do HIV que necessitam de tratamento. Vários indicadores evidenciam o efeito positivo dessa política adotada no país: redução da mortalidade em aproximadamente 50%, redução do número de internações hospitalares, redução da incidência de infecções

oportunistas, redução da transmissão vertical, dentre outros (GUIMARÃES et al., 2008; MELCHIOR et al., 2008).

Os atuais esquemas terapêuticos são complexos, de difícil adesão e associados a reações adversas e interações medicamentosas (KING et al., 2002; MONTESSORI et al., 2004; KLIMAS et al., 2008; HAMMER et al., 2008). Atualmente, alguns estudos realizados em diversos países buscam aumentar a efetividade dos tratamentos disponíveis e incluem tentativas para entender melhor os efeitos adversos dos agentes antiretrovirais (HAMMER et al., 2008; MOLINA et al., 2008; MONTESSORI et al., 2004). Efeitos adversos dos antiretrovirais, muitos dos quais desconhecidos no passado, são cada vez mais freqüentes e, na maioria das vezes, são os principais responsáveis pela interrupção da terapia (HAMMER et al., 2008). Em estudo realizado por Borges, foi observado o desenvolvimento de efeitos adversos (ADR) em 75,4% dos pacientes estudados, sendo os principais tontura, cefaléia, diarreia, náusea e vômitos (Borges, 2005). O desenvolvimento de neuropatia, hepatotoxicidade, pancreatite, lipodistrofia, diabetes, dislipidemia, osteoporose e acidose láctica estão entre as complicações que podem piorar consideravelmente a qualidade de vida do indivíduo infectado pelo HIV recebendo HAART (MS/SVS, 2009).

O uso de potentes fármacos está geralmente associado com toxicidade e os fármacos antiretrovirais não são exceção. O aumento das enzimas hepáticas, descrito em muitos estudos como hepatotoxicidade, vem sendo reportada em muitos pacientes tratados com antiretrovirais (MENDES-CORREA et al., 2008; NUNES, 2006). No entanto, a prevalência destes casos e as suas causas não são ainda bem definidas (MENDES-CORREA et al., 2008; NUNES, 2006). Um mecanismo potencial de associação entre hepatotoxicidade e inibidores da protease (IP) é a alteração no

metabolismo, porque todos os IPs são metabolizados no fígado por várias enzimas pertencentes ao citocromo P450 (FLEXNER, 1998).

## **1.2 Tratamento Antiretroviral**

Desde o descobrimento do vírus HIV e do conhecimento da patogenia da AIDS, pesquisadores não mediram esforços relacionados ao desenvolvimento de novos fármacos e estratégias terapêuticas para o combate da doença (HAMMER, 2008; FLEXNER, 2007).

O principal objetivo da terapia antiretroviral é retardar a progressão da imunodeficiência e/ou restaurar, tanto quanto possível, a imunidade aumentando o tempo e a qualidade de vida da pessoa infectada (MS/SVS, 2009). Contudo, a evolução natural da infecção pelo HIV caracteriza-se por intensa e contínua replicação viral, que resulta, principalmente, na destruição e disfunção de linfócitos T que expressam o antígeno de membrana CD4 e de outras células do sistema imune. A depleção progressiva dos linfócitos T CD4, em conjunto com outras alterações quantitativas e qualitativas do sistema imune, leva à imunodeficiência, que em sua forma mais grave manifesta-se pelo surgimento de infecções oportunistas e neoplasias que caracterizam a AIDS. Assim, a supressão máxima e contínua da replicação viral é desejável para reduzir ou reverter o dano imunológico (ABBAS et al., 2008).

O início da terapia deve ser recomendado para pacientes assintomáticos com contagem de linfócitos T CD4 entre  $350/\text{mm}^3$  e  $200/\text{mm}^3$ . Nesses indivíduos, a decisão de iniciar o tratamento dependerá da tendência de queda da contagem de linfócitos T CD4 e/ou da elevação da carga viral. Para aqueles assintomáticos que têm contagem de linfócitos T CD4 menor do que  $200/\text{mm}^3$  e para aqueles que têm manifestações clínicas associadas ao HIV (independentemente da contagem de

linfócitos T CD4 e da carga viral plasmática) o tratamento deve ser instituído (MS/SVS, 2009).

Segundo consenso do Ministério da Saúde, referente às recomendações da terapia antiretroviral em adultos e adolescentes infectados pelo HIV, a terapia inicial deve sempre incluir três fármacos, sendo dois inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeos (ITRN) associados a um inibidor da transcriptase reversa não análogo de nucleosídeos (ITRNN) ou a um inibidor da protease (IP), o que significa que esquemas duplos (apenas com dois ITRN) não devem mais ser utilizados. A única exceção na qual a terapia dupla pode ser utilizada é o caso de exposição ocupacional. O uso isolado de AZT ainda é aceitável para a quimioprofilaxia da transmissão vertical em algumas situações específicas (MS/SMS, 2008). Na Tabela 2, são apresentados os principais fármacos incluídos em cada classe de antiretrovirais.

**Tabela 2:** Principais fármacos licenciados em cada classe de antiretrovirais

<b>ITRN</b>	<b>ITRNN</b>	<b>IP</b>	<b>Outros</b>
Abacavir (ABC)	Delavirdina (DLV)	Amprenavir (APV)	Enfuvirtide (Inibidor da
Didanosina(ddI)	Efavirenz (EFV)	Atazanavir (ATV)	Integrase)
Estavudina (d4T)	Nevirapina (NVP)	Indinavir (IDV)	Maraviroc (inibidor da
Lamivudina (3TC)		Lopinavir/r (LPV/r)	interação com o co-
Tenofovir (TDF)		Nelfinavir (NFV)	receptor CCR5)
Zalcitabina (ddC)		Ritonavir (RTV)	
Zidovudina (AZT)		Saquinavir (SQV)	
		Tipranavir	
		Darunavir	

\*modificada a partir de Flexner, 2008. ITRN: inibidor da transcriptase reversa análogo de nucleosídeos. ITRNN: inibidor da transcriptase reversa não análogo de nucleosídeos. IP: inibidor da protease.

A preferência é a terapia com 2 ITRN associados a um ITRNN. Os esquemas que utilizam 2 ITRN + ITRNN são, em geral, de posologia mais simples, o que provavelmente facilita a adesão ao tratamento. O *AIDS Clinical Trials Group* (ACTG) comparou 3 regimes terapêuticos iniciais em 757 pacientes: i) efavirenz com 2 ITRNs; ii) lopinavir potencializado com ritonavir (lopinavir/r) com 2 ITRNs; e iii) efavirenz com lopinavir/r, sem ITRNs. O esquema que utilizava efavirenz com 2 ITRNs levou à queda da taxa viral e à supressão viral por mais tempo que lopinavir/r com 2 ITRNs (24% vs 37%, respectivamente) (RIDLLER et al., 2008). Um ensaio clínico randomizado que comparou diretamente esquemas iniciais de tratamento de 2 ITRN+efavirenz (ITRNN) com 2 ITRN+lopinavir/r (IP/r) demonstrou que, na análise de intenção de tratamento, os resultados de supressão viral (carga viral < 50 cópias/mL) nos pacientes do grupo efavirenz (89% de supressão viral) foram superiores ao grupo lopinavir/r (77%) em 96 semanas, e a contagem de linfócitos T CD4 foi maior no grupo lopinavir/r que no grupo efavirenz (287cél./ul e 230/ul, respectivamente) (HAUBRICH et al., 2007). Não existe dado publicado sobre tratamento de longo prazo, particularmente em estratégias de terapia seqüencial, que permitam definir qual seria a abordagem associada com melhores resultados.

Diante dos resultados de equivalência dos esquemas com 2 ITRN + ITRNN em relação aos esquemas com 2 ITRN + IP/r, e por vantagens potenciais no manejo anti-retroviral, o comitê das recomendações para terapia anti-retroviral em adultos e adolescentes infectados pelo HIV 2007/2008 do Ministério da Saúde/programa DST/AIDS optou por sugerir esquemas com ITRNN como primeira opção, e esquemas com IP com o reforço farmacológico do ritonavir (IP/r) como alternativos para o início de terapia anti-retroviral em pacientes virgens de tratamento (MS/ SMS, 2008).

A associação zidovudina/lamivudina (AZT/3TC) é a mais estudada em ensaios clínicos randomizados, apresenta resposta virológica equivalente a outras combinações de 2 ITRN e é habitualmente bem tolerada, tendo sido mantida como a dupla de ITRN de primeira escolha para compor o esquema antiretroviral inicial. O AZT e a didanosina entérica (ddl EC) têm um perfil de toxicidade metabólico considerável. Em ambos são descritos a lipoatrofia em longo prazo, toxicidade hematológica associada ao AZT, e pancreatite e neuropatia periférica associadas ao ddl. O abacavir (ABC) pode causar a síndrome de hipersensibilidade e o tenofovir (TDF) pode causar nefrotoxicidade. Nos casos de intolerância ao AZT, a ddl EC ou o TDF permaneceram como alternativas, sempre em combinação com a lamivudina (MS/SVS, 2009).

Em pacientes em uso de AZT, a toxicidade hematológica e a lipoatrofia são um dos principais efeitos adversos que resultam na modificação do tratamento. O ABC permanece recomendado na terapia inicial apenas nas situações de intolerância ao AZT, ao ddl EC e ao TDF, pois seu custo elevado não se traduz em benefício proporcional quando comparado às outras opções. A estavudina (d4T) permanece sendo a última opção para substituir o AZT, devido ao acúmulo de dados científicos e clínicos confirmando a forte associação entre uso do d4T e

desenvolvimento de lipoatrofia e dislipidemia. A dupla ddI/d4T continua excluída da terapia inicial devido ao maior potencial de toxicidade (MS/SVS, 2009).

Os dois ITRNN disponibilizados no Brasil são o efavirenz (EFZ) e a nevirapina (NVP). Quanto à escolha dos ITRNN, o efavirenz (EFZ) continua sendo preferencial à nevirapina (NVP), exceto em gestantes. Essa opção está fundamentada na sua elevada potência de supressão viral, comprovada eficácia em longo prazo e ao menor risco de efeitos adversos sérios. Os efeitos adversos mais relacionados ao EFV, como tonturas, alterações do sono e alucinações, costumam desaparecer após as primeiras duas a quatro semanas de uso. A NVP é uma opção ao EFZ em algumas situações, como mulheres que desejam engravidar ou durante a gestação. Entretanto, a NVP apresenta maior toxicidade hepática, rash cutâneo e risco de desencadear Síndrome de Stevens-Johnson (MS/SVS, 2009; HAMMER et al, 2008).

Os inibidores da protease potencializados com ritonavir (IP/r) oferecem menor probabilidade de desenvolvimento de resistência que os ITRNN. A escolha do IP para ser a combinação com ritonavir como adjuvante farmacológico tem como vantagens proporcionar níveis sanguíneos do IP mais elevados, estáveis e por tempo mais prolongado e menor risco de mutações que confirmam resistência viral (RIDDLER et al, 2006). Esquemas que incluem a associação de IP/r estão relacionados com uma maior elevação nas contagens de linfócitos T CD4, mas por outro lado, é mais freqüente a ocorrência de dislipidemias em esquemas com IP/r, quando comparados a associações que envolvem ITRNN, particularmente o efavirenz (RIDDLER et al., 2008).

A escolha da terapia inicial envolvendo um esquema composto por um inibidor da protease deve preferencialmente utilizar o lopinavir (LPV) potencializado com ritonavir, com base na experiência de uso, no maior número de estudos clínicos com seguimento de pacientes em longo prazo e na alta potência e durabilidade que



confere aos esquemas antiretrovirais. A associação atazanavir/r (ATV/r), é considerada a combinação de inibidores da protease alternativa (MOLINA et al, 2008; MS/SVS 2009). De forma geral, o saquinavir/r, indinavir/r e fosamprenavir/r permanecem como opção de resgate. As principais desvantagens do LPV/r são a dificuldade de adesão em longo prazo e seus eventos adversos, particularmente efeitos metabólicos. O ATV/r está mais relacionado à icterícia (MOLINA et al., 2008; WALMSLEY et al., 2007; CLUMECK et al., 2007).

Raltegravir, um inibidor de integrase, foi aprovado em 2007 para uso em tratamento experimental de pacientes (STEIGBIGEL et al, 2007; COOPER et al, 2007). Foi comparado com efavirenz num tratamento de pacientes iniciantes, sendo administradas 4 doses de raltegravir (100, 200, 400, ou 600 mg duas vezes ao dia) ou efavirenz, cada um combinado com tenofovir e lamivudine. Em 48 semanas, a proporção dos indivíduos que tinham níveis de RNA de HIV abaixo de 50 cópias / mL foi similar entre os 5 grupos (MARKOWITZ et al, 2007).

Uma nova classe de drogas antiretrovirais foi desenvolvida, são os chamados inibidores de fusão ou inibidores de entrada. Maraviroc, um antagonista do CCR5, foi aprovado em 2007 para uso em tratamento experimental de pacientes (SCHLECHT et al, 2008). Foi utilizado como antiretroviral em pacientes com variantes de HIV-1 que utilizam exclusivamente CCR5 como co-receptor. Maraviroc foi comparado com efavirenz, cada um combinado com zidovudine/lamivudine. Em 48 semanas, 69,3% e 65,3% dos pacientes tiveram uma carga viral inferior a 50 cópias/mL nos grupos efavirenz e maraviroc, respectivamente (SAAG et al., 2007).

### 1.3 Avaliação da resposta terapêutica

A avaliação da resposta terapêutica utiliza como parâmetros a redução da carga viral e o aumento do número de linfócitos T CD4. Embora um dos principais objetivos da terapia antiretroviral seja a obtenção de carga viral indetectável (abaixo de 50 ou 80 cópias/mL) dentro de um período de seis meses, deve-se considerar como resultado positivo uma grande redução nos seus valores: 90% da carga viral nas primeiras quatro a seis semanas, ou 99% após 12 a 16 semanas (MS/SVS, 2009).

O impacto inicial da terapia antiretroviral sobre a carga viral tem relação direta com a carga viral pré-tratamento, o grau de imunodeficiência, a potência do esquema, o grau de adesão e a tolerância do paciente aos fármacos, assim como com outros aspectos que possam influenciar a farmacocinética. Sendo assim, a situação individual do paciente pré-terapia e seu comportamento, uma vez implementada a terapia, deve ser considerada ao se estabelecer o período de seis meses como máximo para atingir níveis indetectáveis da carga viral (MS/SVS, 2009).

Alguns pacientes com carga viral indetectável podem apresentar episódios ocasionais de viremia detectável transitória em baixos valores (geralmente menor que 1000–2000 cópias/mL) com subsequente supressão. Essa situação não caracteriza falha terapêutica, mas sugere-se que seja investigada e que eventuais problemas com a adesão à terapia sejam corrigidos (HAMMER et al., 2008; MS/SVS, 2009).

## 1.4 Efavirenz

Na maioria das orientações, o tratamento com efavirenz (EFV) é o ITRNN mais recomendado entre os regimes de primeira linha em pacientes que iniciam o tratamento antiretroviral. Assim, o EFV é uma das drogas antiretrovirais mais utilizadas (HAMMER et al., 2008).

O EFV é descrito como um derivado do benzoxazinone (2H-3,1-Benzoxazin-2-one,6-cloro-4(Cyclopropylethynyl) -1,4-dihidro-4-trifluormetil). Sua fórmula empírica é C<sub>14</sub>H<sub>9</sub>ClF<sub>3</sub>NO<sub>2</sub> (RAKHMANINA & VAN DEN ANKER, 2010).

EFV é prontamente absorvido e atinge picos de concentração sérica (C<sub>max</sub>) de 4,07 ug/ml cerca de 3-5 horas após a administração de 600 mg, a dose oral padrão do adulto. EFV tem um período de meia-vida no soro de 45 horas e atinge estado estacionário das concentrações plasmáticas de 6-10 dias. A biodisponibilidade do EFV é aumentada pela refeição quando comparado ao jejum. A droga é altamente ligada às proteínas (> 99%), predominantemente à albumina (RAKHMANINA & VAN DEN ANKER, 2010).

A segurança e a eficácia de EFV em crianças menores de 3 anos de idade não foram estabelecidas. Os dados sobre a exposição a EFV em mães e seus bebês em aleitamento materno é limitado. Cerca de 14 a 34% de uma dose de EFV é recuperada na urina (menos de 1% como droga inalterada) e 16-61% de uma dose é recuperada nas fezes (principalmente como fármaco inalterado) (RAKHMANINA & VAN DEN ANKER, 2010). O tratamento pode ter efeitos colaterais, representados por sonhos anormais, tonturas, sonolência, insônia e diminuição da concentração (HAAS et al., 2004, MS/SVS, 2009). A frequência de efeitos colaterais no SNC pode ser tão elevada, metade dos pacientes apresentando esta queixa, ocorrendo geralmente durante as primeiras semanas de tratamento. Uma vez que há uma diferença interindividual considerável nos níveis de meia-vida da droga após a

administração oral de EFV, sugere-se que a ocorrência de efeitos colaterais no SNC possa refletir o aumento dos níveis plasmáticos EFV.

#### **1.4.1 Monitorização terapêutica de efavirenz**

A monitorização terapêutica de fármacos (MTD) é uma abordagem que visa à otimização e individualização da administração da droga. Essa monitorização é de grande interesse no tratamento do HIV, pois permite aumentar a eficiência do tratamento e reduzir os efeitos adversos dos antiretrovirais. EFV se enquadra nos critérios para a MTD, incluindo uma possível correlação das suas concentrações plasmáticas com o efeito farmacológico, avaliado pela contagem de células CD4 e carga viral, bem como com a toxicidade (CSAJKA et al., 2003; MARZOLINI et al., 2001). Essa correlação é maior com a toxicidade do que com a eficácia do medicamento (DAHRI & ENSOM. 2007). Além disso, muitos ensaios analíticos aceitáveis estão atualmente disponíveis para esta droga, exibindo sua variável disposição cinética interpacientes e intrapaciente (CSAJKA et al., 2003). A MTD também é considerada uma boa ferramenta para estimar a adesão do paciente ao tratamento. O abandono é um dos principais problemas associados ao aparecimento de cepas virais resistentes (FEXNER, 2007). De fato, as mutações do genoma viral que conferem resistência ao HAART, que levam a mal definidas modificações das doses terapêuticas, são um dos principais problemas que impedem a MTD destas drogas. Na verdade, relativamente bem definidas faixas terapêuticas só foram estabelecidas para pacientes virgem de tratamento. Por conseguinte, o alcance terapêutico aceito para EFV (1 a 4 mg/litro) deve ser interpretado com cautela porque pode mudar dependendo de fatores como o estado do paciente, o uso de regimes de combinação com outros antiretrovirais, a exposição prévia a

antiretrovirais ou não, as mutações que conferem resistência, entre outros (CSAJKA et al., 2003).

### **1.5 Efavirenz e farmacogenética**

Muitos fatores genéticos humanos influenciam a história natural do HIV pelo fato de acelerarem ou reduzirem a progressão da infecção ao desenvolvimento da AIDS (TELENTI, 2002). Fatores relacionados ao hospedeiro também contribuem para a resposta ao tratamento antiretroviral. A aplicação de um único regime terapêutico resulta em importantes variações interpessoais relacionadas às concentrações séricas e às diferenças na susceptibilidade à toxicidade dos fármacos (TELENTI, 2002; HASS, 2005).

A relação de genes e variantes a serem pesquisados como possíveis interferentes na resposta individual ao tratamento antiretroviral é frequente. Alguns genes foram estudados em diversas populações, nas quais mostraram significativas associações com alterações na resposta terapêutica aos antiretrovirais e com o desenvolvimento de reações adversas e susceptibilidade à doença (HASS, 2005; AHUJA et al., 2008; NAKAJIMA & KIMURA, 2008).

Apesar de não existirem muitos dados disponíveis, áreas de investigação farmacogenética incluem a análise da eficácia da terapia com ITRNs, resposta neurotóxica e hematotóxica aos ITRNs e ITRNNs, resposta alérgica, e a probabilidade de resposta aos inibidores de fusão. A partir do momento em que existirem dados disponíveis, será possível aumentar prospectivamente a chance de sucesso no tratamento e reduzir a possibilidade de efeitos tóxicos, através da utilização de uma terapia personalizada (FLEXNER, 2008; HAMMER *et al.*, 2008). Genes envolvidos na metabolização e transporte de fármacos são importantes alvos a serem investigados para melhor prever a eficácia e a segurança de diversos

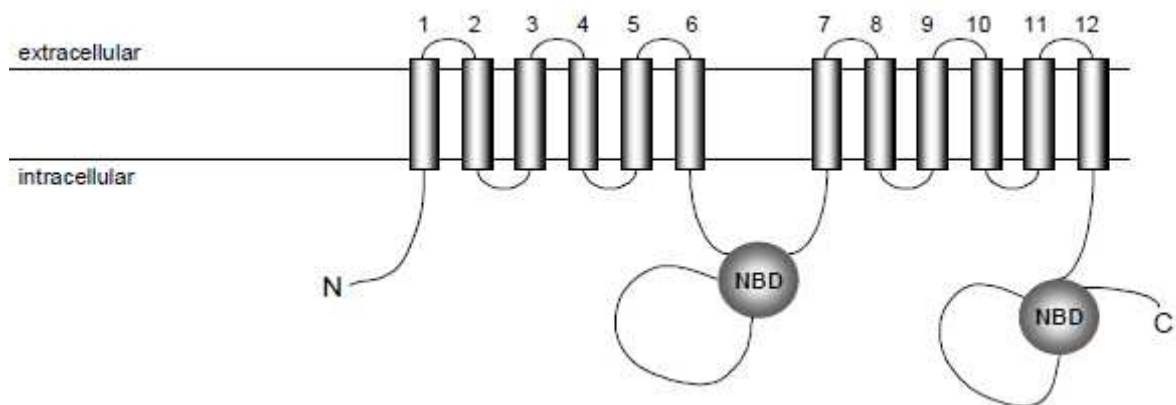
tratamentos (FIEGENBAUM et al, 2005). A farmacogenética é uma área de pesquisa com grande perspectiva de crescimento que promete auxiliar no uso racional de diferentes fármacos, bem como no desenvolvimento de novos fármacos (GOLDSTEIN, 2003).

A resposta à terapia antiretroviral em pacientes HIV-positivo varia consideravelmente em diferentes aspectos, como na concentração plasmática das drogas, no desenvolvimento de efeitos adversos e na taxa de recuperação do sistema imunológico. Esta variação pode ser atribuída a fatores como interações medicamentosas ou diferenças individuais na capacidade de metabolização dos fármacos antiretrovirais. A investigação dos fatores que podem interferir na eficiência da resposta aos antiretrovirais é de grande interesse para o entendimento de como os pacientes podem responder de forma tão variada à HAART (TELENTI & ZANGER, 2008).

Importantes variações genéticas do hospedeiro estão associadas a uma diferente capacidade de metabolização. Várias enzimas desempenham papéis cruciais no transporte e metabolismo de diferentes fármacos, como a glicoproteína-P, produto do gene *MDR1* (*ABCB1*), e enzimas do citocromo P450 (*CYP450*), diretamente envolvidas na farmacocinética de diversos fármacos (TELENTI & ZANGER, 2008).

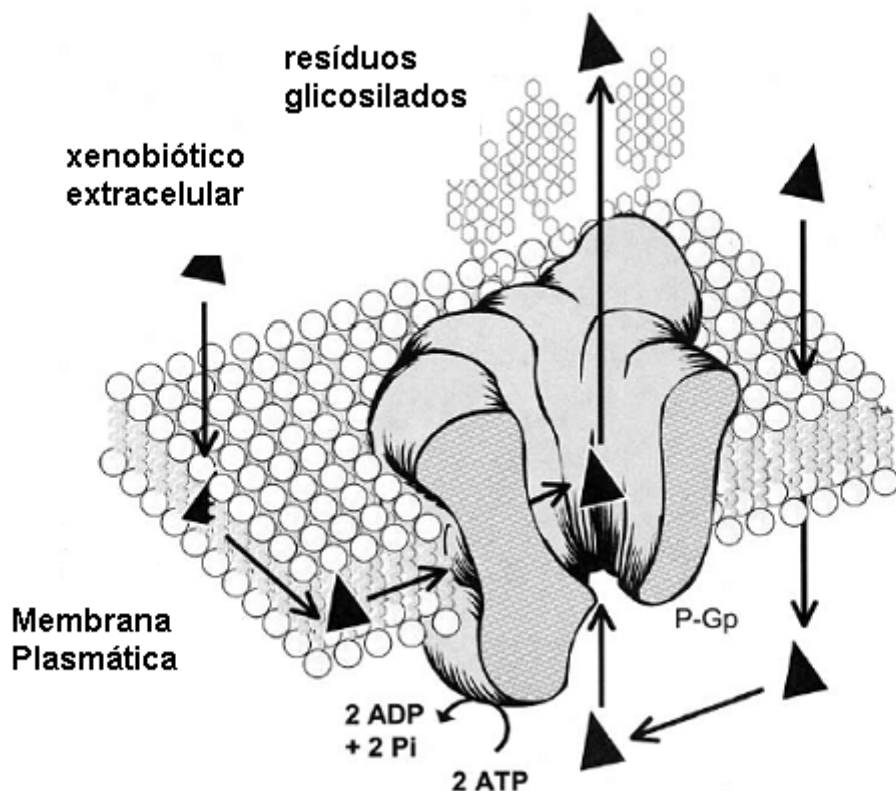
Variantes alélicas de *MDR1* e *CYP2D6* estão associadas com diferenças nas concentrações plasmáticas de inibidores da protease (IP) e inibidores não nucleosídeos da transcriptase reversa (ITRNN). Variantes alélicas de *MDR1* também predizem a taxa de imunoreatividade (aumento dos níveis de linfócitos T CD4) após o início do tratamento com antiretrovirais, o que mostra a relevância de transportadores para o acesso dos fármacos antiretrovirais a compartimentos farmacológicos privilegiados (HASS, 2005).

A P-gp é um membro da família dependente de ATP e é codificada pelo gene humano ABCB1 (ATP-binding cassette, subfamília B), também chamado de resistência a múltiplas drogas (MDR1), localizado no cromossomo 7p21-21.1 (FOJO et al., 1986), com cerca de 4,5 kb e 28 exons (CHEN et al., 1990). A P-gp em humanos é uma proteína transmembrana fosforilada e glicosilada, de 1280 aminoácidos, que contém duas regiões homólogas de seqüências simétricas, cada qual com 6 domínios transmembrana e um motivo de ligação de ATP (Figura 1). Os domínios de ligação do ATP agem como ATPases que hidrolisam ATP em ADP+Pi.



**Figura 1:** Arranjo de proteínas transmembrana de efluxo ABC, mostrando as 12 regiões de domínio transmembrana e as duas regiões NBDs (domínios de ligação de nucleotídeos/ATP).  
Fonte: adaptada a partir de CHAN LM, LOWES S, HIRST BH, 2004.

A P-gp funciona como uma bomba de efluxo transmembrana, transportando as drogas do meio intracelular para o extracelular, mas pode também interagir com as moléculas da droga retidas na bicamada lipídica da membrana celular (Figura 2).



**Figura 2:** Função da P-glicoproteína (P-gp). Este modelo mostra que o transporte de efluxo mediado pela P-gp de substratos de drogas pode ocorrer no nível da membrana plasmática ou do compartimento intracelular. ATP, adenosina trifosfato; ADP, adenosina difosfato; Pi, fosfato inorgânico.

Fonte: adaptada a partir de MARZOLINI et al., 2004.

A P-gp foi isolada pela primeira vez a partir de células de ovário de hamster chineses (CHO) resistentes à colchicina (JULIANO RL, LING V, 1976). Posteriormente, o gene que codifica a P-gp (MDR1) foi identificado devido à sua superexpressão em células tumorais, associada à aquisição de resistência cruzada a várias drogas tóxicas anti-câncer (UEDA et al., 1987). Este transportador de drogas foi também reconhecido como expresso em muitos tecidos normais, sugerindo uma função fisiológica (CHAN LM, LOWES S, HIRST BH, 2004). A P-gp é encontrada em locais excretores como a superfície canalicular dos hepatócitos, a superfície apical de células tubulares proximais nos rins, e na superfície da borda em escova dos enterócitos. Além disso, a P-gp é também expressa no epitélio do plexo coróide do cérebro e na superfície luminal dos capilares sanguíneos do encéfalo (barreira hemato-encefálica). A P-gp também está presente em outros tecidos conhecidos



por ser um obstáculo sangue-tecido, tais como a placenta, os ovários e os testículos, tendo sido detectada também em células tronco hematopoéticas e células mononucleares periféricas (PBMC), macrófagos maduros, as células natural killer, células dendríticas, linfócitos T e B (MARZOLINI et al., 2004). Assim, a função e a localização anatômica da P-gp sugerem que esse transportador atua como uma barreira protetora para manter as toxinas fora do corpo, excretando os compostos na urina, na bile e para o lúmen intestinal, impedindo a acumulação de tais compostos em órgãos vitais como o cérebro, gônadas e medula óssea, assim como no feto (MARZOLINI et al., 2004).

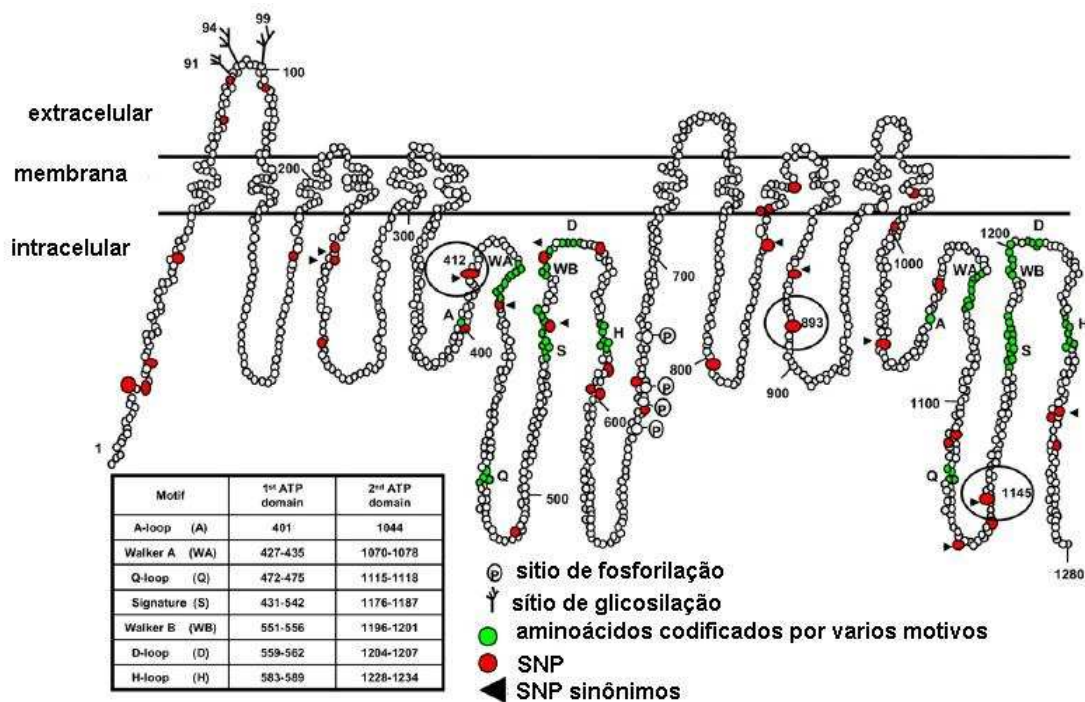
A P-gp transporta um amplo espectro de substâncias, incluindo diversos quimioterápicos e fármacos antiretrovirais da classe dos IP. Estudos de expressão em diferentes tipos celulares mostraram que a expressão diferencial de P-gp pode influenciar a atividade e biodisponibilidade de fármacos e que polimorfismos no gene *MDR1* podem ser importantes para a predição da resposta clínica em pacientes sob terapia HAART (FELLAY et al, 2002; SAITOH et al, 2005).

Estudos bioquímicos sugerem que o transporte de substrato por MDR1 é acoplado à hidrólise de ATP (SHAROM et al., 1993) e o modelo atualmente aceito é que a P-gp funciona como uma "bomba de vácuo hidrofóbica", no qual o substrato interage diretamente com o bolso de ligação da droga na proteína P-gp e é bombeado do espaço intracelular para o espaço extracelular, assistido pela hidrólise de ATP em ADP+Pi (revisto em FUNG & GOTTESMAN, 2009). A característica mais significativa da função da P-gp é a sua ampla especificidade de substrato. Críticas têm categorizado substratos da P-gp com base no seu uso clínico (MARZOLINI et al., 2004; PERALTA et al., 2008) e correlacionado níveis de expressão de *MDR1* com resistência às drogas. Grande número de substratos, com diferentes estruturas químicas, são candidatos à metabolização pela P-gp (MARZOLINI et al., 2004).

Esses substratos têm uma ampla gama de funções biológicas, por exemplo, drogas anti-câncer, inibidores da protease do HIV, anti-histamínicos, bloqueadores dos canais de cálcio, antibióticos, etc. O mecanismo de ligação do substrato e o reconhecimento de substratos e inibidores da P-gp são complexos. A P-gp contém um grande bolso de ligação de drogas, que geralmente é constituído por vários domínios trans-membrana (TM5, TM6, TM11 e TM12), que determina a especificidade de substrato. No entanto, são as mutações de aminoácidos na região transportadora que também alteram a especificidade do substrato, sugerindo que o reconhecimento de drogas é um processo complexo (FUNG & GOTTESMAN, 2009).

A função da P-gp como transportador é semelhante à de outras drogas transportadoras. Entre a longa lista de substratos, é evidente que algumas dessas drogas também são substratos de enzimas metabolizadoras de drogas, principalmente *CYP3A4*. Este gene está localizado no cromossomo 7q22.1, muito próximo da localização cromossômica do *MDR1*, sugerindo uma inter-dependência durante a evolução para proteger o organismo das toxinas.

De acordo com o banco de dados de SNPs (HapMap) mantido pelo NCBI (National Center for Biotechnology Information), existem mais de 50 SNPs na região de codificação do *MDR1* humano. Estudar a localização dos SNPs tem levado a importantes observações, por exemplo, que os SNPs com mais de 1% de heterozigosidade foram encontrados em dois terços dos 28 exons do gene. Os SNPs do *MDR1* são mutações sinônimas e não sinônimas e a maioria das mutações são traduzidas em aminoácidos localizados na região intracelular (Figura 3) (FUNG et al., 2009)



**Figura 3:** Esquema da proteína codificada pelo gene *MDR1* mostrando a localização dos SNPs. Este é um modelo hipotético bidimensional da P-gp humana. Cada círculo representa um resíduo de aminoácido. Círculos vermelhos representam os aminoácidos afetados por SNPs. Resíduos de aminoácidos afetados por SNPs sinônimo estão marcados com triângulos. Os SNPs do haplótipo *MDR1* (1236C>T: G412, 2677G>T: A893 e 3435C>T: I1145) são circulados. As regiões que codificam as alças A, D, H, Q, Walker-A e Walker-B estão coloridas em verde, e as posições dos aminoácidos destes motivos estão resumidos na tabela. Sítios de fosforilação e glicosilação também são mostrados. (Modificado por Fung et al., 2009).

Polimorfismos genéticos no gene *MDR1* foram inicialmente identificados por Kioka et al, em 1989, em estudos *in vitro* com células cancerosas (KIOKA et al.,1989). Em seguida, outros grupos, incluindo Hoffmeyer et al, têm examinado o conjunto de SNPs da região de codificação de *MDR1*, em especial a mutação 3435C>T, como um fator preditivo no aparecimento de certas doenças ( câncer, colite ulcerosa, epilepsia) ou desfecho clínico de tratamentos com fármacos (imunossupressores, inibidor da protease do HIV, anti-câncer) (HOFFMEISTER, 2000; SCHWAB et al., 2003; MARZOLINI et al., 2004; CHAN LM, LOWES S, HIRST BH, 2004; OUDE ELFERINK RP, DE WAART R, 2007). A associação entre a mutação sinônima 3435C>T e a expressão da proteína P-gp em diferentes órgãos (por exemplo, duodeno, intestino, placenta, fígado, rim) tem sido extensivamente estudada, porém esses estudos não foram conclusivos, com observações

conflitantes (SIEGSMUND et al., 2002; NAKAMURA et al., 2002; MORIYA et al., 2002; HITZL et al., 2004; OWEN et al., 2005). Essas observações levaram a uma mudança de estudo do 3435C>T para o estudo dos efeitos clínicos do haplótipo *MDR1* (BELLUSCI et al., 2009; MARFURT et al., 2010; BALCERCZAK et al., 2010; GÜMÜŞ-AKAY et al., 2009; CHEN et al., 2009; VAHAB et al., 2009). Embora tenham sido realizados numerosos estudos sobre a mutação 3435C>T, muitos não pesquisaram os haplótipos do *MDR1*. Nestes estudos, o tamanho da amostra do haplótipo é muitas vezes baixo para determinar a significância. Recentes provas, no entanto, sugerem que o uso do haplótipo mais comum (1236C>T, 2677G>T, 3435C>T) pode ser a melhor forma de detectar a ligação a um fenótipo mais do que estudar somente o SNP 3435C>T (FUNG et al., 2009).

O efeito do haplótipo na evolução da doença, incluindo câncer, tem sido relatado (SABAHI Z et al., 2010; TAHARA et al., 2010; CHEN et al., 2010; KHEDRI A et al., 2010; TAHERI et al., 2010; ANDERSEN et al., 2009; HENRÍQUEZ-HERNÁNDEZ et al., 2009). Estudos semelhantes aos estudos clínicos do SNP 3435C>T tem mostrado que os haplótipos influenciam na resposta a drogas e nas doenças. As linhagens celulares expressando *MDR1* com a substituição 3435C>T não alteraram a expressão na superfície celular ou a função de transporte, comparados com as células com o gene selvagem (KOMAR, 2007; KIMCHI-SARFATY et al., 2007). É evidente que a substituição 3435C>T não é a única razão para menor expressão, entretanto, os pacientes portadores do genótipo 3435TT foram relatados como tendo menor expressão de *MDR1* (HOFFMEYER et al., 2000).

Um questionamento importante que tem sido colocado é como um polimorfismo silencioso no final da região codificante do gene *MDR1* pode afetar a sua expressão. Uma possibilidade é que a substituição 3435C>T pode estar ligada a um ou mais SNPs ainda não identificados no início da região 3'UTR ou do promotor

que podem afetar a transcrição e os níveis de RNAm. No entanto, a análise de ligação em pacientes japoneses não revelou uma significativa associação entre o SNP 3435C>T e outros polimorfismos na região do promotor (SAI et al., 2006). Outra explicação poderia ser que o RNAm do *MDR1* tem a estabilidade alterada pela substituição 3435C>T. Wang et al. relataram que, no fígado, o alelo 3435C tem maior expressão do que o alelo 3435T. No mesmo estudo, a expressão *in vitro* em células CHO mostrou que o RNAm carregando a mutação T é degradado mais rápido do que os do tipo selvagem (WANG et al., 2005). No entanto, várias linhas de evidência sugerem que a substituição 3435C>T não altera a expressão de *MDR1* (KIMCHI-SARFATY et al., 2007; HUNG et al., 2008, GOW et al., 2008).

O sítio do SNP 3435C>T está localizado no segundo domínio de ligação de ATP (Figura 3). A análise da seqüência dos aminoácidos indica que um sinal de pausa adicional poderia interferir no dobramento de dois motivos. Em primeiro lugar, poderia afetar a formação da alça Q, um elemento fundamental no mecanismo de ligação de nucleotídeos, uma vez que forma o domínio de ligação de ATP. Os aminoácidos que correspondem ao sítio de ligação do ATP na P-gp em humanos são a Gln475 e Gln1118, que estão dispostos na primeira e na segunda porção da alça-Q e são responsáveis pelo domínio de ligação de ATP e pela comunicação com o sítio de ligação do substrato (URBATSCH et al., 2000).

O SNP 1236C>T é outro polimorfismo sinônimo no *MDR1*, que codifica a glicina no primeiro domínio de ligação do ATP, encontrada entre a alça-A e Walker-A (Figura 3). Esta substituição parece não afetar a expressão nem a função da proteína. Os experimentos também mostraram que essa substituição não está relacionada às alterações na estabilidade do RNAm (WANG et al., 2005).

A interrupção do deslocamento do ribossomo durante a tradução pode ser causada por um polimorfismo na posição 2677, no exon 21, podendo resultar nas

substituições Ala893Ser (2677G>T) ou Ala893Thr (2677G>A) (Figura 3). Uma alteração do nucleotídeo 2677 (A893) pode resultar em uma pausa no ribossomo, que poderá afetar a tradução de aminoácidos. No entanto, estudos têm identificado substituições de vários aminoácidos (G830V, I849M) que podem mudar a cinética da atividade de ATPase induzida por drogas (SAKURAI et al., 2007). A análise bioquímica confirmou que a substituição da alanina 893 (A893) por serina ou treonina pode alterar o transporte da droga (SAKURAI et al., 2007). Esta evidência sugere que a mutação A893 provavelmente afeta a atividade de ATPase induzida por drogas. Esta análise sugere que cada um dos alelos que compõem um completo haplótipo pode contribuir com mudanças de forma pequena mas significativa, podendo levar à alteração do dobramento da proteína e da sua função. O dobramento co-traducional dos dois domínios de ATPase da P-gp é crucial para sua função. Após traduções sucessivas, os dois domínios de ligação ao ATP são dobrados juntos para formar um grande domínio que pode hidrolisar dois ATPs para ADPs de uma forma interdependente. Embora o impacto de cada um dos SNPs no haplótipo MDR1 pode ser independente, quando presentes juntos podem produzir fenótipos muito mais salientes (AMBUDKAR et al., 2006).

Estudos demonstraram que existe uma relação de desequilíbrio de ligação entre os SNPs no exon 26 (3435C>T) e no exon 21 (2677G>T/A), sugerindo que diferenças funcionais observadas na P-gp, inicialmente atribuídas ao SNP no exon 26 (sinônimo), poderiam ser um resultado de uma associação com o polimorfismo no exon 21 (não-sinônimo) (KIM et al., 2001; KIM et al., 2009). Três combinações comuns de haplótipos, encontradas em mais de 70% dos indivíduos, foram relatadas em vários estudos, e parecem ser observadas em todos os grupos étnicos com um forte desequilíbrio de ligação entre os exons 26 e 21. Também tem sido demonstrado que um SNP sinônimo no exon 12 (1236C>T) está ligado ao dos exons

26 (3435C>T) e 21 (2677G>T/A) (KIM et al. 2001, ILLMER et al, 2002; JOHNE et al., 2002; FELLAY et al, 2002; WINZER et al., 2005). Da mesma forma, quando possíveis combinações genóticas dos polimorfismos nos exons 26, 21 e 12 do *MDR1* foram analisados, em mais de 50% dos indivíduos estudados pareceu existir um forte desequilíbrio de ligação (KIM et al. 2001; ILLMER et al, 2002; JOHNE et al., 2002; GOTO et al., 2002).

As interações dos inibidores da protease com a P-gp e ABCs têm sido extensivamente estudadas, e tem demonstrado que são substratos ou moduladores dos transportadores de efluxo (LEE et al., 1998; FORD et al., 2003; CHANDLER et al., 2003). No entanto, os dados relativos à interação dos ITRNN ou ITRN com transportadores de efluxo são escassos e conflitantes (BERRUET et al., 2005; DIRSON et al., 2006; WEISS et al., 2007; WEISS et al., 2008). Alguns estudos relatam que os NNRTIs não são substratos e nem moduladores da P-gp (BERRUET et al., 2005; DIRSON et al., 2006; WEISS et al., 2007). Outros indicam o potencial do tratamento em longo prazo com EFV induzir a expressão de P-gp em células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) ou na linhagem celular LS180 (CHANDLER et al., 2003; WEISS et al., 2008).

Os resultados dos estudos que examinam a influência dos polimorfismos do gene *MDR1* na resposta ao tratamento com terapia antiretroviral não são uniformes (Tabela 3). Estudo realizado por Felley et al. em 123 pacientes com infecção pelo HIV foi encontrado um aumento significativo na contagem de células T CD4 em 3 e 6 meses após o início do tratamento nos pacientes com genótipo 3435TT, e não houve diferenças na queda da carga viral entre os genótipos TT, CT e CC (FELLEY et al., 2002). Foi sugerido nesse estudo que o alelo T (variante) poderia resultar em um aumento na penetração do inibidor de protease nas células T CD4. Além de alterar a concentração intracelular da droga, a superexpressão da P-gp *in vitro*

demonstrou reduzir a suscetibilidade de células CD4 à infecção por HIV, afetando a fusão viral e possivelmente a sua liberação (LEE et al., 2000; SPECK et al., 2002).

Tabela 3. Efeito do polimorfismo do gene MDR-1 sobre a evolução da infecção pelo HIV. Estudos em pacientes

Nº	Pacientes Características	Polimorfismos estudados	Influencia dos diferentes genótipos		Referências
			Efeitos no CD4	Efeito na carga viral	
123	67 pacientes que faziam tratamento e mantinham a supressão viral com EFV E NFV, 56 pacientes com tratamento inicial	3435C>T	↑ CD4 24 semanas TT=257 cel/mm <sup>3</sup> CT=165 cel/ mm <sup>3</sup> CC=121 cel/ mm <sup>3</sup>	Não houve diferença estatística	Felley et al., 2002
479	Pacientes sem tratamento inicial (virgem)	3435C>T	Não houve diferença estatística	Falha virológica mais precoce no genótipo CC (P=0,07)	Brumme et al., 2003
149	Pacientes sem tratamento inicial (virgem) 2 ITRN + IP (N=106), 1 ITRN + IP (N= 43)	3435C>T	Nenhuma relação entre o polimorfismo 3435C>T com o aumento do CD4 em 3 e 6 meses de inicio do tratamento antiretroviral	Nenhuma relação entre o polimorfismo 3435C>T com o aumento da carga viral, em 3 e 6 meses de inicio do tratamento antiretroviral	Nasi et al., 2003
71	Pacientes crianças sem tratamento inicial (virgem) tratados com 2 ITRN + EFV ou NFV	3435C>T	Não houve diferenças em 2, 4 e 20 semanas	Cargas virais ↓ de 400 cópias / ml na 8 semana de terapia antiretroviral nos genótipos 3435CC (59%) do que no genótipo 3435CT (91%).	Hulgan et al., 2003
411	Sem tratamento	3435C>T 2677G>T	Não houve diferença estatística <i>in vitro</i> . Não influencia na progressão espontânea do HIV nas células CD4.		Bleiber et al., 2004
129	3TC + d4T + IDV (n = 60) NVP + d4T + IDV (n = 69)	3435C>T 2677G>T	Não houve diferenças em 74 semanas	Não houve diferenças em 74 semanas	Verstuyft et al., 2005
504	Pacientes sem tratamento inicial (virgem) tratados com EFV (n = 340), NFV (n = 348). 184 dos 504 participantes receberam efavirenz e nelfinavir	3435C>T 2677G>T	Não houve diferenças	MDR1 3435 genótipo TT foi associado com menor probabilidade de falência virológica e diminuição da resistência viral ao efavirenz	Haas et al., 2005
72	3ITRN (N = 12), 2ITRN + 1 PI (N =	3435C>T 2677G>T/A	Nenhuma relação entre os	Nenhuma relação entre os	Winzer et al.,



	40); 2ITRN + 1 ITRNN (N = 20).		Genótipo composto 2677G>T e 3435C>T	polimorfismos com o aumento do CD4 em 4, 12, 24 e 48 semanas de início do tratamento antiretroviral	polimorfismos com a diminuição da carga viral em 4, 12, 24 e 48 semanas de início do tratamento antiretroviral	2005
347	219	Crianças infectadas e 128 crianças expostas não infectadas	1236C>T e 3435C>T	Genótipos 3435CT, 1236CT e 1236TT e a análise de pares de haplótipos (3435CT/1236CT e 3435CT/1236TT) mostraram uma importante proteção contra a progressão para AIDS pediátrica.		Bellusci et al., 2009

3TC: lamivudina; AZT: zidovudina; d4T: estavudina; EFV: efavirenz; IDV: indinavir; IP: inibidores da protease; ITRN: inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeos; ITRNN: inibidores de transcriptase reversa não análogos de nucleosídeos; NFV: nelfinavir; NVP: nevirapina; RTV: ritonavir; HIV: vírus da imunodeficiência humana.

Brumme et al. (2003) estudaram 479 pacientes recém-diagnosticados com HIV e os indivíduos com genótipo 3435CC tiveram menor tempo de falha virológica (definida por uma carga viral > 500 cópias/ml) que os genótipos 3435CT e TT, mas com diferenças no limite de significância estatística (BRUMME et al., 2003). Este estudo não encontrou diferenças entre os três genótipos para o desenvolvimento de resistência às drogas antiretrovirais.

Num estudo realizado em crianças por Hulgán et al., foi encontrada uma menor proporção de crianças que alcançaram níveis de carga viral abaixo das 400 cópias/ml na oitava semana de terapia antiretroviral com genótipo 3435CC (59%) do que com o genótipo 3435CT (91%). Um dado deste estudo foi a resposta à terapia antiretroviral de apenas 57% em crianças com o genótipo 3435TT, que os autores consideraram não avaliáveis devido ao pequeno número de pacientes neste grupo (n=7) (HULGAN et al., 2003).

Mais recentemente, foi encontrada uma associação entre o genótipo 3435TT e uma menor probabilidade de falha virológica e de aparecimento de resistência em doentes tratados com efavirenz (HAAS et al., 2005). Em outros estudos, não encontraram diferenças na queda da carga viral entre os genótipos do exon 26

(3435C>T) e exon 21 (2677G>T) em 31 pacientes no estudo ACTG315 (HASS et al., 2003). Nasi et al. não encontraram relação entre o polimorfismo 3435C>T e o aumento da carga viral ou o aumento de CD4 em 3 e 6 meses do início do tratamento antiretroviral (NASI et al., 2003). No estudo de Verstuyft et al. não houve associação entre os genótipos dos polimorfismos do exon 21 e do exon 26 e a resposta ao tratamento (VERSTUYFT et al., 2005).

Berruet et al realizaram um estudo para pesquisar a relação entre a atividade funcional da P-gp e a evolução da infecção pelo HIV, com 185 pacientes com infecção pelo HIV e concluiu que ocorre uma relação inversa entre a atividade da P-gp e a carga viral (BERRUET et al., 2005). Na análise multivariada deste estudo, a atividade de P-gp não está associada com outras variáveis demográficas e terapêuticas, sugerindo que a P-gp apresentou por si só uma atividade inibidora sobre a replicação viral.

As diferenças entre os dados obtidos *in vitro* e *in vivo* têm sido atribuídos à superexpressão de P-gp. *In vitro*, a P-gp pode ser expressa mais de mil vezes do que em células mononucleares do sangue periférico. Bleiber et al. analisaram a superexpressão dos diferentes genótipos de MDR1 e sua relação com a permissividade de células T CD4+ de 128 doadores de sangue saudáveis para HIV-1 e o papel que os alelos de *MDR1* nos exons 21 e 26 possuem em modificar a progressão da doença em 411 indivíduos infectados pelo HIV-1. Diferenças fisiológicas nos níveis de expressão de *MDR1* não modificam a infecção de HIV-1 *in vitro*, nem os alelos e haplótipos do *MDR1* têm significativa influência na permissividade de infecção *in vitro* ou na progressão da doença *in vivo* antes do início do tratamento (BLEIBER et al., 2004).

Em um estudo realizado por Zhu et al., foi avaliado o efeito dos SNPs na recuperação da contagem de células CD4 em resposta ao tratamento antiretroviral

com inibidores da protease e obtiveram dados estatisticamente significativos que sugerem fortemente uma associação marginal com o SNP 1236*MDR1*, mas não dos 2677 e 3435 (ZHU et al., 2004).

Bellusci et al., num estudo de progressão da AIDS em crianças na Argentina, concluíram que não houve associação entre os genótipos de *MDR1* e a transmissão vertical de HIV-1. No entanto, um efeito protetor contra a progressão para a AIDS estava associado com os genótipos 3435CT, 1236CT e 1236TT ( $P < 0,005$ ,  $P = 0,024$  e  $P = 0,026$ , respectivamente). Além disso, a análise de pares de haplótipos mostrou que o 3435CT/1236CT e o 3435CT/1236TT exerceram uma importante proteção contra a progressão para a AIDS pediátrica ( $P = 0,0025$  e  $P = 0,006$ , respectivamente) (BELLUSCI et al., 2010).

Embora haja controvérsia quanto à importância biológica dos polimorfismos de *MDR1*, a maioria dos relatos concorda que há uma associação entre genótipos específicos ou haplótipos dos polimorfismos dos exons 12, 21 e 26 na permissividade de infecção pelo HIV-1 sem o seu papel no transporte da droga (FELLEY et al. 2002; HASS et al., 2003; HASS et al. 2005, BLEIBER et al., 2005; BELLUSCI et al., 2010).

O presente estudo teve como objetivo realizar um estudo farmacogenético de associação entre polimorfismos do gene *MDR1* de 81 indivíduos HIV-positivo virgem de tratamento que iniciaram HAART incluindo efavirenz e as respostas virológica e imunológica observadas.

## 1.2. OBJETIVOS

### 1.2.1 Objetivo Geral

Realizar um estudo farmacogenético para investigar o papel dos polimorfismos 1236C>T, 2677G>T e 3435C>T do gene *MDR1* no tratamento inicial de indivíduos portadores de HIV-1 incluindo o antiretroviral Efavirenz, relacionando os genótipos identificados com as respostas virológica e imunológica ao tratamento.

### 1.2.2 Objetivos Específicos

- a) Avaliar a carga viral [número de cópias/ml] e níveis de linfócitos T CD4 positivos [células CD4/mm<sup>3</sup>] no início do tratamento com terapia antiretroviral incluindo Efavirenz em pacientes HIV positivos e nos três e seis meses após o início de tratamento
- b) Estimar a frequência genotípica dos SNPs 1236C>T, 2677G>T e 3435C>T do gene *MDR1* dos pacientes HIV positivos.
- c) Verificar a associação dos genótipos *MDR1* com a carga viral e níveis de células T CD4+ nos três e seis primeiros meses de tratamento.

### 1.3 HIPÓTESE

Os polimorfismos 1236C>T, 2677G>T e 3435C>T do gene *MDR1* influenciam na resposta terapêutica de indivíduos HIV-positivos, sendo que indivíduos com os genótipos 1236 TT, 2677 TT e 3435 TT apresentam um aumento das células T CD4 e uma diminuição da carga viral após 3 e 6 meses de tratamento com HAART incluindo efavirenz no esquema terapêutico.

## CAPÍTULO 2 - ARTIGO

### Periodic – Antiviral Therapy

**Title – The SNP 3435C>T MDR1 gene is associated with CD4 + cells count in HIV-positive patients from Brazil.**

Jane Dagmar Pollo Renner<sup>1\*</sup>, Lia Gonçalves Possuelo<sup>1</sup>, Andréia Rosane de Moura Valim<sup>1</sup>, Raquel Zagonel<sup>1</sup>, Clarice Sampaio Alho<sup>2</sup>, Virginia Minghelli Schmitt<sup>2\*</sup>

Address: <sup>1</sup>Departamento de Biologia e Farmácia, Universidade de Santa Cruz (UNISC), Av. Independência 2293, Santa Cruz do Sul, RS, Brazil. <sup>2</sup>Faculdade de Farmácia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Av. Ipiranga, 6681, Pd12, Porto Alegre, RS, Brazil

Email: Jane D. P. Renner\* - janerenner@unisc.br, Virgínia Minghelli Schmitt – vmschmitt@pucrs.br

\* Corresponding author

Running head: *MDR1* SNPs and antiretroviral therapy

### Abstract

**Objective:** In a prospective study of HIV-infected patients, we investigated the influence of *MDR1* genotype for three different polymorphisms (1236C>T, 2677G>T, 3435C>T) on the virological and immunological responses to treatment of naïve patients initiating a highly active antiretroviral therapy (HAART) with one nucleoside reverse transcriptase inhibitor (NRTI), zidovudine (AZT), and two non nucleoside reverse transcriptase inhibitor (NNRTI), efavirenz (EFV) and lamivudine (3TC).

**Methods:** *MDR1* genotype was analyzed in 81 patients attending the Municipal Center for Serology Assistance (CEMAS) in Santa Cruz do Sul, Brazil, who started HAART between 2008 and 2010. CD4 cell count and viral load were obtained at baseline, 12 and 24 weeks post therapy initiation. *MDR1* genotypes were determined polymerase chain reaction followed by analysis of restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP).

Results: Patients with *MDR1* 3536TT genotype had at 12 and 24 weeks pti a significantly higher increase in CD4 cell count (343 cells/mm<sup>3</sup>) compared to baseline than patients with CT (313 cells/mm<sup>3</sup>) and CC (231 cells/mm<sup>3</sup>) genotypes (p<0.001). No statistically significant difference on CD4 cell count was observed for SNP 1236C>T or 2677G>T. For virological response, based on viral load at 12 and 24 weeks pti compared to baseline, no significant difference was observed for *MDR1* tested genotypes.

Conclusion: A significant association was observed between *MDR1* 3536TT genotype and increase in CD4+ cell count at 12 and 24 weeks of treatment compared to baseline. Our data showed that the presence of allele 3435T is associated with higher CD4+ cell count since baseline. According to our knowledge, this is the first report in Brazil assessing prospectively CD4 count and viral load in HIV-1 positive naïve patients. Further studies are needed on *MDR1* transporters polymorphisms, as P-glycoprotein, as well as other enzymes involved in drug metabolism, to elucidate and improve understanding on the role of pharmacogenetics on HIV HAART response, targeting optimization of a successful treatment.

**Keywords:** *MDR1* gene, *ABCB1* gene, polymorphism, antiretroviral therapy.

## BACKGROUND

P-glycoprotein (P-gp), the protein product of *Multidrug Resistance (MDR1)* gene, is a 170kD protein first identified in a cancer cell line [1]. P-gp belongs to the adenosine triphosphate-binding cassette (ABC) super family of membrane transporters involved in active transport of a wide spectrum of substrates through lipid bilayers. REF

P-gp is found in the canalicular surface of hepatocytes, on the apical surface of proximal tubular cells in kidneys, and on the brush border surface of enterocytes [2]. It is also expressed in the epithelium of the brain choroid plexus (which forms the blood–cerebrospinal fluid barrier), on the luminal surface of blood capillaries of the brain (blood-brain barrier), besides other tissues known to have blood-tissue barriers, such as the placenta, the ovaries, and the testes [3]. In addition, P-gp has been detected in hematopoietic stem cells, peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), mature macrophages, natural killer cells, antigen presenting dendritic cells, and T and B lymphocytes [4,5].

A consequence of its wide distribution and localization, P-gp can influence the uptake of a drug from gastrointestinal tract, its distribution and elimination by excretion in urine or bile, as well as its access penetration to the brain or fetus [3]. Some HIV-1 protease inhibitors are P-gp substrates, and therefore P-gp expression and activity are of high clinical relevance [2- 6].

Oral absorption and tissue penetration of non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor (NNRTI) are affected by the drug transporter P-gp [2]. Polymorphisms in the MDR1 gene can be associated with differences in P-gp activity and, thus, in drug disposition. As a consequence, the association between allelic variance of MDR1 gene and NNRTI plasma concentrations was studied with no conclusive results [6-8].

Fellay *et al.* analyzed the association between Efavirenz (EFV) plasma levels and allelic variants of *MDR1* gene and several other genes. Patients with the *MDR1* 3435TT genotype 6 months after starting treatment had a greater rise in CD4-cell count (257 cells/ $\mu$ L) than patients with the CT (165 cells/ $\mu$ L) and CC (121 cells/ $\mu$ L) genotype ( $p=0.0048$ ), and the best recovery of naïve CD4 cells [6]. EFV drug levels were also significantly lower in patients with CYP2D6 extensive-metabolizer TT alleles. Although in this study patients with the MDR1TT genotype had also a greater rise in CD4 cell count, this was not confirmed in subsequent studies [7-11].

Is the first study in Brazil in HIV-1 positive that investigated the influence of *MDR1* polymorphisms on the virological and immunological response the progression of HIV infection *in vivo* before the initiation of EFV antiretroviral treatment.

## **METHODS**

### **Patients**

This was a prospective cohort study carried out between March 2008 and March 2010. A total of 81 HIV-1 infected patients started antiretroviral therapy and clinically followed at the Municipal Center for Serology Assistance (CEMAS) in Santa Cruz do Sul, Brazil. Inclusion criteria were adult patients (>18 years) naïve of treatment with antiretroviral drugs, HAART with two NRTIs plus one NNRTI (namely EFV), HIV load and CD4 cell count determined 12 and 24 weeks after initiation of therapy performed in the laboratory accredited on the CEMAS. CD4 and CD8 T-lymphocyte subpopulation counting was performed by flow cytometry using the FACSCount system (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). HIV-1 viral load was



performed using the NASBA technique (Biomerieux, Marcy l'Etoile, France), no patient was in use of co-medication characterized as substrate or inhibitor of P-gp.

Treatment was based on current international treatment guidelines [16]. The study protocol (number 2215/08) was approved by the Ethics Committee of the University of Santa Cruz do Sul, Rio Grande do Sul, Brazil, and informed written consent was obtained from all patients. Exclusion criteria were: presence of clinically and laboratory confirmed liver chronic disease, results of liver function tests prior to the beginning of treatment twofold higher than the upper normal limit.

Clinical and epidemiological data, such as age, sex, skin color (selfreported), alcohol abuse (according to CAGE criteria [17]), and use of another co-medication, were obtained by application of a standard questionnaire or patient's medical record access. Treatment adherence was evaluated by pill counting, frequency of medical appointment attendance, and information from medical records on regularity of pill taking.

### **Genotype analysis**

Venous blood (5 mL) was obtained from each participant and DNA extracted with Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega) according to manufacturer's instructions. *MDR1* genotypes for polymorphisms (SNPs) 1236C>T (rs1128503), 2677G>T (rs2032582) and 3435C>T (rs1045643) were determined by polymerase chain reaction followed by analysis of restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). PCR conditions, primer sequences, restriction enzymes, and fragment length analysis were carried out according to Cascorbi et al. [12]. A total of 8 random samples for each investigated polymorphism were PCR amplified, eletrophoresed on 2% agarose gel, bands were cut and purified according to the DNA GFX purified band kit (GE Health Care) and sequenced according to the MegaBace protocols to confirm PCR–RFLP results.

### **Statistical analysis**

Statistical analyses were performed using Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) v. 12.0 (SPSS, Chicago, IL) and EPIINFO v. 6.04d (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA). Results are expressed as mean  $\pm$  standard deviation (SD) or as absolute value and percentage. Data were analyzed by Kruskal-Wallis or Mann-Whitney test. Due to the small sample size a nonparametric

test was used. A P-value of 0.05 was considered to be significant. The observed genotypic frequencies were tested for Hardy–Weinberg equilibrium (HWE).

## RESULTS

### Study population

A total of 81 HIV-infected patients attending CEMAS at Santa Cruz do Sul had DNA specimens available for analysis. Population characteristics are summarized in Table 1.

### MDR1 polymorphisms

Patients' DNA was analyzed to identify 1236C>T, 2677G>T>A and 3435C>T *MDR1* variants allele and genotype frequencies of the study population are presented in Table 2.

Genotypic frequencies *MDR* SNP 1236 in exon 12 were: 0.64 for 1236 CC, 0.34 for 1236 CT and 0.01 for 1236TT. Allelic frequencies were: 0.815 and 0.185 for C and T, respectively. Genotypic frequencies did not significantly different from the expected distribution at HWE due to a higher frequency of 1236 CT with respect to 1236 CC and 1236T T with  $p=0.5$ .

Analysis of the 2677G>T polymorphism in exon 21 showed 46 (56.8%) patients with GG genotype, 23 (28.4%) GT and 12 (14.8%) TT. Allelic frequencies were 0.71 and 0.29 for C and T, respectively. Genotypic frequencies did not significantly differ from the expected distribution at HWE, mainly due to a higher frequency of 2677GG with respect to 2677GT and 2677TT with  $p=0.14$ .

*MDR1* SNP 3435 in exon 26 revealed 47 (58.0%) patients with CC genotype, 21 (25.9%) with CT and 13 (16.0%) with TT and allelic frequencies of 0.55 and 0.45 for C and T, respectively. The distribution data of genotyped samples shown in Genotypic frequencies did not significantly different from the expected distribution at HWE, mainly due to a higher frequency of 3435CC with respect to 3435CT and 3435TT with  $p=1.6$ .

### CD4 T cell counts and HIV-1 viral load among patients with MDR1 polymorphisms

Table 3 shows mean values of HIV-1 viral load (VL) count [log copies/ml] at baseline initiation of therapy and mean values of 12 and 24 weeks after initiation of

antiretroviral therapy. There were no significant differences of viral load decline for any of the SNP genotypes analysed.

Table 4 shows mean values of CD4 cell count at baseline initiation of therapy and mean values of CD4 cell determined at 12 and 24 weeks after initiation of therapy. No significant differences were observed among different genotypes for SNPs 1236 and 2677. However, patients with the *MDR1* 3435TT genotype had a significantly higher mean CD4-cell count at 12 and 24 weeks (343 and 533 cell/mm<sup>3</sup>, respectively) than patients with the CT (313 and 461 cell/mm<sup>3</sup>, respectively) and CC (231 and 322 cell/mm<sup>3</sup>, respectively) genotypes (p<0.001).

## DISCUSSION

The ethnic characterization of our study population showed a vast majority of European descendents, which was expected once the population of Santa Cruz do Sul is mainly of German origin, which compromised the analysis of antiretroviral therapy response association between *MDR1* polymorphisms and racial differences in *MDR1* allelic frequencies. Winzer *et al.* found in 72 HIV-1 infected patients from Germany, genotypic frequencies for *MDR1* 3435 SNP of 27.7% of CC genotype, 45.8% of CT and 26.4% of TT [7]. This study has not compared of genotypic frequencies of 3435 C>T variants the Winzer. Analysis of the 2677 SNP demonstrated 33.3% patients with GG genotype, 31.9% with GT and 25% with TT. Studies conducted in Brazil by Scheiner *et al.* in study genetics polymorphisms in Rio de Janeiro showed different allelic distribution for *MDR1* SNPs 1236 and 3435 compared with our study (SNP 1236C: 0.61 and T: 0.39; 3435C: 0.55 and T: 0.45 respectively) [18].

Recent studies have examined the relationship between polymorphic alleles of the *MDR1* gene and the course of HIV infection [6-11]. Such polymorphisms may alter the metabolism of antiretroviral medications or influence susceptibility to HIV infectivity [2]. We have investigated the impact of polymorphisms of the *MDR1* genes on the virological and immunological response of treatment with two NRTIs plus one NNRTI (namely EFV) of naïve patients.

Regarding viral load, no significant association of *MDR1* 1236, 2677 or 3435 genotypes with viraemia decay was observed during the first six months of therapy. Winzer *et al* analyzed data of 20 naïve patients and Nasi *et al.* of 46 naïve patients with identical HAART scheme as in our study and also found no association between

the MDR1 genotype at position 3435 and 2677 and plasma viral load decrease during the first six months of treatment [7,8].

The association of increase in CD4 cells with MDR1 1236 and 2677 genotypes was not significant, but there was a significant association of CD4 cells increase and genotype MDR1 3435TT compared with CC and CT at 12 and 24 weeks of treatment. Our study is consistent with results of Felley *et al.*, which found that patients with MDR1 3435TT genotype 6 months after starting treatment had a significant greater rise in CD4 cell count than patients with the CT and CC genotypes ( $p > 0.0048$ )[6].

Zhu *et al.* in a retrospective study found a relationship between the effect of SNPs on CD4 cell count recovery in response to antiretroviral treatment with PIs, and obtained a statistically significant evidence that suggested marginal association of the SNP at MDR1 1236, but not at MDR1 2677 or 3435 [13]. Patient number was 79 (similar to our study), but the class of antiretroviral used for treatment was different, which possibly explains differences in SNP association.

In a recently published study, Bellusci *et al.* found a protective effect against progression to AIDS in children with MDR1 3435CT, 1236CT and 1236TT genotypes ( $p < 0.005$ ,  $p = 0.024$  and  $p = 0.026$ , respectively)[14]. These results support the notion that P-gp plays a role in HIV-1 infection independently from its role in drug transport [14].

The MDR1 3435C>T SNP is a synonymous polymorphism. The TT genotype may have reduced translation efficiency or may lead to post-translational differences [16]. It was assumed that the T variant could result in an increase in the penetration of protease inhibitors on CD4 T cells. Besides changing the intracellular concentration of drugs, overexpression of P-gp *in vitro* has been shown to reduce the susceptibility of CD4 cells to HIV infection affecting viral fusion and possibly its release [2, 15, 16].

It has been shown that linkage disequilibrium exists between 3435C>T and 2677G>T/A polymorphisms [2]. Therefore, we investigated both SNPs in our study but analysis of a set of genotypes and haplotypes were not an isolated effect in the virological or immunological response to treatment of naïve patients (data not shown).

Our data suggest that the in MDR1 expression appear to have an influence on HIV-1 infection *in vivo*. Inclusion in the genotype/haplotype analysis of the exon 12 (1236C>T) and exon 21 (2677G>T) should not alter our overall results and

conclusion; however, we conclude that in vivo of the estimated time for CD4+ counts in 12 and 24 weeks increased significantly in the *MDR1* 3435TT genotype ( $p < 0.001$ ) compared with *MDR1* 3435CC.

## **CONCLUSIONS**

No evidence was found for an association between *MDR1* 1236C>T and 2677G>T and 3435C>T polymorphisms and virological response to therapy in HIV-positive drug-naïve patients treated with HAART consisting of two NRTIs and one NNRTI (namely EFV). However, a significant increase in CD4 count was observed in 3435TT individuals after 12 and 24 weeks of treatment compared to baseline. We conclude that the *MDR1* gene SNP 3435C>T, and not the SNPs 1236C>T and 2677G>T, is associated with recovery of CD4+ cells in HIV-positive patients after 12 and 24 weeks of HAART including Efavirenz . Further studies on additional polymorphisms, whether associated or not with those analysed in this study, are needed to elucidate the actual role of pharmacogenetics in HIV therapy.

**Table 1:** Characteristics of studied population

<b>Characteristics</b>	<b>Value</b>
Number of patients, n	81
Sex (female/male), n	48/33
Age (years), [mean ( $\pm$ SD)]	38.49 ( $\pm$ 10.27)
Ethnicity [European descendent / African descendent]	62/19
IRC, n (%)	1 (1,2)
Liver disease, n (%)	0 (0)
HBV, n (%)	3 (3.7)
HCV, n (%)	5 (6.2)
IDU, n (%)	9 (11.1)
Alcohol, n (%)	8 (9.9)
Body mass index (kg <sup>2</sup> /cm), [mean ( $\pm$ SD)]	19.46 ( $\pm$ 3.63)

**Table 2.** Allele and genotype frequencies for the 3 studied SNPs of MDR1 gene

Location	Position	Allele	Effect	Frequency %	Genotype	Frequency %	HWE
<b>MDR1 1236 Exon 12</b>	rs1128503	C	Wobble	81.5	CC	64.2	YES
		T		18.5	CT	34.6	
					TT	1.2	
<b>MDR1 2677 Exon 21</b>	rs2032582	G	893Ala	71.0	GG	56.8	YES
		T	893Ser	29.0	GT	28.4	
				TT	14.8		
<b>MDR1 3435 Exon 26</b>	rs1045643	C	Wobble	71.0	CC	58.0	YES
		T		29.0	CT	26.0	
					TT	16.0	

HWE: Hardy–Weinberg equilibrium

**Table 3: Viral load [log copies/ml] at baseline, week 12 and 24 after initiation of antiretroviral therapy with respect to genotypes of MDR1 1236, 2677 and 3435 SNPs**

		No. (%)	BASELINE	12 WEEK	24 WEEK
			MEAN ± SD	MEAN ± SD	MEAN ± SD
		<b>81 (100)</b>			
<b>MDR1 1236</b>	<b>CC</b>	52 (64.2)	4.45 ± 1.2	2.20 ± 2.0	0.80 ± 1.0
	<b>CT</b>	28 (34.6)	3.58 ± 1.6	2.26 ± 1.4	0.59 ± 0.9
	<b>TT</b>	1 (1.2)	4.95	0.00	0.00
	<b>TT+CT</b>	29 (36.0)	4.15 ± 1.3	2.18 ± 1.5	0.57 ± 0.8
		<b>81 (100)</b>			
<b>MDR1 2677</b>	<b>GG</b>	46 (56.8)	4.15 ± 1.4	2.32 ± 1.8	0.83 ± 1.1
	<b>GT</b>	23 (28.4)	4.20 ± 1.4	2.29 ± 1.9	0.71 ± 0.8
	<b>TT</b>	12 (14.8)	4.07 ± 1.2	1.54 ± 2.0	0.27 ± 0.7
	<b>TT+GT</b>	35 (43.0)	4.16 ± 1.3	2.03 ± 1.9	0.56 ± 0.8
		<b>81 (100)</b>			
<b>MDR1 3435</b>	<b>CC</b>	47 (58.0)	4.20 ± 1.3	2.36 ± 1.8	0.75 ± 0.9
	<b>CT</b>	21 (26.0)	3.96 ± 1.5	1.85 ± 1.8	0.63 ± 1.0
	<b>TT</b>	13 (16.0)	4.29 ± 1.2	2.14 ± 2.2	0.74 ± 1.0
	<b>TT+CT</b>	34 (42.0)	4.08 ± 1.4	1.96 ± 1.9	0.67 ± 1.0

Statistical analysis was performed with Kruskal-Wallis test for the three genotypes (CC vs CT vs TT) and Mann-Whitney test for the genotypic group (CC vs CT+TT).



**Table 4: CD4-cell count [cells/mm<sup>3</sup>] at baseline, week 12 and 24 after initiation of antiretroviral therapy with respect to genotypes of MDR1 1236, 2677 and 3435 SNPs.**

		No. (%)	BASELINE	12 WEEKS	24 WEEKS
			MEAN ± SD	MEAN ± SD	MEAN ± SD
		<b>81 (100)</b>			
<b>MDR1 1236</b>	<b>CC</b>	52 (64.2)	138 ± 43.7	267 ± 106.4	401 ± 136.0
	<b>CT</b>	28 (34.6)	143 ± 44.0	273 ± 96.3	370 ± 122.1
	<b>TT</b>	1 (1.2)	153.0	381.0	492.0
	<b>TT+CT</b>	29 (36.0)	143 ± 43.3	277 ± 96.7	375 ± 122.0
		<b>81 (100)</b>			
<b>MDR1 2677</b>	<b>GG</b>	46 (56.8)	138 ± 44.2	273 ± 95.7	398 ± 132.4
	<b>GT</b>	23 (28.4)	146 ± 43.6	274 ± 126.5	395 ± 144.1
	<b>TT</b>	12 (14.8)	138 ± 42.0	253 ± 80.9	363 ± 102.5
	<b>TT+GT</b>	35 (43.0)	143 ± 42.6	267 ± 112.2	384 ± 130.7
		<b>81 (100)</b>			
<b>MDR1 3435</b>	<b>CC</b>	47 (58.0)	134 ± 41.6	231 ± 69.5**	322 ± 86.5**
	<b>CT</b>	21 (26.0)	148 ± 42.3	313 ± 140.7**	461 ± 113.4**
	<b>TT</b>	13 (16.0)	147 ± 51.1	343 ± 61.0**	533 ± 122.5**
	<b>TT+CT</b>	34 (42.0)	148 ± 45.1	325 ± 116.5**	489 ± 120.5**

Statistical analysis was performed with Kruskal-Wallis test for the three genotypes (CC vs CT vs TT) and Mann-Whitney test for the genotypic group (CC vs CT+TT). \*\*p<0,001

## References

- 1- Juliano R.L., Ling V.: A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim. Biophys. Acta*, 1976, 455, 152–162.
- 2- Marzolini C, Paus E, Buclin T, Kim RB. Polymorphisms in human MDR1(P-glycoprotein): recent advances and clinical relevance. *Clin Pharmacol Ther.*2004 Jan;75(1):13-33. Review.
- 3- Cianfriglia M, Dupuis ML, Molinari A, Verdoliva A, Costi R, Galluzzo CM, Andreotti M, Cara A, Di Santo R, Palmisano L. HIV-1 integrase inhibitors are substrates for the multidrug transporter MDR1-P-glycoprotein. *Retrovirology*. 2007 Mar 7;4:17.
- 4- Ambdukar S.V., Dey S., Hrycyna C.A., Ramachandra M., Pastan I., Gottesman M.M.: Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1999, 39, 361–398.
- 5- Kim RB. MDR1 single nucleotide polymorphisms: multiplicity of haplotypes and functional consequences. *Pharmacogenetics* 2002; 12:425–7.
- 6- Fellay J., Marzolini C., Meaden E.R., Back D.J., Buclin T., Chave J.P., Decosterd L.A., Furrer H., Opravil M., Pantaleo G., Retelska D., Ruiz L., Schinkel A.H., Vernazza P., Eap C.B., Telenti A.: Response to antiretroviral treatment in HIV-1-infected individuals with allelic variants of the multidrug resistance transporter 1: a pharmacogenetics study. *Lancet*, 2002, 359, 30–36.
- 7- Winzer R, Langmann P, Zilly M, Tollmann F, Schubert J, Klinker H, Weissbrich B. No influence of the P-glycoprotein polymorphisms MDR1 2677G>T/A and 3435C>T on the virological and immunological response in treatment naïve HIV-positive patients. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2005 Jan 20;4:3.
- 8- Nasi M, Borghi V, Pinti M, Bellodi C, Lugli E, Maffei S, Troiano L, Richeldi L, Mussini C, Esposito R, Cossarizza A. MDR1 3435C>T genetic polymorphism does not influence the response to antiretroviral therapy in drug-naïve HIV-positive patients. *AIDS*. 2003 Jul 25;17(11):1696-8.

- 9- Haas DW, Wu H, Li H, Bosch RJ, Lederman MM, Kuritzkes D, Landay A, Connick E, Benson C, Wilkinson GR, Kessler H, Kim RB. MDR1 gene polymorphisms and phase 1 viral decay during HIV-1 infection: an adult AIDS Clinical Trials Group study. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2003 Nov 1;34(3):295-8.
- 10- Haas DW, Smeaton LM, Shafer RW, Robbins GK, Morse GD, Labbe L, Wilkinson GR, Clifford DB, D'aquila RT, De Gruttola V, Pollard RB, Merigan TC, Hirsch MS, George AI Jr, Donahue JP, Kim RB Pharmacogenetics of long-term responses to antiretroviral regimens containing Efavirenz and/or Nelfinavir: an Adult Aids Clinical Trials Group Study. *J Infect Dis* 2005 Dec 1;192(11):1931-42.
- 11-Verstuyft C, Marcellin F, Morand-Joubert L, Launay O, Brendel K, Mentré F, Peytavin G, Gérard L, Becquemont L, Aboulker JP; ANRS081 Study Group. Absence of association between MDR1 genetic polymorphisms, indinavir pharmacokinetics and response to highly active antiretroviral therapy. *AIDS* 2005 Dec 2;19(18):2127-31.
- 12-Cascorbi I, Gerloff T, John A, Meisel C, Hoffmeyer S, Schwab M, Schaeffeler E, Eichelbaum M, Brinkmann U, Roots I. Frequency of single nucleotide polymorphisms in the P-glycoprotein drug transporter MDR1 gene in white subjects. *Clin Pharmacol Ther* 2001 Mar;69(3):169-74.
- 13-Zhu D, Taguchi-Nakamura H, Goto M, Odawara T, Nakamura T, Yamada H, Kotaki H, Sugiura W, Iwamoto A, Kitamura Y. Influence of single-nucleotide polymorphisms in the multidrug resistance-1 gene on the cellular export of nelfinavir and its clinical implication for highly active antiretroviral therapy. *Antivir Ther* 2004 Dec;9(6):929-35.
- 14-Bellusci CP, Rocco CA, Aulicino PC, Mecikovsky D, Bologna R, Sen L, Mangano A. MDR1 3435T and 1236T alleles delay disease progression to pediatric AIDS but have no effect on HIV-1 vertical transmission. *AIDS* 2010 Mar 27;24(6):833-40.
- 15-Lee CG, Ramachandra M, Jeang KT, Martin MA, Pastan I, Gottesman MM. Effect of ABC transporters on HIV-1 infection: inhibition of virus production by the MDR1 transporter. *FASEB J* 2000;14:516-22.

- 16-Speck RR, YU XF, Hildreth J, Flexner C. Differential effects of P-glycoprotein and multidrug resistance protein-1 on productive human immunodeficiency virus infection. *J Infect Dis* 2002;186:332-40.
- 17-Mayfield D, McLeod G, Hall P (1974) The CAGE questionnaire: validation of a new alcoholism screening instrument. *Am J Psychiatry* 131:1121
- 18- Scheiner MA, Damasceno AM, Maia RC. ABCB1 single nucleotide polymorphisms in the Brazilian population. *Mol Biol Rep.* 2010 Jan;37(1):111-8. Epub 2009 May 13.

## **CAPÍTULO 3**

### **CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÃO**

### 3.1 Considerações Finais

A terapia antiretroviral para infecção pelo HIV está disponível desde a introdução e aprovação da zidovudina em 1986. Desde lá, aproximadamente 20 fármacos pertencentes a 4 diferentes classes de fármacos estão disponíveis para o tratamento da infecção pelo HIV (HAMMER et al., 2008).

O uso de uma combinação de fármacos antiretrovirais para fornecer ao paciente uma terapia mais potente tem impactado na morbidade e mortalidade associadas à infecção pelo HIV e à AIDS. Entretanto, estudos clínicos tem aumentando as possibilidades na seleção e gerenciamento dos regimes antiretrovirais (ART), incluindo a escolha de terapias mais eficazes para evitar a toxicidade pelos fármacos e o impacto das interações farmacológicas. Apesar da introdução da genotipagem viral e da combinação de dados farmacocinéticos da terapia, a investigação de fatores genéticos do hospedeiro que têm grande impacto, tanto na eficácia quanto na toxicidade dos ART, pode também auxiliar na seleção de melhores regimes para cada pacientes (FLEXNER, 2007).

É amplamente reconhecido que todas as classes de ART têm múltiplos efeitos além da supressão da replicação viral e estão associados com muitos efeitos adversos, alguns dos quais podem ameaçar a vida do paciente. Até recentemente, entretanto, não estão claros os motivos pelos quais alguns pacientes desenvolvem toxicidade, enquanto outros, que utilizando esquemas terapêuticos idênticos, não o fazem. Múltiplos fatores contribuem para este fenômeno, incluindo a adesão à terapia, outras doenças concomitantes, e interações medicamentosas; apesar destes fatores, respostas completas ainda não foram observadas quando estes fatores são controlados. Embora muitas variáveis influenciem na resposta aos ART, evidências apontam para variações genéticas do hospedeiro, que podem estar

fortemente associadas com os diferentes perfis de resposta aos ART (KLIMAS et al., 2008).

Se considerarmos o problema atual da AIDS em nosso meio e as graves implicações dos efeitos adversos na condução satisfatória dos casos, se evidencia a necessidade de estudos que abordem não só os possíveis fatores extrínsecos associados, mas também os fatores genéticos potencialmente relevantes (FLEXNER, 2008; HAMMER et al., 2008).

Nas últimas décadas, vem se consolidando o conceito de que variações no genoma humano são determinantes importantes que influenciam na susceptibilidade a doenças infecciosas, sendo responsáveis pela grande variação interindividual na resposta imune do hospedeiro após infecções, bem como na resposta a diferentes fármacos (HASS et al., 2005). A existência de grandes diferenças populacionais, bem como de pequenas variabilidades intrínsecas ao paciente, é consistente com a possibilidade de a herança genética ser um determinante na resposta aos fármacos. Estima-se que fatores genéticos sejam responsáveis por 20 a 95% da variabilidade na biodisponibilidade e efeitos terapêuticos dos fármacos (EVANS et al., 2003).

Em geral, dois tipos de variantes genéticas são descritas: polimorfismos e mutações. Mutações são geralmente definidas como alterações no DNA (ácido desoxirribonucléico) que estão associadas à doença, ocorrendo em raros pacientes (geralmente em menos de 1%). Polimorfismos, por outro lado, são variações comuns no DNA que geralmente ocorrem em muito mais de 1% da população estudada (WEINSHILBOUM, 2003). A maioria dos polimorfismos ocorre em nucleotídeos individuais, sendo chamados de polimorfismos de um único nucleotídeo (do inglês *Single-Nucleotide Polymorphisms* - SNPs). Outros polimorfismos ocorrem como repetições de dinucleotídeos ou como grandes inserções ou deleções. Alguns destes polimorfismos ocorrem em regiões codificantes dos genes, que podem ou

não mudar o aminoácido codificado, outros ocorrem em regiões não codificantes, mas podem modular a expressão de genes individuais (WEINSHILBOUM, 2003).

A Glicoproteína P (P-gp) é codificada pelo gene *MDR1*, que foi extensivamente estudado em função do fenótipo relacionado a drogas multirresistentes em certos cânceres. Portanto, uma expressão constitutiva deste transportador é normal em tecidos como no cérebro, nos túbulos renais, no intestino, na placenta, nos ovários e nos linfócitos, e tem um importante papel na disposição e na resposta das drogas (TOZZI, 2010).

A heterogeneidade genética, associada aos SNPs do gene *MDR1* tem recebido significativa atenção como um potencial determinante da variabilidade na disponibilidade e eficácia das drogas (CRESSEY, 2007).

A resposta à terapia antiretroviral tem sido estudada em relação os polimorfismos do *MDR1*. A absorção oral e a penetração nos tecidos dos ITRNNs são afetadas pelo transportador P-gp (CRESSEY, 2007). Fellay et al. encontraram relação entre a expressão de P-gp em células mononucleares periféricas em pacientes HIV positivos e a resposta dos linfócitos CD4 ao tratamento. Pacientes com a variante alélica 3435C>T no exon 26 do gene *MDR1* tiveram um significativo aumento das células CD4 após 6 meses da terapia antiretroviral. Foi levantada a hipótese de que este benefício associado ao alelo T poderia resultar da aumentada penetração na célula do antiretroviral e aumentada concentração dentro do linfócito CD4. Além disso, tem sido demonstrado que o efeito da superexpressão da P-gp *in vitro* nas células humanas resulta em redução da suscetibilidade da infecção pelo HIV por afetar a fusão e possível liberação viral (FELLAY et al., 2002; LEE et al., 2000; SPECK et al., 2002).



O presente estudo incluiu, de forma prospectiva, 81 indivíduos HIV positivos que faziam tratamento triplo com 2 ITRN e 1 ITRNN, o Efavirenz, no CEMAS de Santa Cruz do Sul no período de 2008 a 2010.

A construção metodológica deste estudo levou em consideração limitações existentes e citadas nos estudos revisados, buscando superar algumas das relatadas na literatura. Porém, persistiram dificuldades associadas à realidade dos pacientes e das instituições, como o comparecimento dos pacientes para a realização dos exames nas 12 ou 24 semanas após início do tratamento, necessidade de modificação da terapia antiretroviral ou associação de novos medicamentos, ou mesmo questões associadas às técnicas laboratoriais, como inviabilidade do material genético para análise.

Não foi encontrada relação significativa dos genótipos dos polimorfismos de *MDR1* 1236C>T, 2677G>T e 3435C>T com a queda da carga viral em 12 e 24 semanas de tratamento, mas em contrapartida, a contagem de células T CD4+ teve um aumento significativo associado ao genótipo 3435TT em comparação com o genótipo 3435CC nas 12 e 24 semanas do tratamento incluindo Efavirenz. Não foi realizada a análise conjunta dos genótipos e haplótipos uma vez que a literatura relata que não apresentam efeito isolado no fenótipo. Isto foi visto por estudos que relacionaram a carga viral e a contagem de células CD4+ nos polimorfismos 2677G>T e 3435C>T e observaram uma associação mais frequente com o genótipo 3435TT, porém não significativa (WINZER et al. 2005, HASS et al., 2005). Felley et al., em 80 pacientes com infecção pelo HIV sob tratamento com abacavir e amprenavir ou abacavir, nelfinavir e saquinavir ou amprenavir encontrou um aumento significativamente maior na contagem de células T CD4+ nos pacientes com genótipo 3435TT após 3 e 6 meses do início do tratamento, e não houve diferenças na queda da carga viral entre os genótipos TT, CT e CC (FELLEY et al.,

2002). Foi sugerido nesse estudo que o alelo T (variante) poderia resultar em um aumento na penetração do inibidor de protease nas células T CD4. Além de alterar a concentração intracelular da droga, a superexpressão da P-gp *in vitro* demonstrou reduzir a susceptibilidade de células CD4 à infecção por HIV, afetando a fusão viral e possivelmente a sua liberação (LEE et al., 2000; SPECK et al., 2002).

A importância dos polimorfismos do gene MDR1 na resposta às drogas antiretrovirais ainda está pouco claro. O aumento do número de publicações sobre este tema nos últimos anos só confirma o amplo grau de interesse nessa área.

A resposta individual ao tratamento antiretroviral é um fenômeno complexo que é influenciado por um grande número de variáveis biológicas. Novos estudos sobre o papel dos polimorfismos do transportador *MDR1* e enzimas envolvidas no metabolismo de drogas são necessários para elucidar o papel dos efeitos farmacogenéticos na terapêutica para o HIV.

### 3.2 Conclusão

Os resultados deste estudo permitiram as seguintes conclusões de acordo com seus objetivos:

- O padrão de diminuição da carga viral foi similar para todos os pacientes após 12 e 24 semanas de HAART incluindo Efavirenz. A redução da carga viral em 12 e 24 semanas não se mostrou associada aos genótipos dos polimorfismos 1236C>T, 2677G>T e 3435C>T do gene *MDR1*.
- O padrão do aumento das células T CD4+ foi similar para todos os pacientes após 12 e 24 semanas de HAART incluindo Efavirenz. O aumento no número de células T CD4+ foi significativamente associado à presença do alelo 3435T, sendo mais elevado nos homozigotos 3435TT, intermediário em 3435CT e menos elevado em 3435CC. O aumento das células T CD4+ após 12 e 24 semanas de HAART incluindo Efavirenz não se mostrou associado aos genótipos dos polimorfismos 1236C>T e 2677G>T do gene *MDR1*.

## REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. *Imunologia Celular E Molecular*. Editora Elsevier, Rio de Janeiro, 2008.

AHUJA SK, KULKARNI H, CATANO G, AGAN BK, CAMARGO JF, HE W, O'CONNELL RJ, MARCONI VC, DELMAR J, ERON J, CLARK RA, FROST S, MARTIN J, AHUJA SS, DEEKS SG, LITTLE S, RICHMAN D, HECHT FM, DOLAN MJ. CCL3L1-CCR5 genotype influences durability of immune recovery during antiretroviral therapy of HIV-1-infected individuals. *Nat Med*. 2008 Apr;14(4):413-20.

AMBUDKAR SV, KIM IW, SAUNA ZE. The power of the pump: mechanisms of action of P-glycoprotein (ABCB1). *Eur J Pharm Sci*. 2006 Apr;27(5):392-400. Epub 2005 Dec 13. Review.

ANDERSEN V, OSTERGAARD M, CHRISTENSEN J, OVERVAD K, TJØNNELAND A, VOGEL U. Polymorphisms in the xenobiotic transporter Multidrug Resistance 1 (MDR1) and interaction with meat intake in relation to risk of colorectal cancer in a Danish prospective case-cohort study. *BMC Cancer*. 2009 Nov 21;9:407.

Balcerczak E, Panczyk M, Piaskowski S, Pasz-Walczak G, Sałagacka A, Mirowski M. ABCB1/MDR1 gene polymorphisms as a prognostic factor in colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis*. 2010 Oct;25(10):1167-76. Epub 2010 Jun 9.

BELLUSCI CP, ROCCO CA, AULICINO PC, MECIKOVSKY D, BOLOGNA R, SEN L, MANGANO A. MDR1 3435T and 1236T alleles delay disease progression to pediatric AIDS but have no effect on HIV-1 vertical transmission. *AIDS*. 2010 Mar 27;24(6):833-40.

BERRUET, N., S. SENTENAC, D. AUCHERE, F. GIMENEZ, R. FARINOTTI, AND C. FERNANDEZ.. Effect of efavirenz on intestinal P-glycoprotein and hepatic p450 function in rats. *J. Pharm. Pharm. Sci*. 2005; 8:226–234.

BLEIBER G, MAY M, SUÁREZ C, MARTÍNEZ R, MARZOLINI C, EGGER M, et al. MDR1 genetic polymorphism does not modify either cell permissiveness to HIV-1 or disease progression before treatment. *J Infect Dis*. 2004;189:583-6

BÖGER R.H. Drug interactions of the statins and consequences for drug selection. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2001; 39:369-82.

BONDY B, ZILL P. Pharmacogenetics and psychopharmacology. *Curr Opin Pharmacol*. 2004 Feb;4(1):72-8.

BORGES, M. Análise da ocorrência das dislipidemias em pacientes HIV positivos em uso de terapia antiretroviral atendidos em um centro de referencia em DST/HIV/AIDS na cidade de Porto Alegre. Trabalho de Conclusão de Curso para obtenção do título de especialista em Farmacologia aplicada ao câncer. ULBRA, 2005.

BRUMME ZL, DONG WW, CHAN KJ, HOGG RS, MONTANER JS, O'SHAUGHNESSY MV, ET AL. Influence of polymorphisms within the CX3CR1 and MDR-1 genes on initial antiretroviral therapy response. *AIDS*. 2003;17:201-8.

CASCORBI I, GERLOFF T, JOHNE A, MEISEL C, HOFFMEYER S, SCHWAB M, SCHAEFFELER E, EICHELBAUM M, BRINKMANN U, ROOTS I. Frequency of single nucleotide polymorphisms in the P-glycoprotein drug transporter MDR1 gene in white subjects. *Clin Pharmacol Ther.* 2001 Mar;69(3):169-74.

CHAN LM, LOWES S, HIRST BH. The ABCs of drug transport in intestine and liver: efflux proteins limiting drug absorption and bioavailability. *Eur J Pharm Sci.* 2004 Jan;21(1):25-51. Review.

CHANDLER, B., L. ALMOND, J. FORD, A. OWEN, P. HOGGARD, S. KHOO, AND D. BACK. The effects of protease inhibitors and nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors on P-glycoprotein expression in peripheral blood Mononuclear cells in vitro. *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr.* 2003, 3:551–556.

Chen B, Zhang W, Fang J, Jin Z, Li J, Yu Z, Cai W. Influence of the MDR1 haplotype and CYP3A5 genotypes on cyclosporine blood level in Chinese renal transplant recipients. *Xenobiotica.* 2009 Dec;39(12):931-8.

CHEN CJ, CLARK D, UEDA K, PASTAN I, GOTTESMAN MM, RONINSON IB. Genomic organization of the human multidrug resistance (MDR1) gene and origin of P-glycoproteins. *J Biol Chem.* 1990 Jan 5;265(1):506-14.

CHEN S, HUO X, LIN Y, BAN H, LIN Y, LI W, ZHANG B, AU WW, XU X. Association of MDR1 and ERCC1 polymorphisms with response and toxicity to cisplatin-based chemotherapy in non-small-cell lung cancer patients. *Int J Hyg Environ Health.* 2010 Mar;213(2):140-5.

CLUMECK N, VAN LUNZEN J, CHILIADE P, et al. Artemis: efficacy and safety of lopinavir (BID vs QD) and darunavir (QD) in antiretroviral-naïve patients. Presented at: 11th European AIDS Conference; October 24-27, 2007; Madrid, Spain. Abstract LBPS7/5.

COOPER D, GATELL J, ROCKSTROH J, et al. Results of BENCHMRK-1, a phase III study evaluating the efficacy and safety of MK-0518, a novel HIV-1 integrase inhibitor, in patients with triple-class resistant virus. Presented at: 14th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections; February 25-28, 2007; Los Angeles, CA. Abstract 105aLB.

CRESSEY TR, LALLEMANT M. Pharmacogenetics of antiretroviral drugs for the treatment of HIV-infected patients: an update. *Infect Genet Evol.* 2007 Mar;7(2):333-42. Epub 2006 Oct 11.

DIRSON, G., C. FERNANDEZ, P. HINDLET, F. ROUX, M. GERMAN-FATTAL, F. GIMENEZ, AND R. FARINOTTI. Efavirenz does not interact with the ABCB1 transporter at the blood-brain barrier. *Pharm. Res.* 2006; 23:1525–1532

EVANS WE, MCLEOD HL. Pharmacogenomics-drug disposition, drug targets, and side effects. *N Engl J Med.* 2003 Feb 6;348(6):538-49.

EVANS WE, RELLING MV. Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics. *Science.* 1999 Oct 15;286(5439):487-91.

EVANS WE. Pharmacogenomics: marshalling the human genome to individualise drug therapy. *Gut*. 2003 May;52 Suppl 2:ii10-8.

FELLAY J., MARZOLINI C., MEADEN E ., BACK D ., BUCLIN T., CHAVE J ., DECOSTERD L. FURRER L., OPRAVIL M ., PANTALEO G. Response to antiretroviral treatment in HIV-1-infected individuals with allelic variants of the multidrug resistance transporter 1: a pharmacogenetics study . *The Lancet*. 2002 359(9300):30 – 36.

FIGENBAUM M, DA SILVEIRA FR, VAN DER SAND CR, VAN DER SAND LC, FERREIRA ME, PIRES RC, HUTZ MH. The role of common variants of ABCB1, CYP3A4, and CYP3A5 genes in lipid-lowering efficacy and safety of simvastatin treatment. *Clin Pharmacol Ther*. 2005 Nov;78(5):551-8.

FLEXNER, C. HIV drug development: the next 25 years. *Nat Rev Drug Discov*. 2007 Dec;6(12):959-66. Review.

FLEXNER, C. HIV-Protease Inhibitors. *N ENGL J. MED*. 1998; 388: 1281 – 92

FOJO A, LEBO R, SHIMIZU N, CHIN JE, RONINSON IB, MERLINO GT, GOTTESMAN MM,PASTAN I. Localization of multidrug resistance-associated DNA sequences to human chromosome 7. *Somat Cell Mol Genet*. 1986 Jul;12(4):415-20.

FORD, J., E. R. MEADEN, P. G. HOGGARD, M. DALTON, P. NEWTON, I. WILLIAMS, S. H. KHOO, AND D. J. BACK. Effect of protease inhibitor-containing regimens on lymphocyte multidrug resistance transporter expression. *J. Antimicrob. Chemother*. 2003;.52:354–358.

FUNG KL, GOTTESMAN MM. A synonymous polymorphism in a common MDR1 (ABCB1) haplotype shapes protein function. *Biochim Biophys Acta*. 2009 May;1794(5):860-71. Epub 2009 Mar 11. Review.

GABRIEL SB, SCHAFFNER SF, NGUYEN H, MOORE JM, ROY J, BLUMENSTIEL B, HIGGINS J, DEFELICE M, LOCHNER A, FAGGART M, LIU-CORDERO SN, ROTIMI C, ADEYEMO A, COOPER R, WARD R, LANDER ES, DALY MJ, ALTSHULER D. The structure of haplotype blocks in the human genome. *Science*. 2002 Jun 21;296(5576):2225-9. Epub 2002 May 23.

GOLDSTEIN DB, TATE SK, SISODIYA SM. Pharmacogenetics goes genomic. *Nat Rev Genet*. 2003 Dec;4(12):937-47.

GOLDSTEIN DB. Pharmacogenetics in the laboratory and the clinic. *N Engl J Med*. 2003 Feb 6;348(6):553-6.

GOTO M, MASUDA S, SAITO H, UEMOTO S, KIUCHI T, TANAKA K, et al. C3435T polymorphism in the MDR1 gene affects the enterocyte expression level of CYP3A4 rather than Pgp in recipients of living-donor liver transplantation. *Pharmacogenetics* 2002;12:451-7.

GOW JM; HODGES LM, CHINN LW, KROETZ DL. Substrate-dependent effects of human ABCB1 coding polymorphisms, *J. Pharmacol. Exp. Ther*. 2008;325 435–442

GUIMARÃES MDC, ROCHA GM, CAMPOS LN *ET AL*. Difficulties reported by hiv-infected patients using antiretroviral therapy in brazil. *Clinics*, 2008, 63(2):165-172.

GÜMÜŞ-AKAY G, RÜSTEMOĞLU A, KARADAĞ A, SUNGUROĞLU A. Haplotype-based analysis of MDR1/ABCB1 gene polymorphisms in a Turkish population. *DNA Cell Biol*. 2010 Feb;29(2):83-90.

HAAS DW, SMEATON LM, SHAFER RW, ROBBINS GK, MORSE GD, LABBE L, WILKINSON GR, CLIFFORD DB, D'AQUILA RT, DE GRUTTOLA V, POLLARD RB, MERIGAN TC, HIRSCH MS, GEORGE AL JR, DONAHUE JP, KIM RB. Pharmacogenetics of long-term responses to antiretroviral regimens containing Efavirenz and/or Nelfinavir: an Adult Aids Clinical Trials Group Study. *J Infect Dis*. 2005 Dec 1;192(11):1931-42.

HAAS DW, WU H, LI H, BOSCH RJ, LEDERMAN MM, KURITZKES D, LANDAY A, CONNICK E, BENSON C, WILKINSON GR, KESSLER H, KIM RB. MDR1 gene polymorphisms and phase 1 viral decay during HIV-1 infection: an adult AIDS Clinical Trials Group study. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2003 Nov 1;34(3):295-8..

HAMMER SM, ERON JJ JR, REISS P, SCHOOLEY RT, THOMPSON MA, WALMSLEY S, CAHN P, FISCHL MA, GATELL JM, HIRSCH MS, JACOBSEN DM, MONTANER JS, RICHMAN DD, YENI PG, VOLBERDING PA; International AIDS Society-USA. Antiretroviral Treatment of Adult HIV Infection. 2008 Recommendations of the International AIDS Society–USA Panel. *JAMA*. 2008 Aug 6;300(5):555-70

HAUBRICH RH, RIDDLE S, DIRIENZO G, et al. Metabolic outcomes of ACTG 5142: a prospective, randomized, phase III trial of NRTI-, PI-, and NNRTI-sparing regimens for initial treatment of HIV-1 infection. Presented at: 14th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections; February 25-28, 2007; Los Angeles, CA. Abstract 38.

HENRÍQUEZ-HERNÁNDEZ LA, MURIAS-ROSALES A, HERNÁNDEZ GONZÁLEZ A, CABRERA DE LEÓN A, DÍAZ-CHICO BN, MORI DE SANTIAGO M, FERNÁNDEZ PÉREZ L. Gene polymorphisms in TYMS, MTHFR, p53 and MDR1 as risk factors for breast cancer: a case-control study. *Oncol Rep*. 2009 Dec;22(6):1425-33

HITZL M, SCHAEFFELER E, HOCHER B, SLOWINSKI T, HALLE H, EICHELBAUM M, KAUFMANN P, FRITZ P, FROMM MF, SCHWAB M. Variable expression of P-glycoprotein in the human placenta and its association with mutations of the multidrug resistance 1 gene (MDR1, ABCB1). *Pharmacogenetics*. 2004 May;14(5):309-18.

HOFFMEYER S, BURK O, VON RICHTER O, ARNOLD H, BROCKMOLLER J, JOHNE A, ET AL. Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:3473-8.

HULGAN T, DONAHUE JP, HAWKINS C, UNUTMAZ D, D'AQUILA RT, RAFFANTI S, et al. Implications of T-cell P-glycoprotein activity during HIV-1 infection and its therapy. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2003;34:119-26.

HUNG CC, CHEN CC, LIN CJ, LIOU HH. Functional evaluation of polymorphisms in the human ABCB1 gene and the impact on clinical responses of antiepileptic drugs. *Pharmacogenet Genomics*. 2008 May;18(5):390-402.

ILLMER T, SCHULER U, THIEDE C, SCHWARZ U, KIM R, GOTTHARD S, et al. MDR1 gene polymorphisms affect therapy outcome in acute myeloid leukemia patients. *Cancer Res* 2002;62:4955-62.

JOHNE A, KOPKE K, GERLOFF T, MAI I, RIETBROCK S, MEISEL C, et al. Modulation of steady-state kinetics of digoxin by haplotypes of the P-glycoprotein MDR1 gene. *Clin Pharmacol Ther* 2002;72:584-94.

JULIANO RL, LING V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim Biophys Acta* 1976;455:152-62.

KERB R. Implications of genetic polymorphisms in drug transporters for pharmacotherapy. *Cancer Lett*. 2006 Mar 8;234(1):4-33. Epub 2006 Feb 28. Review.

KERR KM, SAUNA ZE, AMBUDKAR SV. Correlation between steady-state ATP hydrolysis and vanadate-induced ADP trapping in Human P-glycoprotein. Evidence for ADP release as the rate-limiting step in the catalytic cycle and its modulation by substrates. *J Biol Chem*. 2001 Mar 23;276(12):8657-64. Epub 2000 Dec 19.

KHEDRI A, NEJAT-SHOKOUHI A, SALEK R, ESMAEILI H, MOKHTARIFAR A, ENTEZARI HERAVI R, TATARI F, BEHRAVAN J, MILADPOUR B, OMIDVAR TEHRANI S. Association of the colorectal cancer and MDR1 gene polymorphism in an Iranian population. *Mol Biol Rep*. 2010 Feb 2.

KIM HJ, HWANG SY, KIM JH, PARK HJ, LEE SG, LEE SW, JOO JC, KIM YK. Association between Genetic Polymorphism of Multidrug Resistance 1 Gene and Sasang Constitutions. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2009 Sep;6 Suppl 1:73-80.

KIM R, LEAKE B, CHOO E, DRESSER G, KUBBA S, SCHWARZ U, et al. Identification of functionally variant MDR1 alleles among European Americans and African Americans. *Clin Pharmacol Ther* 2001;70:189-99.

KIMCHI-SARFATY C, OH JM, KIM IW, SAUNA ZE, CALCAGNO AM, AMBUDKAR SV, GOTTESMAN MM. A "silent" polymorphism in the MDR1 gene changes substrate specificity. *Science*. 2007 Jan 26;315(5811):525-8. Epub 2006 Dec 21. Erratum in: *Science*. 2007 Nov 30;318(5855):1382-3.

KING R, KLABE RM, REID CD, RICKSON-VIITANEN S. Potency of Nonnucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors (NNRTIs) used in Combination with Other Human immunodeficiency Virus NNRTIs, NRTIs, or Protease Inhibitors Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2002 Jun;46(6):1640-1646.

KIOKA N, TSUBOTA J, KAKEHI Y, KOMANO T, GOTTESMAN MM, PASTAN I, et al. P-glycoprotein gene (MDR1) cDNA from human adrenal: normal P-glycoprotein carries Gly185 with an altered pattern of multidrug resistance. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;162:224



- KLIMAS N, KONERU AO, FLETCHER MA. Overview of HIV. *Psychosom Med.* 2008 Jun;70(5):523-30.
- KOMAR AA. Silent SNPs: impact on gene function and phenotype. *Pharmacogenomics.* 2007 Aug;8(8):1075-80. Review.
- LEE CG, RAMACHANDRA M, JEANG KT, MARTIN MA, PASTAN I, GOTTESMAN MM. Effect of ABC transporters on HIV-1 infection: inhibition of virus production by the MDR1 transporter. *FASEB J* 2000;14:516-22.
- LEE, C. G., M. M. GOTTESMAN, C. O. CARDARELLI, M. RAMACHANDRA, K. T. JEANG, S. V. AMBUDKAR, I. PASTAN, AND S. DEY. HIV-1 protease inhibitors are substrates for the MDR1 multidrug transporter. *Biochemistry* 1998; 37: 3594–3601.
- LEHNINGER, AL; D.I. NELSON; MM. COX. *Princípios de Bioquímica.* 2º edição, São Paulo: Sarvier (reimpressão), 2000.
- MARFURT J, SMITH TA, HASTINGS IM, MÜLLER I, SIE A, OA O, BAISOR M, REEDER JC, BECK HP, GENTON B. Plasmodium falciparum resistance to anti-malarial drugs in Papua New Guinea: evaluation of a community-based approach for the molecular monitoring of resistance. *Malar J.* 2010 Jan 7;9:8. .
- MARKOWITZ M, MORALES-RAMIREZ JO, NGUYEN BY, et al. Antiretroviral activity, pharmacokinetics, and tolerability of MK-0518, a novel inhibitor of HIV-1 integrase, dosed as monotherapy for 10 days in treatment-naive HIV-1-infected individuals. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2006;43(5):509-515.
- MARKOWITZ M, NGUYEN BY, GOTUZZO E, et al. Rapid and durable antiretroviral effect of the HIV-1 integrase inhibitor raltegravir as part of combination therapy in treatment-naive patients with HIV-1 infection: results of a 48-week controlled study. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2007;46(2):125-133.
- MARZOLINI C, PAUS E, BUCLIN T, KIM RB. Polymorphisms in human MDR1 (P-glycoprotein): recent advances and clinical relevance. *Clin Pharmacol Ther.* 2004 Jan;75(1):13-33.
- MELCHIOR R, NEMES MIB, ALENCAR TMD et al. Challenges of treatment adherence by people living with HIV/AIDS in Brazil. *Rev. Saúde Pública,* 2007, Dec;41 (suppl.2):87-93.
- MENDES-CORRÊA MC, ANDRADE HF JR, TAKAKURA CF, DUARTE MI. Hepatic Ultrastructural Mitochondrial Changes Prior to Antiretroviral Therapy in
- MILLER SA, DYKES DD, POLESKY HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1988 Feb 11;16(3):1215.
- MOLINA J, ANDRADE-VILLANUEVA J, ECHEVARRIA J, CHETCHOTISAKD P, CORRAL J et al. Once-daily atazanavir/ritonavir versus twice-daily lopinavir/ritonavir, each in combination with tenofovir and emtricitabine, for management of antiretroviral-naive HIV-1-infected patients: 48 week efficacy and safety results of the CASTLE study. *The Lancet.* 2008 372(Issue 9639):646 - 655

- MONTESSORI V, PRESS N, HARRIS M, AKAGI L, MONTANER JS. Adverse effects of antiretroviral therapy for HIV infection. *CMAJ*. 2004 Jan 20;170(2):229-38.
- MORIYA Y, NAKAMURA T, HORINOUCI M, SAKAEDA T, TAMURA T, AOYAMA N, SHIRAKAWA T, GOTOH A, FUJIMOTO S, MATSUO M, KASUGA M, OKUMURA K. Effects of polymorphisms of MDR1, MRP1, and MRP2 genes on their mRNA expression levels in duodenal enterocytes of healthy Japanese subjects. *Biol Pharm Bull*. 2002 Oct;25(10):1356-9.
- MS - Ministério da Saúde. Programa Nacional de DST e AIDS. Boletim Epidemiológico, Dezembro 2007.
- MS/SVS – Ministério da saúde. Secretaria de Vigilância em saúde. Recomendações para a terapia antiretroviral em adultos e adolescentes infectados pelo HIV, 2007. Brasília: Coordenação Nacional de DST e AIDS.
- MU H, CHAI H, LIN PH, YAO Q, CHEN C. Current update on HIV-associated vascular disease and endothelial dysfunction. *World J Surg*. 2007 Apr;31(4):632-43.
- NAKAJIMA T, KIMURA A. Genetic factors that confer sensitivity to HAART in HIV-infected subjects:implication of a benefit of an earlier initiation of HAART. *Pharmacogenomics*. 2008 Sep;9(9):1347-51.
- NAKAMURA T, SAKAEDA T, HORINOUCI M, TAMURA T, AOYAMA N, SHIRAKAWA T, MATSUO M, KASUGA M, OKUMURA K. Effect of the mutation (C3435T) at exon 26 of the MDR1 gene on expression level of MDR1 messenger ribonucleic acid in duodenal enterocytes of healthy Japanese subjects. *Clin Pharmacol Ther*. 2002 Apr;71(4):297-303.
- NASI M, BORGHI V, PINTI M, BELLODI C, LUGLI E, MAFFEI S, et al. MDR1 C3435T genetic polymorphism does not influence the response to antiretroviral therapy in drug-naive HIV-positive patients. *AIDS*. 2003;17:1696-8.
- NÚÑEZ M. Hepatotoxicity of antiretrovirals: Incidence, mechanisms and management .*Journal of Hepatology* . 2006 44:132 – 139.
- SAUNA ZE, SMITH MM, MÜLLER M, AMBUDKAR SV. Evidence for the vectorial nature of drug (substrate)-stimulated ATP hydrolysis by human P-glycoprotein. *J Biol Chem*. 2001 Sep 7;276(36):33301-4. Epub 2001 Jul 12.
- OUDE ELFERINK RP, DE WAART R. Transporters in the intestine limiting drug and toxin absorption. *J Physiol Biochem*. 2007 Mar;63(1):75-81. Review.
- OWEN A, GOLDRING C, MORGAN P, CHADWICK D, PARK BK, PIRMOHAMED M. Relationship between the C3435T and G2677T(A) polymorphisms in the ABCB1 gene and P-glycoprotein expression in human liver. *Br J Clin Pharmacol*. 2005 Mar;59(3):365-70. PubMed PMID: 15752383;
- PANG T. The impact of genomics on global health. *Am J Public Health*. 2002 Jul;92(7):1077-9.

PENZAK SR, KABUYE G, MUGYENYI P, MBAMANYA F, NATARAJAN V, ALFARO RM, KITYO C, FORMENTINI E, MASUR H. Cytochrome P450 2B6 (CYP2B6) G516T influences nevirapine plasma concentrations in HIV-infected patients in Uganda. *HIV Med.* 2007 Mar;8(2):86-91.

PERALTA G, SÁNCHEZ MB, ECHEVARRÍA S, VALDIZÁN EM, ARMIJO JA. [P-glycoprotein and human immunodeficiency virus infection]. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2008 Mar;26(3):150-9. Review. Spanish.

RACHID, M; SCHECHTER, M. Manual de HIV e AIDS. 6º edição. Rio de Janeiro: Revinter, 2001.

REICH DE, CARGILL M, BOLK S, IRELAND J, SABETI PC, RICHTER DJ, LAVERY T, KOUYOUJIAN R, FARHADIAN SF, WARD R, LANDER ES. Linkage disequilibrium in the human genome. *Nature.* 2001 May 10;411(6834):199-204.

RIDDLER SA, HAUBRICH R, DIRIENZO G et al. A prospective, randomized, phase III trial of NRTI-, IP-, and NNRTI-sparing regimens for initial treatment of HIV-1 infection: ACTG 5142. XVI International AIDS Conference. Toronto, Canadá, August 2006.

RIDDLER SA, HAUBRICH RH, DIRIENZO AG, et al. Classsparing regimens for initial treatment of HIV-1 infection. *N Engl J Med.* 2008;358(20):2095-2106.

SAAG M, IVE P, HEERA J, et al. A multicenter, randomized, double-blind, comparative trial of a novel CCR5 antagonist, maraviroc versus efavirenz, both in combination with Combivir (zidovudine [ZDV]/lamivudine [3TC]), for the treatment of antiretroviral naive subjects infected with R5 HIV-1: week 48 results of the MERIT study. Presented at: 4th International AIDS Society Conference on HIV Pathogenesis, Treatment and Prevention; July 22-25, 2007; Sydney, Australia. Abstract WESS104.

SABAHI Z, SALEK R, HERAVI RE, MOSAFFA F, AVANAKI ZJ, BEHRAVAN J. Association of gastric cancer incidence with MDR1 gene polymorphism in an ethnic Iranian population. *Indian J Cancer.* 2010 Jul-Sep;47(3):317-21.

SAI K, ITODA M, SAITO Y, KUROSE K, KATORI N, KANIWA N, KOMAMURA K, KOTAKE T, MORISHITA H, TOMOIKE H, KAMAKURA S, KITAKAZE M, TAMURA T, YAMAMOTO N, KUNITOH H, YAMADA Y, OHE Y, SHIMADA Y, SHIRAO K, MINAMI H, OHTSU A, YOSHIDA T, SAIJO N, KAMATANI N, OZAWA S, SAWADA J. Genetic variations and haplotype structures of the ABCB1 gene in a Japanese population: an expanded haplotype block covering the distal promoter region, and associated ethnic differences. *Ann Hum Genet.* 2006 Sep;70(Pt 5):605-22..

SAITOH A, SINGH KK, POWELL CA, FENTON T, FLETCHER CV, BRUNDAGE R, STARR S, SPECTOR AS. An MDR1-3435 variant is associated with higher plasma nelfinavir levels and more rapid virologic response in HIV-1 infected children. *AIDS.* 2005 Mar 4;19(4):371-80.

SAKURAI A, ONISHI Y, HIRANO H, SEIGNEURET M, OBANAYAMA K, KIM G, LIEW EL, SAKAEDA T, YOSHIURA K, NIIKAWA N, SAKURAI M, ISHIKAWA T. Quantitative structure--activity relationship analysis and molecular dynamics

simulation to functionally validate nonsynonymous polymorphisms of human ABC transporter ABCB1 (P-glycoprotein/MDR1). *Biochemistry*. 2007 Jul 3;46(26):7678-93. Epub 2007 Jun 9.

SCHLECHT HP, SCHELLHORN S, DEZUBE BJ, JACOBSON JM. New approaches in the treatment of HIV/AIDS - focus on maraviroc and other CCR5 antagonists. *Ther Clin Risk Manag*. 2008 Apr;4(2):473-85.

SCHWAB M, EICHELBAUM M, FROMM MF. Genetic polymorphisms of the human MDR1 drug transporter. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2003;43:285-307.

SHAROM, F.J; YU X.; DOIGE C.A., Functional reconstitution of drug transport and ATPase activity in proteoliposomes containing partially purified P-glycoprotein, *J. Biol. Chem*. 268 (1993) 24197–24202

SIEGSMUND M, BRINKMANN U, SCHÄFFELER E, WEIRICH G, SCHWAB M, EICHELBAUM M,FRITZ P, BURK O, DECKER J, ALKEN P, ROTHENPIELER U, KERB R, HOFFMEYER S, BRAUCH H. Association of the P-glycoprotein transporter MDR1(C3435T) polymorphism with the susceptibility to renal epithelial tumors. *J Am Soc Nephrol*. 2002 Jul;13(7):1847-54..

SPECK RR, YU XF, HILDRETH J, FLEXNER C. Differential effects of P-glycoprotein and multidrug resistance protein-1 on productive human immunodeficiency virus infection. *J Infect Dis* 2002;186:332-40.

STEIGBIGEL R, KUMAR P, ERON J, et al. Results of BENCHMRK-2, a phase III study evaluating the efficacy and safety of MK-0518, a novel HIV-1 integrase inhibitor, in patients with triple-class resistant virus. Presented at: 14th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections; February 25-28, 2007; Los Angeles, CA. Abstract 105bLB.

TAHARA T, SHIBATA T, YAMASHITA H, HIRATA I, ARISAWA T. Influence of MDR1 Polymorphism on H. pylori-Related Chronic Gastritis. *Dig Dis Sci*. 2010 May 13

TAHERI M, MAHJOUBI F, OMRANIPOUR R. Effect of MDR1 polymorphism on multidrug resistance expression in breast cancer patients. *Genet Mol Res*. 2010 Jan 12;9(1):34-40.

TELENTI A. AND ZANGER U. M. Pharmacogenetics of Anti-HIV Drugs. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol*. 2008. 48:227–56

TELENTI A. New developments in laboratory monitoring of HIV-1 infection. *Clin Microbiol Infect*. 2002 Mar;8(3):137-43.

TOZZI V. Pharmacogenetics of antiretrovirals. *Antiviral Res*. 2010 Jan;85(1):190-200. Epub 2009 Sep 8. Review.

UEDA K, CARDARELLI C, GOTTESMAN MM, PASTAN I. Expression of a full-length cDNA for the human *MDR1* gene confers resistance to colchicines, doxorubicin, and vinblastine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987;84:3004-8.

URBATSCH IL, GIMI K, WILKE-MOUNTS S, SENIOR AE. Investigation of the role of glutamine-471 and glutamine-1114 in the two catalytic sites of P-glycoprotein, *Biochemistry* 39 (2000) 11921–11927

VAHAB SA, SEN S, RAVINDRAN N, MONY S, MATHEW A, VIJAYAN N, NAYAK G, BHASKARANAND N, BANERJEE M, SATYAMOORTHY K. Analysis of genotype and haplotype effects of ABCB1 (MDR1) polymorphisms in the risk of medically refractory epilepsy in an Indian population. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2009;24(3):255-60. PubMed PMID: 19571437.

VERSTUYFT C, MARCELLIN F, MORAND-JOUBERT L, LAUNAY O, BRENDEL K, MENTRE F, et al. Absence of association between MDR1 genetic polymorphisms, indinavir pharmacokinetics and response to highly active antiretroviral therapy. *AIDS.* 2005;19:2127-31.

WALMSLEY S, RUXRUNGTHAM K, SLIM J, et al. Saquinavir/ r (SQV/r) BiD versus lopinavir/r (LPV/r) BiD, plus emtricitabine/tenofovir (FTC/TDF) QD as initial therapy in HIV-1 infected patients: the GEMINI study. Presented at: 11th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections; October 24-27, 2007; Madrid, Spain. Abstract PS1/4.

WANG D, JOHNSON AD, PAPP AC, KROETZ DL, SADÉE W. Multidrug resistance polypeptide 1 (MDR1, ABCB1) variant 3435C>T affects mRNA stability. *Pharmacogenet Genomics.* 2005 Oct;15(10):693-704.

WEINSHILBOUM R. Inheritance and drug response. *N Engl J Med.* 2003 Feb 6;348(6):529-37.

WEISS, J., D. THEILE, N. KETABI-KIYANVASH, H. LINDENMAIER, AND W. E. HAEFELI.. Inhibition of MRP1/ABCC1, MRP2/ABCC2, and MRP3/ABCC3 by nucleoside, nucleotide, and non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Drug Metab. Dispos.* 2007; 35:340–344.

WEISS, J., N. WEIS, N. KETABI-KIYANVASH, C. H. STORCH, AND W. E. HAEFELI. Comparison of the induction of P-glycoprotein activity by nucleotide, nucleoside, and non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Eur. J. Pharmacol.* 2008;579:104–109.

WHO-World Health Organization. Aids Epidemic Update. UNAIDS/OMS. Dezembro, 2007. Disponível em: [www.uniaids.org](http://www.uniaids.org) acesso em 09/09/08.

WILSON JF, WEALE ME, SMITH AC, GRATRIX F, FLETCHER B, THOMAS MG, BRADMAN N, GOLDSTEIN DB. Population genetic structure of variable drug response. *Nat Genet.* 2001 Nov;29(3):265-9.

WINZER R, LANGMANN P, ZILLY M, TOLLMANN F, SCHUBERT J, et al. No influence of the P-glycoprotein genotype (MDR1 C3435T) on plasma levels of lopinavir and efavirenz during antiretroviral treatment. *Eur. J. Med. Res.* 2003 8:531–34

WYEN C, HENDRA H, VOGEL M, HOFFMANN C, KNECHTEN H, BROCKMEYER NH, BOGNER JR, ROCKSTROH J, ESSER S, JAEGER H, HARRER T, MAUSS S,

VAN LUNZEN J, SKOETZ N, JETTER A, GRONEUER C, FÄTKENHEUER G, KHOO SH, EGAN D, BACK DJ, OWEN A; German Competence Network for HIV/AIDS. Impact of CYP2B6 983T>C polymorphism on non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor plasma concentrations in HIV-infected patients. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* (2008) 61, 914–918.

ZANGER UM, TURPEINEN M, KLEIN K, SCHWAB M. Functional pharmacogenetics/genomics of human cytochromes P450 involved in drug biotransformation. *Anal Bioanal Chem.* 2008 Aug 10.

ZHU D, TAGUCHI-NAKAMURA H, GOTO M, ODAWARA T, NAKAMURA T, YAMADA H, KOTAKI H, SUGIURA W, IWAMOTO A, KITAMURA Y. Influence of single-nucleotide polymorphisms in the multidrug resistance-1 gene on the cellular export of nelfinavir and its clinical implication for highly active antiretroviral therapy. *Antivir Ther.* 2004Dec;9(6):929-35.

## **APÊNDICE 1:**

Numero do prontuário: \_\_\_\_\_ Protocolo Nº \_\_\_\_\_

### **TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO**

**Titulo do projeto: Análise de polimorfismos presentes no gene *MDR* e correlação com a resposta terapêutica em pacientes HIV positivos: um estudo farmacogenético.**

#### **Objetivos e relevância do estudo:**

Nem todos os pacientes quando tomam os remédios para o tratamento do HIV voltam a sentir-se bem e pouco se conhece sobre o porquê isto acontece. Pouco se sabe também sobre a epidemiologia do HIV em Santa Cruz do Sul. Por este motivo, o estudo está sendo realizado para avaliar epidemiologicamente a população em tratamento para HIV em Santa Cruz do Sul e para tentar descobrir se existe algum fator genético relacionado com as diferenças na resposta terapêutica.

#### **Procedimentos:**

Os voluntários que decidiram participar da pesquisa serão entrevistados para responderem algumas questões relacionadas a sua saúde, seu perfil socioeconômico, os fatores de risco que estão associados aos adoecimento por tuberculose, o consumo de bebidas alcoólicas e sintomas atuais. O voluntário será submetido a coleta de 10 mL de sangue que será realizada na face anterior do antebraço com agulha e seringa descartáveis na primeira consulta. Uma amostra de sangue será encaminhada para a realização dos testes genéticos e outra será encaminhada para os testes de carga viral e contagem de linfócitos T CD4 e CD8.

#### **Local de estudo:**

Os procedimentos de coleta de sangue e entrevista serão realizados no CEMAS no município de Santa Cruz de Sul, as análises genéticas serão realizadas na UNICS e os testes imunológicos e a carga viral serão encaminhadas para laboratório conveniado ao SUS.

**Riscos e desconfortos:**

Os riscos e desconfortos aos participantes deste estudo são aqueles associados aos procedimentos descritos acima. A coleta de sangue é de uma pequena quantidade (10 mL) e por dificilmente causará algum mal estar geral, no entanto poderá haver dor no local da coleta e eventualmente um pequeno hematoma.

**Desistência na participação de estudo:**

A participação de cada indivíduo neste estudo é voluntária, ou seja, quem não quiser participar do estudo esta livre para fazê-lo sem que haja qualquer perda no atendimento. Se concordar em participar do estudo e mudar de idéia no decorrer do mesmo, da mesma forma não sofrerá perdas relacionadas ao atendimento a que tem direito.

**Compensação financeira:**

Não haverá nenhum pagamento aos pacientes que concordarem em participar de pesquisa, bem como os participantes da pesquisa não terão nenhum custo adicional relacionado aos exames realizados.

**Confidencialidade das informações:**

Toda a informação que será fornecida pelos participantes do estudo eo resultados dos exames realizados será considerada confidencial e será somente conhecida pela equipe envolvida no estudo, isto é, não será permitido o acesso a terceiros. Todos os questionários e matérias coletados serão identificados através de um código criado na entrada do estudo, este código será a única identificação utilizada no banco de dados do estudo. Este banco de dados será utilizado para a análise dos dados e divulgação dos mesmos no meio científico.

**Perguntas e dúvidas relacionadas ao estudo:**

Este termo de consentimento explica de forma clara o estudo que está sendo proposto e convida os indivíduos a participar, no entanto se houver alguma dúvida estas poder ao ser esclarecidas pela equipe do estudo, através da Msc. Jane Dagmar Pollo Renner em qualquer momento do estudo pelo telefone 3717-7399.

**Autorização para estocagem de material biológico:**



1. Permito que a minha amostra de sangue seja guardada para ser utilizada em outra pesquisa, mediante protocolo de pesquisa autorizado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNISC, ficando, no entanto livre para solicitar a destruição da mesma, a qualquer momento, se assim desejar; **(sem minha identificação e/ou mantendo minha privacidade).**

(  ) Sim, permito.

(  ) Não permito que minha amostra seja utilizada em novos estudos.

(  ) Desejo que minha amostra seja destruída, após o fim do presente estudo.

2. Gostaria de ser comunicado de resultados que possam interessar-me

(  ) Sim, gostaria.

(  ) Não gostaria de ser comunicado de novos resultados.

**O significado da assinatura:**

A sua assinatura abaixo significa que você entendeu a informação que lhe foi fornecida sobre o estudo e sobre este termo de consentimento. Se você assinar este documento significa que você concorda em participar do estudo. Você receberá uma cópia deste termo de consentimento.

---

Assinatura do voluntário    Data:

Assinatura do entrevistador    Data:

---

Assinatura do coordenador do estudo    Data:

## APÊNDICE 2: Questionário Epidemiológico

Prontuário N°: \_\_\_\_\_

Protocolo N° \_\_\_\_\_

Data da entrevista: \_\_\_\_\_

Médico: \_\_\_\_\_

**Nota:** Toda a informação será mantida sob estrita confidencialidade. Este questionário será guardado em arquivos fechados. Seu número será a única conexão a informação coletada.

1. Origem (1) hospital (2) ambulatório

2.

Nome: \_\_\_\_\_

—

3. Endereço: \_\_\_\_\_

—

4. Bairro: \_\_\_\_\_

—

5. Cidade: (1) Santa Cruz (2) Outra \_\_\_\_\_ Telefone p/ contato

\_\_\_\_\_

6. Renda familiar (1) Sem renda (2) 1 a 3 salários mínimos (3) de 3 a 5 (4) mais de 5

7. Estado civil: (1) acompanhado (2) Não acompanhado (99) IGN

8. Escolaridade: ( ) analfabeto ( ) \_\_\_\_\_ série do \_\_\_\_\_ grau (99) IGN

9. Data de nascimento: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Número de pessoas em casa \_\_\_\_\_

10. Gênero: (1) masculino (2) feminino

11. Cor da pele: (1) branca (2) mulata (3) negra (4) amarela (5) parda (6) Outra (99) IGN

12. Profissão: \_\_\_\_\_ (99) IGN

13. Tabagismo: (1) Sim (2) Não (99) IGN

Cigarros por dia: \_\_\_\_\_ (99) IGN

Ex-tabagista: (1) Sim (2) Não (99) IGN

14. Uso de drogas: (1) Sim (2) Não (99) IGN Qual: \_\_\_\_\_

15. Hepatopatias:

Hepatite B (1) Sim (2) Não (99)IGN

Hepatite C (1) Sim (2) Não (99)IGN

Cirrose (1) Sim (2) Não (99)IGN

16. Uso de corticóides ou imunodepressores (1) Sim (2) Não (99)IGN

17. Uso de anticoncepcional oral: (1) Sim (2) Não (99)IGN

18. Diabetes Mellitos: (1) Sim (2) Não (99)IGN

- uso de insulina? (1) Sim (2) Não (99)IGN

19. Neoplasia maligna: (1) Sim (2) Não (99)IGN

20. Insuficiência renal: (1) Sim (2) Não (99)IGN

21. Desnutrição (IMC<20): (1) Sim (2) Não (99)IGN

Peso:\_\_\_\_\_Altura:\_\_\_\_\_IMC\_\_\_\_\_

22. Gravidez: (1) Sim (2) Não (99)IGN

23. Presidiário: (1) Sim (2) Não (99)IGN

24. Alcoolismo (critérios CAGE): (1) Sim (2) Não (99)IGN

A) Qual o tipo de bebida o Sr(a) prefere?

( ) cachaça ( ) cerveja ( ) vinho ( ) whisky ( ) outro ( ) nenhum

Caso o paciente admita o uso de qualquer bebida citada acima, responda as perguntas, relacionadas com alcoolismo, abaixo:

B) O Sr(a) tem facilidade de fazer amizades? (1)  
sim (2) Não

C) Alguma vez sentiu que deveria diminuir a quantidade de bebida? (1)  
sim (2) Não

D) Alguém critica ou já criticou seu modo de beber? (1) sim  
(2) Não

E) Costuma beber pela manhã para diminuir o nervosismo ou a ressaca? (1)  
sim (2) Não

F) Sente-se culpado pela maneira que costuma beber? (1)  
sim (2) Não

Caso a resposta tenha sido sim para pelo menos 02 questões, assinale alcoolismo como positivo.

25. Internação hospitalar nos últimos 2 anos: (1) Sim (2) Não (99)IGN

26. Uso de antiretroviral: (1) sim (2) não

27. Antiretroviral em uso: \_\_\_\_\_

Se em uso, quais os efeitos colaterias:

Dor de cabeça

Insonia

28. Outros medicamentos: \_\_\_\_\_

29. CD4/CD8 antes da terapia \_\_\_\_\_

CD4/CD8 depois de 3 meses \_\_\_\_\_

CD4/CD8 depois de 6 meses \_\_\_\_\_

30. Carga viral antes da terapia \_\_\_\_\_

Carga viral depois de 3 meses da  
terapia \_\_\_\_\_

Carga viral depois de 6 meses da  
terapia \_\_\_\_\_



## ANEXO 1: Aprovação do Comitê de Ética da UNISC



### PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Of. Nº 385/08

Santa Cruz do Sul, 03 de dezembro de 2008.

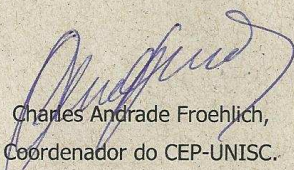
Senhor(a) Professor(a):

De acordo com a análise dos projetos de pesquisa no que tange aos aspectos éticos implicados na pesquisa, estamos encaminhando para seu conhecimento o parecer do Comitê de Ética em Pesquisa referente ao projeto sob sua coordenação: **2215/08** –“Análise de polimorfismos presentes no gene MDR e correlação com a resposta terapêutica em pacientes HIV positivos” **APROVADO**.

A análise constituiu-se na observância quanto ao cumprimento, por parte dos pesquisadores, dos documentos exigidos para submissão, bem como dos aspectos éticos conforme direcionamento da Comissão Nacional de Ética na Pesquisa – CONEP, em acordo com a resolução nacional nº 196/96 que define as diretrizes para a condução de pesquisas com seres humanos.

Segue, em anexo, cópia do parecer. Quaisquer esclarecimentos poderão ser obtidos junto ao CEP, sala 603.

Atenciosamente,

  
Charles Andrade Froehlich,  
Coordenador do CEP-UNISC.

Ilmo(a). Sr(a).

Prof (a): Jane Dagmar Pollo Renner  
Depto de Biologia e Farmácia

**ANEXO 2:** Confirmação da submissão do artigo (na pagina seguinte).

 [Edit Account](#) | [Instructions & Forms](#) | [Log Out](#) | [Get Help Now](#)

[Main Menu](#) → [Author Dashboard](#) → Submission Confirmation

**SCHOLARONE™**  
Manuscripts

You are logged in as JANE RENNER

## Submission Confirmation

Thank you for submitting your manuscript to *Antiviral Therapy*.

Manuscript ID: AVT-10-OA-1772

Title: Influence of the polymorphisms 1236C>T, 2677G>T and 3435C>T of the MDR1 gene on the virological and immunological responses to treatment with efavirenz of naïve HIV-positive patients of Brazil

RENNER, JANE  
Possuelo, Lia  
Authors: Valim, Andréia  
Carneiro, Marcelo  
Schmitt, Virginia

Date Submitted: 03-Aug-2010

 Print  Return to Dashboard

ScholarOne Manuscripts™ v4.3.0(patent #7,257,767 and #7,263,655). © ScholarOne, Inc., 2010. All Rights Reserved.  
ScholarOne Manuscripts is a trademark of ScholarOne, Inc. ScholarOne is a registered trademark of ScholarOne, Inc.

 Follow ScholarOne on Twitter

**ANEXO 3:** Normas da revista Antiviral Therapy (na pagina seguinte)



**Antiviral Therapy**  
Guidelines for preparation of manuscripts

<b>EDITORIAL POLICY .....</b>	<b>3</b>
Ethics .....	3
Randomized controlled trials .....	3
Observational studies .....	3
Systematic reviews .....	4
<b>SUBMISSION CATEGORIES.....</b>	<b>4</b>
Case reports .....	4
Correspondence .....	4
Meeting report .....	4
Original articles .....	4
Review articles .....	4
Short communication.....	5
<b>MANUSCRIPT FORMAT.....</b>	<b>5</b>
Title.....	5
Authors .....	5
Corresponding author details .....	5
Running head .....	6
Structured abstract.....	6
Main text .....	6
Methods .....	6
Acknowledgements .....	6
Disclosure statement .....	6
References .....	6
Standard journal article .....	6
More than six authors .....	6
Translated journal title.....	7
Book .....	7
Chapter in a book .....	7

Abstract .....	7
Website .....	7
Prescribing information .....	7
Patents .....	7
<b>Display items .....</b>	<b>7</b>
Tables .....	7
Figures .....	8
<b>Supplementary material.....</b>	<b>8</b>
<b>GENERAL POINTS ON MANUSCRIPT PREPARATION.....</b>	<b>8</b>
Drug names.....	8
Spelling.....	8
Units of measurement.....	8
Abbreviations and symbols .....	8
<b>PROOFS.....</b>	<b>9</b>
<b>COPYRIGHT ASSIGNMENT .....</b>	<b>9</b>
<b>OFFPRINTS.....</b>	<b>9</b>
<b>EDITORIAL OFFICE .....</b>	<b>9</b>

## Antiviral Therapy Guidelines for preparation of manuscripts

### EDITORIAL POLICY

*Antiviral Therapy* welcomes the submission of high-quality research on the clinical development and use of antiviral agents and vaccines, and the treatment of all virus diseases.

Manuscripts submitted to *Antiviral Therapy* are considered for publication on the understanding that the work contained therein has not been submitted simultaneously to another journal. Copies of related manuscripts submitted elsewhere or in press should accompany the submitted manuscript.

All submissions must be accompanied by a covering letter (a letter template is available on the online submission website), signed by all the authors (or the corresponding author on behalf of all others) stating that all authors have contributed to the paper and are familiar with the contents of the final draft, and that all authors meet the criteria for authorship as established by the [International Committee of Medical Journal Editors](#). The letter should also state whether any author has any conflict of interest. You must declare sources of funding, any influence the funding source may have had on the analysis and reporting of the results and any related interest in the Acknowledgements section. Illustrations and other material obtained from other sources must be acknowledged and permission for reproduction must be obtained from the publisher.

All manuscripts should be submitted via the [online submission site](#). Manuscripts should not be submitted via e-mail or post.

Papers will be peer reviewed and assessed statistically before acceptance. Priority and time of publication of accepted material will be decided by the editors. The editors retain the right to shorten material accepted for publication. This can include subediting the text for style. The editors endorse the [guidelines on good publication practice](#) from the Committee on Publication Ethics (COPE).

### Ethics

Papers based on clinical investigation must conform to ethical standards as set out in the Declaration of Helsinki. Reports describing data obtained from experiments performed in animals must clearly indicate that humane standards were adhered to.

For experiments on isolated tissues the paper must indicate precisely how the donor tissue was obtained. The NIH *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (National Institutes of Health Publications) gives guidelines for the acquisition and care of animals.

### Randomized controlled trials

Authors are requested to report these in accordance with the CONSORT (Consolidated Standards of Reporting Trials) statement (Hopewell S, *et al.* 2008 *PLoS Med* 5(1): e20 [doi:10.1371/journal.pmed.0050020](#)). This ensures that enough information is provided for editors, peer reviewers and readers to see how the study was performed and to judge whether the findings are likely to be reliable. For behavioural and public health evaluations involving non-randomized designs, authors should include with their submission a complete checklist from the [TREND statement](#).

### Observational studies

Observational studies (cohort, case-control or cross-sectional designs) should be reported according to the STROBE recommendations (see [www.strobe-statement.org](#)).

### Systematic reviews

Authors are requested to report these in accordance with the QUOROM (Quality of Reporting of Meta-analyses) statement (*Lancet* 1999; **354**:1896–1900) and the [Cochrane Collaboration guidelines](#). When conducting any literature review, it is important that there is complete transparency concerning the choice of material included. All literature reviews must therefore contain a brief section entitled *Search strategy and selection criteria*. This should state clearly the sources (databases, journals, or book reference lists, etc) of the material covered and the criteria used to include or exclude studies; for example, English language only or studies conducted after a specific date.

## SUBMISSION CATEGORIES

### Case reports

**1,500 words**

**≤20 references**

**≤3 display items**

A case report should cover the details of an unusual case or any case that warrants discussion in the journal. However, case reports can be published as an article if the editor feels that the author has adequately extended the report into a topic discussion that meets the criteria for an article, or if the case report itself is used as an example of a point in the author's article.

### Correspondence

**1,000 words**

**≤15 references**

The correspondence section is for letters that are addressing issues or exchanging views on topics arising from published articles in *Antiviral Therapy*. Correspondence should not exceed 1,000 words.

### Meeting report

**1,500 words**

**≤20 references**

*Antiviral Therapy* encourages submissions on written reports from relevant and recent workshops and conferences. An abstract is not required.

### Original articles

**≤4,000 words**

**≤50 references**

**≤5 display items**

### Review articles

**3,000–5,000 words**

**≤100 references**

**≤5 display items**

Reviews are usually commissioned, but unsolicited reviews may occasionally be considered. Articles will be assessed in-house and those considered suitable will be peer reviewed before an editorial decision is made. Reviews should either be definitive overviews of a major topic connected with antiviral therapies or updates of knowledge in a somewhat narrower field of current interest. The word count will depend on the breadth of the topic. All reviews should be prefaced by a summary of 100–120 words. The summary is important: it should contain sufficient information for the reader to be able to appreciate the relevance of the full article when read alone. Summaries are used by abstracting services and many users of these services read only the summary. It should include background information and specific examples of recent advances. References should not be included and abbreviations should be avoided as far as possible in the summary. References selected for publication in the article should be chosen for their importance, ease of access, and for the 'further reading' opportunities they provide. *Antiviral Therapy* welcomes systematic reviews (see [Systematic reviews](#), above).

### Short communication

**1,500 words**

**≤20 references**

**≤3 display items**

Original research findings that do not require a full paper, but are completed studies, may be submitted as a short communication. All short communications should contain an introduction, methods, results and discussion section.

### MANUSCRIPT FORMAT

Manuscripts should be prepared in accordance with '[Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals](#)' (International Committee of Medical Journal Editors).

All manuscripts should be submitted using editable files; manuscripts will be converted to PDFs for peer review. No page charges will be made for standard text, diagrams and black & white photographs. The use of colour figures will incur a page charge, due to the additional printing costs involved.

The manuscript should contain the following:

- [Title](#)
- [Authors](#)
- [Corresponding author details](#)
- [Running head](#)
- [Structured abstract](#)
- Introduction
- [Methods](#)
- Results
- Discussion
- [Acknowledgements](#)
- [Disclosure statement](#)
- [References](#)
- [Display items](#) (optional)
- [Supplementary material](#) (optional)

#### Title

Use of abbreviations should be avoided in the title and it should not exceed three typeset lines (~150 characters, including spaces).

#### Authors

Forenames and brief addresses should be included. If an author's current affiliation address differs from the one at which the research was conducted this may also be indicated. Authors (including members of study groups, working group and the like) included in the byline must satisfy the criteria of authorship given by the [International Committee of Medical Journal Editors](#). All individuals who qualify for authorship must be included.

A multicentre group can be credited with sole authorship; however, the group must identify and include in their manuscript a corresponding author on the title page and the principle investigators who accept direct responsibility for the manuscript in a separate section before the references. These principle investigators should fully meet the criteria for authorship defined by the [International Committee of Medical Journal Editors](#) and be willing to complete relevant journal-specific forms on behalf of the group. A full membership list will be published as an additional file.

#### Corresponding author details

Name, address, telephone and fax numbers, and e-mail address should be supplied. Unless instructed otherwise the editorial office will send page proofs of the article to this e-mail address.



**Running head**

A running header of up to 75 characters should be supplied. This will appear at the top of each right-hand page.

**Structured abstract**

The headings Background, Methods, Results, Conclusions should be used. The abstract must not exceed 250 words. All abbreviations should be defined at first mention. References and display item citations must not appear in the abstract, and the abstract must be clear and comprehensible in its own right.

**Main text****Methods**

The supplier (with brief address e.g. town, state and country) must be given for all laboratory equipment and materials.

**Acknowledgements**

Acknowledgements should be made to those, not including the authors, who have made a substantial contribution to the study. Authors are responsible for obtaining written permission from people acknowledged by name in case readers infer their endorsement of data and conclusions.

Details of sources of funding, editorial support and previous presentation of should be placed in this section, when appropriate. A summary of the role of each author on a collaborative paper may also be included.

**Disclosure statement**

All conflicts on interest relevant to the article should be disclosed in this section. If there are no conflicts of interest, a sentence to this effect should be included.

**References**

The accuracy of references is essential and this remains the responsibility of the author. As formatting information (italics, special characters and subscript and superscript text) is often lost on PubMed and other websites, the original versions should be consulted. References must be cited numerically by order of appearance in the text and listed in the bibliography. References should be cited in square brackets, for example, [3] or [1,3–5]. The manuscript bibliography must present full references in the formats given below.

In the full list of references give the names and initials of all authors. If there are more than six, cite only the first three, followed by *et al.* The authors' names are followed by the title of the article, the title of the journal (italics) abbreviated according to the style of [Index Medicus](#), the year of publication; the volume number (in bold) and the first and last page numbers in full followed by a full stop. Titles of books should be followed by the city of publication, the publisher, the year and inclusive page numbers. See the following examples:

**Standard journal article**

1. Bar S, Alizon M. Role of the ectodomain of the gp41 transmembrane envelope protein of human immunodeficiency virus type 1 in late steps of the membrane fusion process. *J Virol* 2004; **78**:811–820.

**More than six authors**

2. Hirsch MS, Brun-Vézinet F, Clotet B, *et al.* Antiretroviral drug resistance testing in adults infected with human immunodeficiency virus type 1: 2003 recommendations of an International AIDS Society-USA Panel. *Clin Infect Dis* 2003; **37**:113–128.

**Translated journal title**

3. Schäfer W. Vergleichende sero-immunologische Untersuchungen über die Viren der Influenza und klassischen Geflügelpest [Comparative sero-immunological investigations on the viruses of influenza and classical fowl plague]. *Zeitschrift für Naturforschung* 1955; **10b**:81–91. German.

**Book**

4. Glantz SA. *Primer of Biostatistics*. 3rd edn. New York: McGraw-Hill 1997; pp. 440.

**Chapter in a book**

5. Jilbert AR, Burrell CJ, Triatni M, Kann M. Hepatitis B virus replication. In *Human Virus Guide: Hepatitis B Virus*. Edited by CL Lai and S Locarnini. London: International Medical Press; 2002. pp. 43–53.

**Abstract**

6. Torriani F, Rockstroh J, Rodriguez-Torres M, *et al*. Final results of APRICOT: a randomized, partially blinded, international trial evaluating peginterferon-alfa-2a + ribavirin vs. interferon-alfa-2a + ribavirin in the treatment of HCV in HIV/HCV co-infection. *11th Conference on Retroviruses & Opportunistic Infections*. 8–11 February 2004, San Francisco, CA, USA. Abstract 112.

**Website**

7. Panel on Antiretroviral Guidelines for Adult and Adolescents. Guidelines for the use of antiretroviral agents in HIV-1-infected adults and adolescents. Department of Health and Human Services (Updated 10 October 2006. Accessed 3 August 2007.) Available from <http://aidsinfo.nih.gov/contentfiles/AdultandAdolescentGL.pdf>

**Prescribing information**

8. Viread (tenofovir disoproxil fumarate). *Package insert* 2005. Gilead Sciences, Foster City, CA, USA.

**Patents**

9. Hurst DN, Jones PS, Parkes KEB, Parratt MJ, Wilson FX, inventors; Hoffmann-La Roche Inc., assignee. Inhibitors of HPV E1 helicase enzyme. United State patent US 6703387. 2004 March 9.

**Display items**

References to figures and tables should be made in order of appearance in the text and should be in Arabic numerals in parentheses, e.g. (Figure 2). Any abbreviation used in a figure or table must be defined, even if it has already been defined in the main text. Units should be stated after a comma, for example 'Time, years' or 'HCV RNA, log<sub>10</sub> copies/ml'.

If a figure or table has been published before, in total or in part, the original source must be acknowledged and written permission from the copyright holder for both print and electronic formats should be submitted with the material. It is the responsibility of the author to obtain this permission, and failure to do so may delay publication. Permission is required regardless of authorship or publisher, except for documents in the public domain.

**Tables**

Create tables using the table editor of a word processing package. Do not embed tables as images in the manuscript file or upload tables in image or PDF formats. Each piece of data needs to be contained in its own cell in the table. Vertical rules should not be used. Avoid creating tables using spaces or tabs. Do not align cells with hard returns or extra spaces. Furthermore, no cell should contain a hard return or tab. Although individual empty cells are acceptable, be sure there

are no empty columns. Tables should not be split into separate sections and should not exceed one typeset page in size.

Each table should be assigned an Arabic numeral and a brief title. Identify all statistical measures, along with all units. Place explanatory matter in footnotes, not in the heading or within the table. The footnote symbols used in the journal are <sup>a</sup>, <sup>b</sup>, <sup>c</sup>, <sup>d</sup>, <sup>e</sup>, <sup>f</sup> and so on.

Please note, accepted manuscripts not following these table guidelines must be retyped during the editing process, which may result in delays and opportunities for error.

### **Figures**

Figures may be reduced, cropped or omitted at the discretion of the editor. Colour illustrations are acceptable, but authors will be expected to cover the extra reproduction costs (for current charges, contact the publisher). Chemical schemes should be supplied as standard figures and be called figures. Where a figure has several parts these should be labelled with upper-case letters. No lettering should be placed directly over images. Amino acid sequences should be given in Courier or a similar monospaced font.

For ease of review, clear, complete figures should be submitted in .jpg or .pdf.

Should the article be accepted for publication, the authors should be ready to supply print-quality images in cases of electron micrographs, images of blots and gels, computer-generated protein structures and the like. This will ideally be in .eps format for computer-generated images (all programs have the facility to print to an .eps file) or .tif format for photographic images. Images intended to be printed across the width of one column should be a minimum of 600 pixels (5 cm wide at 300 dpi) in width. Those intended to occupy two columns should be a minimum of 1,300 pixels (11 cm at 300 dpi) in width. It is also worth remembering that RGB colour profile figures will necessarily be converted to CMYK for printing – therefore if possible authors should supply figures as CMYK, to ensure that the alteration in colour is satisfactory.

Graphs, schemes and simple diagrams will be redrawn by in-house illustrators so the initially submitted images will usually be sufficient.

### **Supplementary material**

Supplementary online data can be published as part of the online journal. It should be referred to within the text. Lists of members of study groups and the like can also be incorporated into the supplementary material. Supplementary material will be reproduced as submitted and will not be subedited or styled by the editorial office.

## **GENERAL POINTS ON MANUSCRIPT PREPARATION**

### **Drug names**

International non-proprietary names for drugs should be used throughout the text.

### **Spelling**

Spelling should follow the Oxford English Dictionary.

### **Units of measurement**

SI units of measurement should be used wherever applicable. Temperatures should be given in degrees Celsius. Blood pressures should be given in millimetres of mercury.

### **Abbreviations and symbols**

The full term for which an abbreviation stands should precede its first use in the text unless it is a standard unit of measurement. Abbreviations which have been defined in the abstract must be defined again at first mention in the main text. Abbreviations should only be used when helpful to



the reader, as an improvement in clarity. As a guideline, use abbreviations for terms appearing three or more times in the article. Use only standard abbreviations. Avoid abbreviations in the title and abstract. All abbreviations must be redefined in each table and figure in which they are used.

### **PROOFS**

Page proofs of articles will be sent to the corresponding author shortly before publication and these should be corrected and returned within 2 days. For this reason please ensure that the e-mail address supplied is checked regularly. Only corrections and essential changes should be made and the cost of additional changes will be charged to the authors. However, in some cases information that has become available since acceptance of the manuscript may be included as an addendum in proof. This is at the discretion of the editors. The editors reserve the right to make minor modifications to the manuscripts. Material changes will be submitted to the authors for approval at the proof stage.

### **COPYRIGHT ASSIGNMENT**

To facilitate effective dissemination of the article, copyright must be transferred to the publisher before publication. Copyright assignment forms are available from the editorial office, but will usually be supplied with the page proofs of the article.

### **OFFPRINTS**

The corresponding author of each published article may obtain a PDF of the final version of the article from the editorial office. Authors can purchase offprints at reduced rates and a form will be sent along with the page proofs.

### **EDITORIAL OFFICE**

International Medical Press  
36 St Mary at Hill  
London  
EC3R 8DU  
UK  
Tel: +44 (0) 20 7398 0700  
Fax: +44 (0) 20 7398 0701  
E-mail: [info@intmedpress.com](mailto:info@intmedpress.com)  
Web: <http://www.intmedpress.com>