

**Elizabeth Pires Yamaguti**

**PERFIL GENOTÍPICO DO HIV-1 EM CRIANÇAS  
INFECTADAS TRATADAS E NÃO TRATADAS  
COM ANTIRETROVIRAIS**

**Universidade Federal do Espírito Santo  
Vitória-ES, 2006**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**Elizabeth Pires Yamaguti**

**PERFIL GENOTÍPICO DO HIV-1 EM CRIANÇAS  
INFECTADAS TRATADAS E NÃO TRATADAS  
COM ANTIRETROVIRAIS**

**Dissertação apresentada à Universidade Federal do Espírito  
Santo para obtenção do título de Mestre Doenças Infecciosas**

**Orientador : Drº Rodrigo Ribeiro Rodrigues**

**CO-Orientadora: Drª Sandra Fagundes Moreira-Silva**

**Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas**

**Área de concentração: Doenças Infecciosas**

**Centro de ciências da Saúde**

**Vitória- ES  
Maio/2006**

**Ao Hisashi-It, meu filho,**  
cujo amor é meu alimento e amparo a mais tempo do que tenho  
lembrança.

Juntos estamos, até o fim dos tempos.  
Muito obrigada pela grande compreensão que um ser tão  
pequenino já possui.

**Aos meus pais,**  
que, com amor, exemplo de vida e de conduta humana  
contribuíram para a construção da minha vida.

**Ao meu companheiro Augusto César,**  
por todo amor e carinho.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu orientador **Dr. Rodrigo Ribeiro Rodrigues**, por todo apoio, pela confiança em depositada, e pelo constante entusiasmo, principalmente nos momentos mais angustiantes. Muito Obrigada!

Meu agradecimento e carinho a **Dr. Sandra Fagundes**, pela sua ajuda e por lhe roubar tanto tempo nos momentos em que revíamos juntas e discutíamos os resultados de nossos pequeninos pacientes, compartilhamos e dividimos a mesma dor e angústia quando concluíamos que nada mais poderíamos fazer.

Aos **pequeninos pacientes** e seus responsáveis que se dispuseram a participar deste estudo, muito obrigada por contribuíram de modo tão significativo para a ciência e minha admiração pela coragem como vivem hoje e sonham com esperanças no amanhã. **Vocês pequeninos é que deram sentido a este trabalho.**

Ao **Dr. Lauro Ferreira Pinto**, pelo estímulo na escolha do tema da Tese, pelos acréscimos científicos, apoio e dicas. Agradeço imensamente pela dedicação.

Ao **Dr. Fausto Edmundo Lima Pereira**, por toda a ajuda e atenção a mim dispensada, e por ser um pesquisador admirável e exemplar.

Ao **Dr. Reynaldo Dietze**, coordenador do Núcleo de Doenças Infecciosas da UFES, pela dedicação dispensada ao NDI, provendo condições para a realização dos trabalhos aí desenvolvidos.

Às caras Biólogas: **Carla Baroni, Valéria Cabral e Eneida Magalhães**, acho que agora posso lhes chamar de amigas né? Só posso

dizer que divido com vocês a benção de ter conseguido executar este trabalho. Nunca esquecerei a preciosa ajuda de todas. Desculpe as falhas e obrigada pela paciência que tiveram comigo. Muito Obrigada e contem sempre comigo!

Meu profundo apreço às minhas colegas de trabalho: **Dr<sup>a</sup> Ana Paula, Dr<sup>a</sup> Alba, Dr<sup>a</sup> Lucília, Dr<sup>a</sup> Diana, Dr<sup>a</sup> Vanda, Ass. Social Cida, Enf. Cristina, Farmacêutica Maria Inês**, pela ajuda no dia a dia quando precisei, minhas desculpas pela minha ausência por vezes necessárias, vocês também tornaram esta tese possível.

Agradeço à **Rita**, em especial, pela suas múltiplas funções, seja no contato com os pacientes, seja me ajudando a catalogar os dados e resultados no computador, que íamos conseguindo pouco a pouco no dia a dia. Parecia que em 2005, fizemos um trabalho idêntico ao das formiguinhas, com paciência e resignação, pouco a pouco fomos aumentando o nosso banco de dados da forma mais ética e responsável possível.

À amiga **Regina**, pelo apoio e amizade que vem de anos e pela ajuda naquelas horas tão importantes.

À toda equipe do Hospital Infantil pelo apoio, bate-papo e conselhos: **Denilda, Bete Portugal, Valéria, Suene (laboratório), Ângela**.

À toda equipe do Núcleo de Doenças Infecciosas: **Fátima, Tatiana, Solange, Patrícia, João**, que de alguma forma auxiliaram na execução deste trabalho.

À todos os **Residentes da Infectologia do HINSG**, que apesar de não citar os nomes aqui, foram bastante atenciosos com o trabalho junto aos pacientes.

Aos colegas e amigos do mestrado, pela convivência e por compartilhar os momentos de ansiedade: **Eneida, Ana Daniela, Adriana, Cristiane, Mara, Carla Couzi.**

Ao **Ministério da Saúde/ Programa Nacional de AIDS e DST**, pelo apoio na realização dos exames de Genotipagem.

## SUMÁRIO

**Lista de abreviaturas e siglas**

**Lista de figuras**

**Lista de tabelas**

## Conceitos e definições

### Resumo

### Abstract

## 1. INTRODUÇÃO

1.1. Histórico.....	26
1.2. Epidemiologia da AIDS.....	27
1.3. Epidemiologia da AIDS no Estado do Espírito Santo.....	30
1.4. Formas de Transmissão.....	33
1.5. Biologia do HIV.....	34
1.6. Patogênese.....	41
1.7. Drogas Anti-retrovirais.....	43
1.8. Determinantes de Falha Terapêutica.....	44
1.9. Tipos de Resistência aos Anti-retrovirais.....	44
1.10. Mecanismos de Resistência aos Anti-retrovirais.....	47
1.11. Testes para Resistência às Drogas.....	59
1.12. Testes de Resistência e Subtipos Genéticos do HIV.....	61

## 2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral.....	64
2.2. Objetivos específicos.....	64

## 3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 – População estudada.....	66
3.2. Coleta de Sangue.....	68
3.3 . Teste de Genotipagem.....	69
3.3.1. Purificação do RNA ou DNA do HIV-1.....	69
3.3.2. Transcrição Reversa.....	69
3.3.3. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	70
3.3.4. Seqüenciamento do Genoma do HIV.....	71
3.3.5. Lista de Mutações dos Códon.....	72
3.3.6. Interpretação.....	72
3.4. Análise Estatística.....	73

## 4. RESULTADOS

4.1. Caracterização da População Estudada.....	76
--	----



	8
4.2. Listas das Mutações nos Códonos da TR e da Protease no Grupo A (crianças não tratadas com ARVs).....	80
4.3. Listas das Mutações nos Códonos da TR e da Protease no Grupo B (crianças tratadas com ARVs).....	81
4.4. Prevalência dos subtipos circulantes do HIV-1 no grupo das 44 Crianças atendidas em 2005, HINSG.....	89
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>91</b>
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>102</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>105</b>
<b>ANEXOS</b>	

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

AIDS – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida  
ABC – Abacavir  
APV – Amprenavir  
ARV – Anti-retroviral  
ATV – Atazanavir

AZT – ver ZDV

“B” – variante do subtipo B de HIV-1 encontrada no Brasil

C1-C5 – regiões constantes do gene env

CCR5- receptor de quimiocina do tipo C-C

CD4 – “Cluster of differentiation” – identificam células T “helper”

CD8 – “Cluster of differentiation” – identificam células T citotóxicas

CDC – “Centers for Disease Control and Prevention”

CI – Concentração inibitória

CV – Carga Viral

CRF – Forma recombinante circulante do HIV-1

CXCR4 – receptor de quimiocina do tipo C-X-Cgh

D4T – Stavudina

DDC – Zalcitabina

DDI – Didanosina

DLV – Delavirdina

DNA – Ácido desoxirribonucléico

DNTP – desoxirribonucleotídeos trifosfato

EDTA – Àcido etilenodiaminotetracético

EFV – Efavirenz

env – gene do HIV

ES – Estado do Espírito Santo

FIV – vírus da imunodeficiência felina

gag – gene do HIV

gp120 – proteína de superfície do HIV

gp160 – glicoproteína precursora

gp41 – proteína transmembrana

HAART – Terapia anti-retroviral altamente efetiva (do inglês “highly active antiretroviral therapy”)

HINSG – Hospital Infantil Nossa Senhora da Glória

HIV – vírus da imunodeficiência humana

HTLV – “Human T-Lymphotropic Vírus”

IC – concentração inibitória utilizada em testes de fenotipagem

IDV – Indinavir

IP – Inibidor de Protease

ITRNN – Inibidor da transcriptase reversa não análogo de nucleosídeo

ITR – Inibidor da transcriptase reversa  
ITRN – Inibidor da transcriptase reversa análogo de nucleosídeo  
ITT – Análise por intenção de tratamento  
LIPA – Teste de Hibridização usando sondas dispostas em linha  
LPV - Lopinavir  
LACEN – Laboratório Central  
LAV – “Lymphaenopathy Associated Vírus”  
LTRs – longas seqüências terminais repetidas  
MDR – resistência a múltiplas drogas  
MRG – médico referência em Genotipagem  
ND – não disponível  
ml – mililitro  
mRNA – RNA mensageiro  
nef – gene do HIV  
NFV – Nelfinavir  
NVP – Nevirapina  
NS – estatisticamente não significativa  
P17 – proteína de matriz  
P24 – proteína do capsídeo  
P7 – proteína do nucleocapsídeo  
Pb – pares de base  
PCR – Reação em cadeia pela polimerase  
Pol – gene do HIV  
Pr160<sup>gag-pol</sup> – poliproteína precursora  
PR – protease  
rev – gene do HIV  
RNA – ácido ribonucléico  
rpm – rotações por minuto  
RTV – Ritonavir  
SQV – Saquinavir  
tat – gene do HIV  
TAM – mutações associadas aos timidínicos (ZDV e d4T)  
TDF – Tenofovir  
TR – transcriptase reversa  
UDI – usuário de drogas injetáveis

V1-V5 – regiões variáveis do gene env

vif – gene do HIV

Vpr – proteína viral R

Vpu – proteína viral U

$X^2$  – teste do qui-quadrado

ZDV – Zidovudina

## **LISTA DE FIGURAS**

<b>Figura 1</b> - Prevalência (%) de Adultos com HIV até o final de 2004 .....	27
<b>Figura 2</b> - Estimativa o número de crianças e adultos vivendo com HIV/AIDS até o final de 2004 .....	28
<b>Figura 3</b> - Taxa de incidência (por 100 mil habitantes) de casos notificados, período de 1992 a 2004, no Estado do Espírito Santo, segundo sexo.....	31
<b>Figura 4</b> - Distribuição dos casos de AIDS no Estado do Espírito Santo, segundo categoria de exposição de 1985-2005.....	31
<b>Figura 5</b> - Organização genômica do HIV-1.....	36
<b>Figura 6</b> - Interação entre a gp120 e o CD4 causando mudanças estruturais que facilitam a ligação do co-receptor e a subsequente entrada do vírus na célula.....	38
<b>Figura 7</b> - Organização estrutural do HIV-1.....	39
<b>Figura 8</b> - Ciclo de vida do HIV.....	40
<b>Figura 9</b> - Progressão da infecção pelo HIV em pacientes não tratados .....	42
<b>Figura 10</b> - A resistência pode ser ultrapassada com o aumento da potência de um regime terapêutico.....	53
<b>Figura 11</b> - O conceito de barreira genética.....	54
<b>Figura 12:</b> Esquema representativo da população estudada em 2005, Setor de Infectologia/Aids HINSG-Viória-ES.....	67
<b>Figura 13</b> - Procedência das crianças submetidas ao teste de genotipagem, em 2005, HINSG.....	79
<b>Figura 14</b> - Categoria de exposição das mães das crianças submetidas ao teste de genotipagem, em 2005, HINSG.....	80
<b>Figura 15</b> - Freqüência da resistência aos antiretrovirais ITRN e ITTRN, em 31 crianças em uso de ARVs, em 2005, HINSG.....	85
<b>Figura 16</b> - Freqüência da resistência aos antiretrovirais Inibidores de Protease, em 31 crianças em uso de ARVs em 2005, HINSG.....	86
<b>Figura 17</b> - Percentagem de crianças com resistência segundo a classe de droga em 31 crianças em uso de ARVs, em 2005, HINSG.....	87
<b>Figura 18</b> - Freqüência de mutações principais no códon da Transcriptase Reversa em 31 crianças em uso de ARVs, em 2005, HINSG.....	87
<b>Figura 19</b> - Freqüência de mutações principais no codón da Transcriptase	

Reversa não análogo de nucleosídeo em 31 crianças em uso de ARVs, em 2005, HINSG.....	88
<b>Figura 20</b> - Frequência de mutações principais no códon da Protease em 31 crianças em uso de ARVs, em 2005, HINSG.....	88
<b>Figura 21</b> - Prevalência dos subtipos circulantes do HIV-1 no grupo das 44 crianças atendidas em 2005, HINSG.....	89
<b>Figura 22.</b> Prevalência dos subtipos circulantes do HIV-1 nos diferentes grupos (A e B), em 2005, HINSG.....	89

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Distribuição de casos de AIDS em menores de 13 anos segundo o ano e sexo. Espírito Santo - 1985-2005.....	32
<b>Tabela 2.</b> Localização dos códons principais e acessórios na TR relacionados à resistência aos ITRN e nucleotídeo.....	50
<b>Tabela 3.</b> Localização dos códons na TR relacionados à resistência aos ITRNN .....	51
<b>Tabela 4.</b> Localização dos códons principais e acessórios na protease relacionados à resistência aos IP.....	52
<b>Tabela 5.</b> Características gerais do Grupo A no momento do teste de genotipagem (crianças não tratadas com ARVs ), em 2005, HINSG.....	77
<b>Tabela 6.</b> Características gerais do Grupo B no momento do teste de genotipagem (crianças tratadas com ARVs), em 2005, HINSG.....	78
<b>Tabela 7.</b> Perfil genotípico do HIV para ITRNs, ITRNNs e para IPs em crianças não tratadas com ARVs, em 2005, HINSG.....	81
<b>Tabela 8.</b> Perfil genotípico do HIV para ITRNs e ITRNNs em crianças tratadas com ARVs, em 2005, HINSG.....	82
<b>Tabela 9.</b> Perfil genotípico do HIV-1 para IPs em crianças tratadas com ARVs, em 2005, HINSG.....	83
<b>Tabela 10.</b> Histórico da terapia Anti-retroviral em crianças tratadas com ARVs, em 2005, HINSG.....	84

## CONCEITOS E DEFINIÇÕES

**Barreira genética** – “Proximidade” genética para aquisição de resistência completa aos anti-retrovirais. Pode estar relacionada ao número de mutações necessárias para emergência de resistência ou a facilidade na seleção de determinada mutação de resistência. Uma droga que necessita de várias mutações para resistência apresenta uma grande barreira genética. Se algumas mutações já existirem, haveria no caso uma diminuição da barreira genética para resistência ao anti-retroviral em questão. Pode também estar relacionada à facilidade com que uma mutação emerge na presença de uma determinada droga.

**Códon** – Grupo de 3 nucleotídeos que codificam um aminoácido.

**Deleções** – Perda de fragmento genético nucleotídico, geralmente múltiplo de 3, que leva a uma diminuição no número de aminoácidos da seqüência.

**Fenótipo** – “Comportamento” replicativo do vírus em cultura.

**Fenotipagem virtual** – Teste de genotipagem cujo resultado é submetido a bancos de dados que contém pares de amostras que possuem testes de genotipagem e fenotipagem. O sistema de informática procura no banco de dados a seqüência mais semelhante à seqüência genômica testada. Como cada seqüência do banco de dados possui um resultado de fenotipagem equivalente, os dados de resistência fenotípica do banco de dados é atribuído ao paciente testado, e, portanto, fornece-se o resultado do paciente testado no formato de um resultado de fenotipagem.

**“Fitness”** – Capacidade adaptativa de um vírus em determinado meio ambiente. Um dos aspectos do “fitness” é sua capacidade replicativa que pode indiretamente ser medida pela carga viral. Mutações de resistência produzem uma diminuição da capacidade replicativa dos vírus (perda do “fitness”), proporcionando um vírus “aleijado”. As mutações adicionais de resistência recuperam o “fitness” perdido pelo vírus. Entretanto, o vírus com melhor “fitness” na presença de anti-retrovirais é o vírus mutante.

**Genótipo** – Seqüências específicas de nucleotídeos que determinam os genes do HIV.



**Hipersuscetibilidade** – Aumento da sensibilidade de uma cepa viral a um determinado anti-retroviral, quando comparado ao vírus do tipo selvagem.

**Inserções** – Adição de nucleotídeos, geralmente múltiplos de 3, que levam ao acréscimo no número de aminoácidos na seqüência viral.

**Mutação** – Alteração na composição genética do vírus.

**Mutação principal ou primária** – Aquela que produz significativa perda de suscetibilidade ao anti-retroviral que a selecionou. Normalmente é a primeira mutação que emerge decorrente do uso do antiretroviral em questão.

**Mutação acessória ou secundária** – Mutação que emerge normalmente para recuperar o “fitness” perdido pelo aparecimento da mutação principal. Propicia uma perda modesta de susceptibilidade ao anti-retroviral que a selecionou.

**Mutações pontuais** – Alterações genéticas resultantes de mutações em um único nucleotídeo.

**Mutações sinônimas ou silenciosas** – Mutações nucleotídeas que não levam a alteração do aminoácido em determinado códon.

**Provírus** – Vírus na sua forma DNA que se encontra integrado no núcleo celular.

**Polimorfismos virais** – Alterações genéticas que podem estar presentes nos vírus na ausência de pressão seletiva dos antiretrovirais. Muitas vezes são “assinaturas” de vírus de diferentes subtipos do HIV-1.

**Quasi-espécies** – Variantes virais distintas, porém geneticamente relacionadas, dentro de uma população de vírus que infectam uma pessoa. Estas cepas evoluíram ao longo do tempo a partir de uma cepa viral homogênea do inoculo que infectou este indivíduo.

**Resistência à drogas** – Diminuição da susceptibilidade do HIV às drogas.

**Resistência cruzada** – Resistência selecionada por uma droga que levará a resistência a outra droga não utilizada ainda.

**Resistência genotípica** – Presença de mutações genéticas relacionadas a redução de susceptibilidade a um ou mais anti-retrovirais.

**Resistência Fenotípica** – Redução da atividade anti-retroviral “in vitro”, evidenciada pelo aumento da replicação viral na presença da droga.

**Reação em cadeia** – Reação química onde um genoma é “amplificado” pela polimerase (PCR) (multiplicado) para ser detectado com maior facilidade ou ser usado como produto para outras reações, como o seqüenciamento genômico.

**Resistência Primária** – Resistência aos anti-retrovirais, detectadas em pacientes virgens de tratamento anti-retroviral.

**Resistência secundária** – Resistência aos anti-retrovirais decorrentes da pressão seletiva exercida pelas drogas.

**Resistência a múltiplas drogas (MDR)** – Mutações que normalmente conferem resistência a todas as drogas de uma mesma classe.

**Seqüenciamento** – Reação laboratorial que determina a composição genética (seqüência de nucleotídeos) de determinado genoma.

**Testes de Resistência Genotípica (Genotipagem)** – Testes laboratoriais que determinam a presença de mutações genéticas no HIV-1 relacionadas à diminuição de susceptibilidade aos anti-retrovirais.

**Testes de Resistência Fenotípica (Fenotipagem)** – Testes usados para determinar em cultura a suscetibilidade do vírus aos anti-retrovirais.

**Vírus do tipo selvagem** – Cepa viral com constituição genética considerada normal, sendo sensível aos anti-retrovirais.

**Vírus mutante** – Cepa viral com alterações genéticas.

**Vírião** – Vírus livre na sua forma RNA, que é liberado na corrente sanguínea, fruto da replicação viral.

**“Vias Mutacionais”** – Grupo de mutações específicas selecionadas por uma mesma droga. Um determinado antiretroviral pode selecionar mutações por vias mutacionais distintas em pacientes diferentes, sendo que normalmente somente uma via ocorrerá em um mesmo paciente.

**Vírus recombinantes** – Vírus “híbridos” frutos da recombinação e que apresentam material genético de dois vírus parentais.

## **RESUMO**

Embora os protocolos de prevenção da transmissão vertical do HIV-1 atualmente preconizados venham contribuindo para a redução da infecção na população pediátrica nos países desenvolvidos, um grande número de crianças continua sendo infectado pelo HIV em países em desenvolvimento. Dados sobre a infecção nesta população ainda são escassos. Neste trabalho, realizamos um

levantamento do perfil genotípico do HIV em uma coorte de crianças infectadas pelo HIV-1 no Setor de Infectologia/AIDS Pediátrico do Centro de Referência do Hospital Infantil Nossa Senhora da Glória - Vitória / ES

Os dados aqui apresentados demonstram que a prevalência e o nível de mutações de resistência às drogas foram mais evidentes no grupo de pacientes recebendo terapia com ARVs quando comparados ao grupo de pacientes virgem de tratamento, corroborando com o conceito de ação da pressão seletiva na emergência de cepas virais resistentes. Mutações de resistência primária aos ARVs não foram encontradas na grande maioria das crianças não tratadas (**Grupo A**), sustentando a hipótese que a transmissão vertical ocorreu a partir de mães que não tinham consciência do seu status sorológico e conseqüentemente não faziam uso de antiretrovirais. Neste grupo foi encontrado uma maior prevalência de mutações acessórias não conferindo resistência aos ARVs.

A supressão máxima da replicação viral continua ser a principal meta a ser atingida pela terapia visando prevenir a emergência de cepas resistentes. Infelizmente, em 20-50% dos pacientes que iniciam HAART essa supressão viral sustentada não é atingida e podendo ser ainda maior em pacientes em esquemas de tratamentos seqüenciais. Embora, muitos fatores possam ser associados com falha virológica, incluindo baixa aderência, farmacocinética dos ARVs e regimes de tratamento sub-ótimos, a emergência de variantes virais resistentes aos ARVs tem sido a principal causa de falha de tratamento. O desenvolvimento de resistência aos ARVs tem um maior impacto no tratamento destas crianças por poder levar ao aparecimento de resistência cruzada, limitando opções futuras.

A grande maioria das crianças no **Grupo B** já estavam em tratamento com ARVs há mais de 7 anos, sendo que alguns já haviam passado pela fase de monoterapia com AZT, depois terapia dupla e hoje se encontram no seu 2º, 3º e até mesmo 4º esquema de HAART. Estes fatos podem explicar a dificuldade de supressão da replicação viral e a conseqüente falha no tratamento encontrada nesta população.

Os dados aqui apresentados enfatizam a importância de identificarmos o momento apropriado para o início da terapia com ARVs, bem como a escolha

mais adequada da combinação de ARVs que leve à supressão da replicação viral de forma efetiva, sem deixarmos de considerar a importância da adesão ao esquema terapêutico por parte dos responsáveis legais por estas crianças.

**Palavras-chaves:** HIV, genotipagem, resistência, criança.

## **ABSTRACT**

Although existing protocols to prevent HIV-1 vertical transmission have contributed to reduce infection within the pediatric population in developed countries, a significant large number of children is still been infected vertically in undeveloped countries. Data regarding the latter population is still scarce. The HIV genotypic profile of a cohort of HIV-1 infected children attending to the Infectious Disease/Pediatric AIDS Ward of the Children's Hospital Nossa

Senhora da Glória - Vitória / ES was evaluated in the present work.

Our data demonstrated that both the prevalence and the level of genotypic resistance mutations were more evident among patients receiving HAART therapy (Group B) when compared to treatment naive patients (Group A), which supports the previous data showing the key role of antiretroviral (ARV) drugs selective pressure on the emergence of resistant virus isolates.

Antiretroviral primary resistance mutations were not found in the great majority of treatment naive children, supporting the hypothesis that vertical transmission occurred from mother that didn't know their serological status and were not under treatment with ARV, the highest prevalence of viral polymorphism non-related to ARV resistance was found in this group.

The main goal of ARV therapy is to achieve total suppression of viral replication, in order to prevent the emergence of ARV resistant strain. Unfortunately, in 20-50% of patients initiating HAART this total suppression is not achieved, this failure rate may be even higher among patients in sequential treatment regimens. Although several factors could be associated with treatment failure, such as non-compliance, ARV pharmacokinetics and inadequate treatment regimens, the emergence of ARV resistant viral mutants is still the main responsible for treatment failure. The development of ARV resistance has a greater impact among pediatric patients due to the fact that it may lead to cross-resistance, which may limit the use of other ARV later on.

Most of the children in Group B were under treatment with ARV for more than 7 years, including some that received AZT monotherapy, than double therapy and today are in their 2<sup>nd</sup>, 3<sup>rd</sup> or even 4<sup>th</sup> HAART regimen. This fact may explain the difficulty in achieving total suppression of viral replication and consequently the high frequency of treatment failure found among patients in this group.

Data presented here emphasize the importance of the correct timing for beginning ARV therapy, as well as the correct choice of ARV to achieve viral replication suppression efficiently, without forgetting the importance of patient compliance to the therapeutic regimen enforced by the legal guardians of these children.

**Keywords:** HIV, genotypic profile, resistance, children.





# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Histórico

A Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS/SIDA) é uma manifestação clínica avançada da infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV). Na maioria dos casos, a infecção pelo HIV leva a uma imunossupressão progressiva, especialmente da imunidade celular, e a uma desregulação da resposta imunitária, as quais facilitam o aparecimento de infecções oportunistas, neoplasias e/ou outras

manifestações (demência, caquexia, trombocitopenia etc.), condições definidoras de AIDS, quando em presença da infecção pelo HIV (CASTRO *et al.*, 1992).

A AIDS foi inicialmente descrita em 1981, quando casos incomuns de pneumonia por *Pneumocystis jiroveci*, (denominado anteriormente como *P. carinii*), sarcoma de Kaposi e comprometimento do sistema imune foram relatados, simultaneamente, em indivíduos homossexuais jovens do sexo masculino, previamente saudáveis nas cidades de Nova York, Los Angeles e São Francisco (CDC, 1981<sup>a</sup> e 1981<sup>b</sup>). O subsequente aparecimento de casos semelhantes entre hemofílicos, receptores de transfusão de sangue, usuários de drogas injetáveis e seus parceiros sexuais, sugeriu a existência de uma nova doença, até então não classificada, de etiologia provavelmente infecciosa e transmissível como causa primordial das falhas imunológicas observadas nestes pacientes.

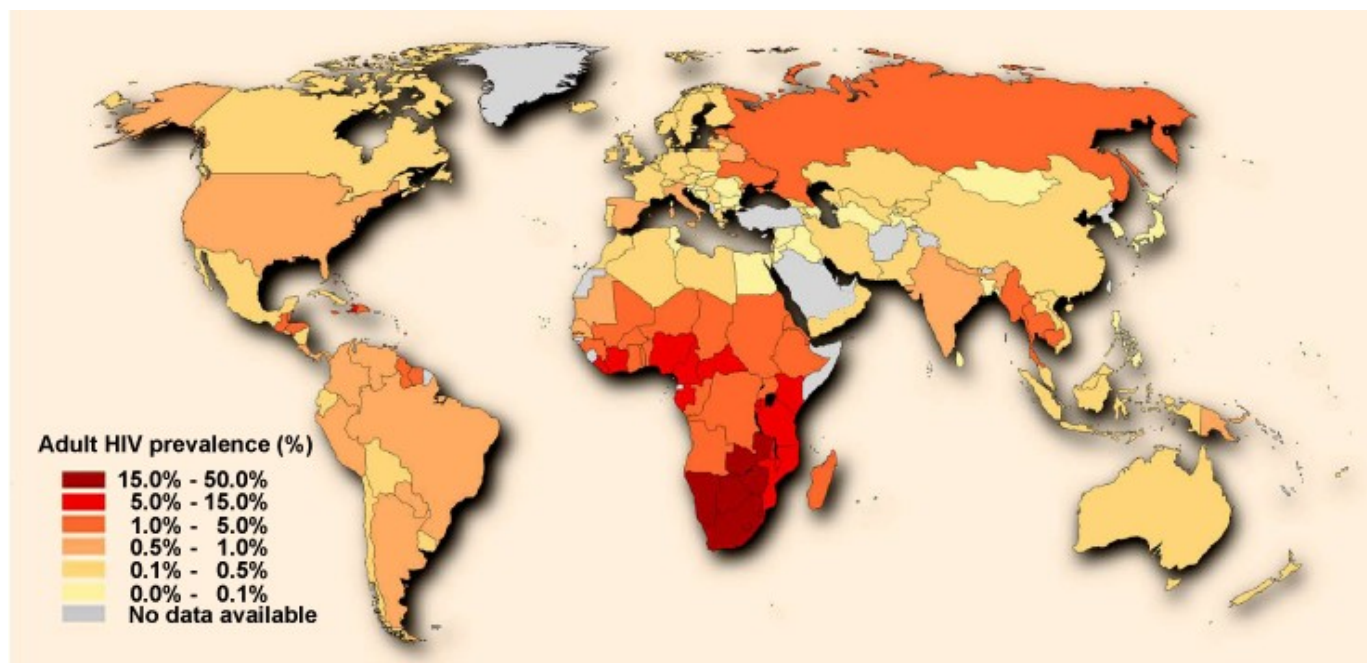
Em 1983, o HIV-1 foi isolado a partir de células de linfonodo removido de um paciente com linfadenopatia. Após um longo processo, foi reconhecida a primazia da descoberta do retrovírus aos pesquisadores do Instituto Pasteur de Paris, sob a coordenação do Dr<sup>o</sup> Luc Montagnier (BARRÉ-SINOUSI *et al.*, 1983), sendo este novo vírus batizado como LAV (Lymphadenopathy Associated Virus). Um ano após, o Dr<sup>o</sup> Robert Gallo dos Estados Unidos, confirmou a descoberta do vírus, e o denominou de HTLV-III (Human T-Lymphotropic Virus) (POPOVIC *et al.*, 1984).

Em 1985, foram desenvolvidos e licenciados para uso comercial os primeiros testes sorológicos para a detecção do vírus, usando a metodologia ELISA.

Em 1986, um comitê internacional recomendou a utilização do termo HIV (Human Immunodeficiency Virus) para denominá-lo, reconhecendo-o como capaz de infectar seres humanos (COFFIN *et al.*, 1986). Nesse mesmo ano, foi identificado um segundo agente etiológico, também um retrovírus, com características semelhantes ao HIV-1, sendo este denominado HIV-2 (CLAVEL *et al.*, 1986).

### **1.1. Epidemiologia da AIDS**

Apesar dos grandes esforços feitos para a compreensão da patogênese, epidemiologia e prevenção da infecção pelo HIV, que é considerada uma pandemia, o número de pessoas infectadas pelo vírus continua a aumentar em um ritmo alarmante. Dados da UNAIDS indicam que, caso a transmissão do HIV não seja controlada, alguns países africanos, como por exemplo Bostwana, estão fadados a ter sua população dizimada pelo HIV (WEISER *et al.*, 2003) (**Figura 1**).

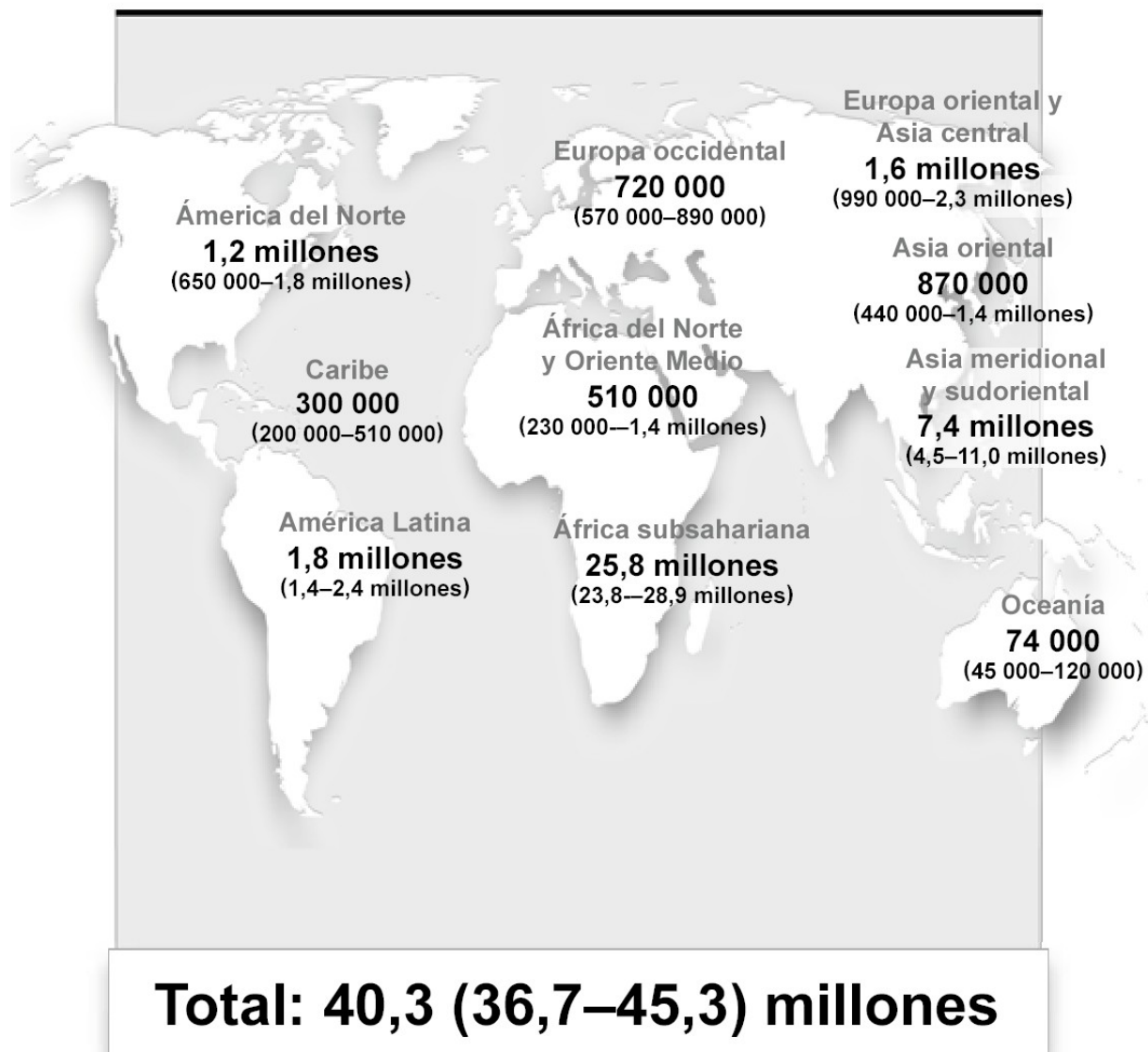


**Figura 1:** Prevalência (%) de Adultos com HIV até o final de 2004

Fonte: [www.who.int/.../hiv/facts/en/hiv\\_global2004.jpg](http://www.who.int/.../hiv/facts/en/hiv_global2004.jpg)

Desde o início da epidemia até o presente momento, 60 milhões de pessoas foram infectadas pelo HIV. Até o final de 2005, estimativas globais indicavam que 42 milhões de pessoas estavam vivendo com HIV/AIDS no mundo inteiro, com 5 milhões de novas infecções/ano e 3 milhões de óbitos só no ano do 2004. Estima-se que desde o início da epidemia ocorreram mais de 20 milhões de óbitos entre adultos e crianças (UNAIDS, 2005) (**Figura 2**). Mais de 95% das pessoas infectadas vivem em países em desenvolvimento, sendo a maioria constituída por indivíduos no auge de suas vidas produtivas, onde também ocorreram 95% de todos os óbitos, resultando em um grande impacto sócio-econômico para essas nações.

**ESTIMATIVA DO NÚMERO DE ADULTOS E CRIANÇAS VIVENDO  
COM HIV/AIDS ATÉ O FINAL DE 2005**



**Figura 2:** Estimativa do número de crianças e adultos vivendo com HIV/AIDS até o final de 2005.

Fonte: [http://www.unaids.org/epi/2005/doc/report\\_pdf.asp](http://www.unaids.org/epi/2005/doc/report_pdf.asp)

Embora ainda em patamares elevados, a epidemia de AIDS no Brasil se encontra em um processo de estabilização, tendo sido diagnosticado em 2004 um total de 13.844 casos novos, taxa de 18,2 casos por 100 mil habitantes. Entre os anos de 1980 e 2004 foi registrado um total de 362.364 casos no país (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO, CN-DST/AIDS -MS; 2004). Desse total, 2,01% casos são oriundos da região Norte, 9% da região Nordeste, 4,82% da região Centro-Oeste, 17,10% da região Sul e 67,07% pertencem à região Sudeste. A tendência de aumento da incidência da doença vem sendo observada em todas as regiões geográficas, com exceção da região Sudeste, a qual apresentou, em 2004, uma taxa de incidência

menor do que a observada em 1998. Apesar do crescimento pronunciado nas demais regiões, principalmente nas regiões Sul, Centro-Oeste e Norte, a taxa de mortalidade permaneceu estável em 6,4 óbitos por 100 mil habitantes em 2004.

A tendência à estabilização da incidência da doença tem sido observada apenas entre homens, alterando a razão entre indivíduos do sexo masculino e feminino de 28 homens para 1 mulher em 1985, para 3 homens para 2 mulheres em 2004. Esta mudança no perfil epidemiológico do HIV/AIDS deve-se ao aumento da transmissão heterossexual da doença, a qual associada à vastidão territorial e diversidade socio-geográfica do país, dificultam as atividades de acompanhamento, tornando indispensável o conhecimento mais profundo e preciso sobre a natureza da epidemia em cada região, unidade da federação e município (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO, CN-DST/AIDS -MS; 2004)

SZWARCWALD *et al.* (2000) constataram que a epidemia pelo HIV/AIDS no Brasil experimentou modificações profundas no seu escopo: no início era predominantemente regional e basicamente restrita a determinados segmentos populacionais (os chamados grupos de risco), passando ao longo do período, a crescentemente nacional e dispersa entre as mais variadas populações. Essas mudanças trouxeram novos desafios às políticas públicas e à ação da sociedade civil.

No Brasil, os primeiros casos de AIDS na população infantil foram notificados em 1982 e tinham como fator de risco a transfusão de sangue ou hemoderivados (MOREIRA *et al.*, 1993). A partir de 1985, dois fatores levaram à mudança desse perfil epidemiológico: a obrigatoriedade da sorologia anti-HIV em todo sangue coletado associada à uma evolução tecnológica na produção de hemoderivados e ao mesmo tempo, ao aumento do número de mulheres infectadas pelo HIV.

A feminilização da AIDS é um reflexo do comportamento sócio-sexual da população, associada a aspectos de vulnerabilidade biológica e de gênero. A mulher considera-se menos exposta ao risco, talvez pela sua entrada mais tardia na dinâmica da epidemia, não se enquadrando nos chamados “grupos de risco” associados ao início da pandemia.

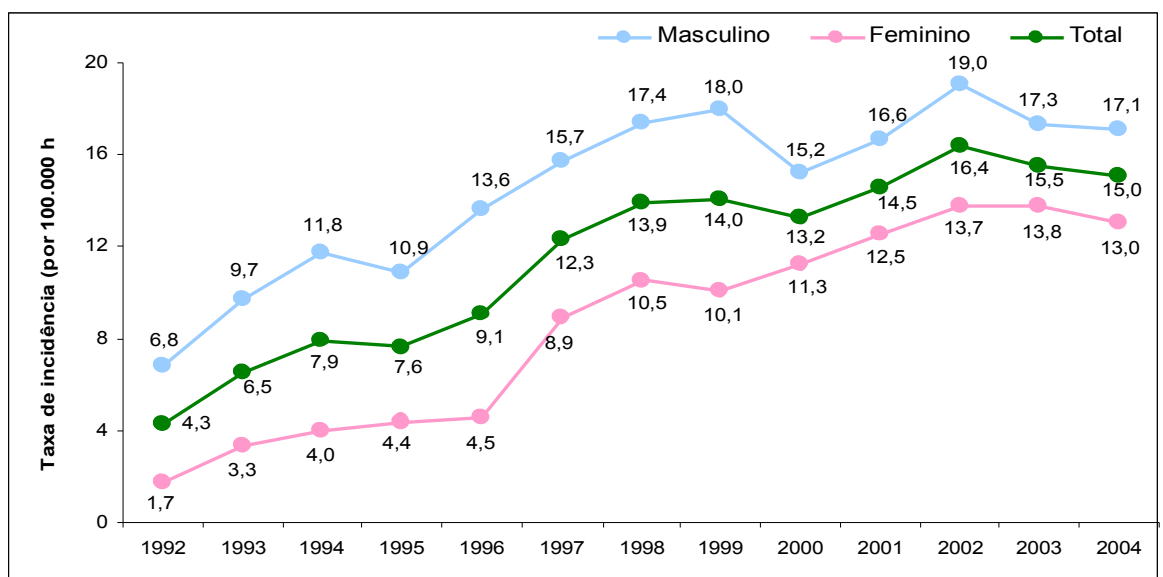
Como consequência do aumento de casos de AIDS em mulheres, observa-se também o aumento da transmissão vertical (transmissão do HIV da mãe para o filho), atualmente responsável por mais de 90% dos casos de AIDS entre menores de 13 anos de idade.

Em 1994, um estudo (Protocolo 076 do AIDS Clinical Group –PACTG 076) utilizando a Zidovudina (AZT) na mãe durante a gestação e no parto, ao recém-nascido

durante as primeiras seis semanas de vida, e contra-indicação de amamentação, provou ser capaz de reduzir a transmissão vertical em até 67,5% (CONNOR *et al*, 1995). Ainda assim, no Brasil tais medidas têm sido insuficientes para impedir a transmissão vertical. Isso acontece, dentre outros motivos, porque a cobertura de realização de testes para o HIV no pré-natal no País é muito inferior ao desejado (BOLETIM EPIDEMIOLOGICO CN-DST/AIDS, 2005).

### 1.3. Epidemiologia da AIDS no Estado do Espírito Santo

No Estado do Espírito Santo, durante o período de Janeiro de 1985 até Novembro de 2005, foram notificados 5.002 casos de AIDS à Coordenação Estadual de DST e AIDS. A distribuição do número total de casos por gênero é de 3.161 (63,2%) entre homens e 1.841 (36,8%) entre mulheres. No mesmo período, foram notificados 290 casos em crianças menores de 13 anos de idade, sendo mais de 90% devido à transmissão vertical. Nos últimos cinco anos (1999-2004) foi reportada uma média anual de 468 casos. Sendo que em 2005, a taxa de incidência encontrada foi de 14,9 casos por 100 mil habitantes. A razão por gênero passou de 4,0 (1992) para 3,0 (1996) e manteve-se em 1,3 nos anos de 2000-2002-2004 (**Figura 3**). A faixa etária mais atingida foi de 20-49 anos com 82,4% dos casos notificados (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO, CE DST- AIDS/SESA ES, 2005).

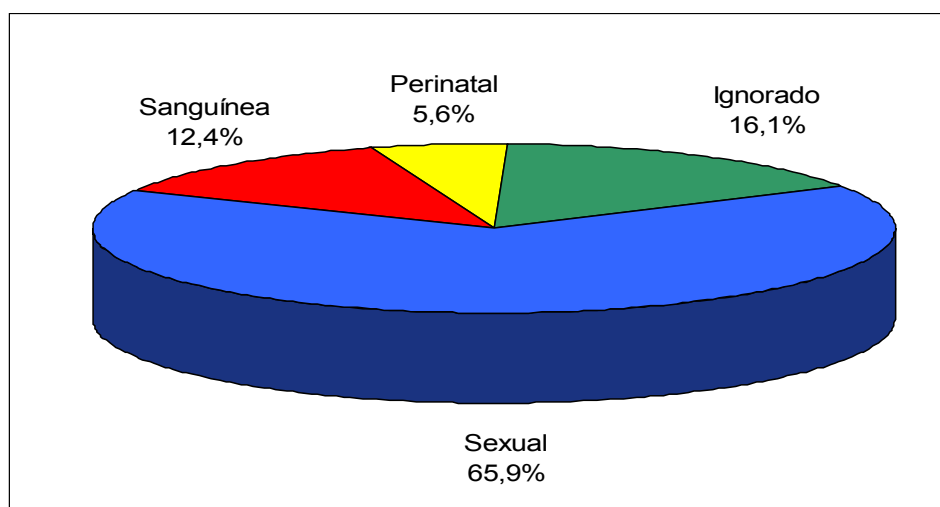


**Figura 3.** Taxa de Incidência (por 100 mil habitantes) de casos notificados, período de 1992 a 2005, no Estado do Espírito Santo, segundo sexo<sup>(\*\*)</sup>.

\*Fonte: SESA-ES / C.E. DST-AIDS

\*\* Dados preliminares até Dezembro/2005, sujeitos à revisão

A categoria de exposição mais expressiva continua sendo a sexual, a qual representa 65% dos casos notificados (18,0% homossexual, 13,0% bissexual, e 69,0% heterossexual), seguindo-se da categoria de exposição sanguínea a qual correspondeu a 12,8% dos casos notificados (sendo 89,2% destas notificações em usuários de drogas injetáveis) (**Figura 4**). Desde 1999, no Estado do Espírito Santo, não há notificação de pessoas contaminadas por transfusão sanguínea, demonstrando a qualidade alcançada pelos Bancos de Sangue nos últimos anos, a qual impactou diretamente na transmissão do HIV por hemoderivados.



**Figura 4.** Distribuição dos casos de Aids, no Estado do Espírito Santo, segundo categoria de exposição de 1985-2005\* (\*\*).

\*Fonte: SESA-ES / C.E. DST-AIDS(\*\*) Dados preliminares até Agosto/2005, sujeitos à revisão

No Estado do Espírito Santo, no período de 1985 até Novembro de 2005, foram notificados 290 casos de Aids em crianças menores de 13 anos de idade à Coordenação Estadual. A **Tabela 1** mostra a distribuição segundo o ano de diagnóstico e sexo.

**Tabela 1.** Distribuição de casos de Aids em menores de 13 anos segundo o ano e sexo\*. Espírito Santo - 1985-2005\*\*

Ano	Masculino		Feminino		Total	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
1985-1991	8	80,0	2	20,0	10	3,4
1992	2	33,3	4	66,7	6	2,1
1993	3	42,9	4	57,1	7	2,4
1994	10	71,4	4	28,6	14	4,8
1995	5	35,7	9	64,3	14	4,8
1996	10	66,7	5	33,3	15	5,2



1997	15	50,0	15	50,0	30	10,3
1998	16	51,6	15	48,4	31	10,7
1999	8	33,3	16	66,7	24	8,3
2000	12	42,9	16	57,1	28	9,7
2001	9	28,1	23	71,9	32	11,0
2002	13	59,1	9	40,9	22	7,6
2003	14	50,0	14	50,0	28	9,7
2004	8	40,0	12	60,0	20	6,9
2005	7	77,8	2	22,2	9	3,1
Total	140	48,3	150	51,7	290	100,0

\*Fonte: SESA-ES / C.E. DST-AIDS    \*\* Dados preliminares até dez/2005, sujeitos à revisão.

#### 1.4. Formas de Transmissão

Embora já tenha sido isolado de vários fluídos corporais, a transmissão do HIV ocorre freqüentemente através de exposição a sangue, hemoderivados, sêmen, fluído vaginal ou leite materno contaminados. Dessa forma, as possíveis vias de transmissão são: sexual (relações homo e heterossexuais) (STEWART, 1995); sanguínea (receptores de sangue ou hemoderivados e em usuários de drogas intravenosas) (BUSCH, 1995); vertical (gravidez, parto e aleitamento materno) (ORLOFF *et al.*, 1996) e ocupacional (acidente de trabalho em profissionais da área da saúde) (WIZNIA *et al.*, 1996).

A principal forma de transmissão do HIV em todo o mundo continua sendo por via sexual, sendo as infecções adquiridas através de relações heterossexuais sem proteção, as mais freqüentes (ASKEN & BERER, 2003). Vários fatores estão associados ao aumento do risco de transmissão do HIV durante uma relação heterossexual, dentre eles: alta viremia, imunodeficiência avançada, relação anal, relação sexual durante a menstruação, imaturidade do aparelho genital (mulheres pré-púberes e adolescentes jovens) e presença de doenças sexualmente transmitidas (DST), principalmente as ulcerativas. Sabe-se hoje que não só as úlceras resultantes de infecções como cancro mole, sífilis e herpes genital aumentam o risco de transmissão do HIV, mas também outras DST, como as que causam corrimentos ou verrugas, também contribuem com a transmissão por essa via, devido a presença de uma rica população de células do sistema imune nas mucosas, dentre elas as células dendríticas (células de Langerhans).

A transmissão decorrente de transfusão com sangue e/ou hemoderivados contaminados é cada vez menos freqüente nos países que adotaram medidas de controle da qualidade do sangue utilizado, como é o caso do Brasil (desde 1986).

A transmissão ocupacional pode ocorrer quando profissionais da área de saúde sofrem ferimentos com instrumentos perfuro-cortantes contaminados com sangue ou outros fluídos. Estima-se que o risco de contrair o HIV após uma exposição percutânea a fluidos biológicos contaminados seja de aproximadamente 0,3%, sendo que nos casos de exposição direta das mucosas, esse risco é de aproximadamente 0,09%. Os fatores de risco já identificados como favorecedores deste tipo de contaminação são: a profundidade e extensão do ferimento, a presença de sangue

contaminante visível no instrumento que produziu o ferimento, o acidente envolver agulha colocada diretamente na veia ou artéria de paciente portador de HIV e, finalmente, o paciente fonte da infecção apresentar altos níveis de carga viral. Quando iniciada entre 1 e 2 horas após o acidente, a profilaxia com anti-retrovirais reduz em cerca de 81% a chance de transmissão do HIV (PANLILIO *et al.*, 2004).

A maioria (65%) dos casos de transmissão materno-infantil (vertical) ocorre geralmente durante o trabalho de parto e no parto propriamente dito. Os demais casos (35%) ocorrem intra-útero, principalmente nas últimas semanas de gestação (ROUZIOUX *et al.*, 1995, KALISH *et al.*, 1997, BERTOLI *et al.*, 1996). O aleitamento materno representa um risco adicional de transmissão, estimado entre 7% a 22% (DUNN *et al.*, 1992, TESS *et al.*, 1998, BOBAT *et al.*, 1997). Os fatores que aumentam o risco de transmissão do HIV da mãe para filho podem ser divididos em: **a) fatores virais:** tais como a carga viral, genótipo e fenótipo viral, diversidade circulante e resistência viral; **b) fatores maternos:** tais como ao estado clínico e imunológico, presença de DST e outras co-infecções e o estado nutricional da mulher (LAWN *et al.*, 2001, THEA *et al.*, 1997); **c) fatores obstétricos:** tais como a duração da ruptura das membranas amnióticas, via de parto e a presença de hemorragia intraparto e, **d) fatores inerentes ao recém-nascido:** tais como a prematuridade, baixo peso ao nascer e aleitamento materno. Reconhece-se, hoje, a carga viral elevada como um dos principais fatores associados à transmissão perinatal do HIV (MAYAUX *et al.*, 1997; COLL *et al.*, 1997; O'SHEA *et al.*, 1998) e a ruptura prolongada das membranas amnióticas (BURTON *et al.*, 1996; MANDELBROT *et al.*, 1996). Portanto, o uso de terapia anti-retroviral combinada é capaz de reduzir a carga viral plasmática do HIV à níveis abaixo do limite de detecção, resultando em taxas de transmissão inferiores a 3% (KIND *et al.*, 1998; MANDELBROT *et al.*, 1998).

## 1.5. Biologia do HIV

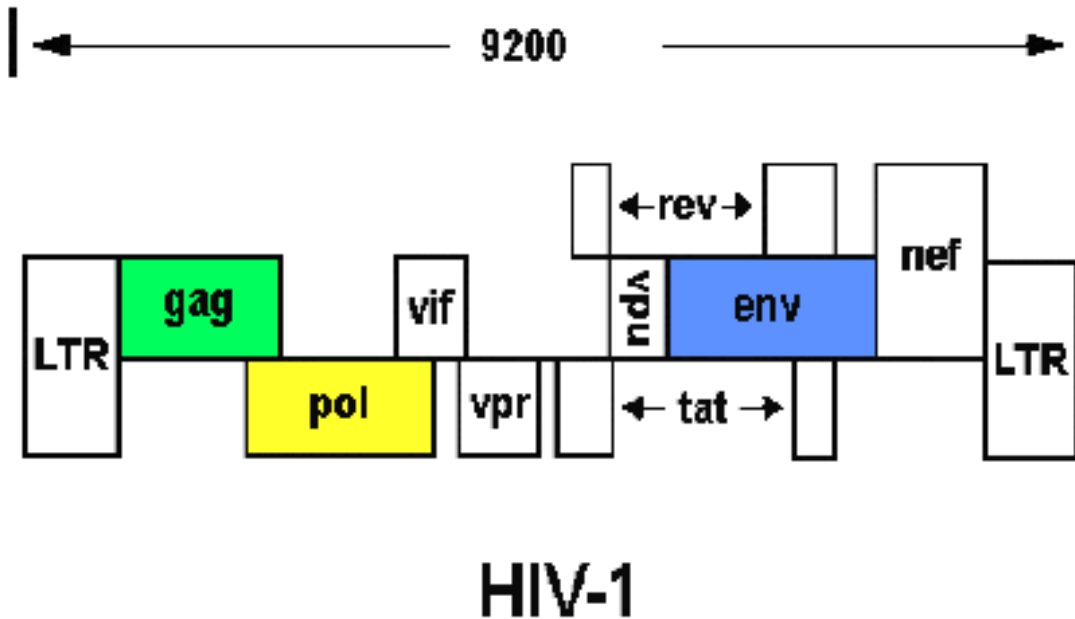
O HIV é um vírus envelopado, pertencente ao gênero *Lentivirus* e à família *Retroviridae*, os quais se caracterizam por causar infecção persistente com longo período de incubação (LÉVY, 1993). Existem dois tipos geneticamente distintos, o HIV-1 e o HIV-2. O HIV-1 possui uma distribuição cosmopolita e tem se mostrado mais virulento e o mais freqüentemente transmitido (MARLINK *et al.*, 1994). Embora já tenham sido identificados casos esporádicos de infecção pelo HIV-2 em outros

continentes, este vírus é endêmico na África Ocidental (REEVES and DOMS, 2002), e atualmente se dissemina na Índia (KANNANGAI *et al.*, 2000; KANNANGAI *et al.*, 2003).

O HIV-1 e o HIV-2 são vírus intimamente relacionados ao vírus da imunodeficiência símia (SIV), que infectam macacos africanos, indicando que a origem das infecções pelo HIV seja relacionada a eventos de transmissão do SIV entre espécies diferentes de primatas (ALAEUS, 2000; HAHN *et al.*, 2000). De fato, o reservatório primata do vírus ancestral HIV-2 foi identificado como sendo macacos “sooty mangabey” (*Cercocebus atys*) (HIRSCH *et al.*, 1989; CHEN *et al.*, 1997). Porém, a origem do HIV-1 tem sido mais difícil de elucidar. Acredita-se, atualmente, que o HIV-1 seja originário de um retrovírus (SIVcpz) isolado de uma subespécie de chimpanzés, denominada *Pan troglodytes troglodytes* (GAO *et al.*, 1999). Todos os membros da família de retrovírus possuem estrutura genômica semelhante, apresentando homologia em torno de 50%. Além disso, todos têm a capacidade de infectar linfócitos através do receptor CD4. GAO *et al.* (1999) demonstraram que o vírus da imunodeficiência símia da linhagem SIVcpz, possui uma similaridade de 90% com o HIV-1.

Cada partícula viral contém duas cópias de um genoma RNA de fita simples com polaridade positiva e um tamanho de 9,2 kilobases, transcrito em DNA na célula infectada e integrado ao cromossomo da célula hospedeira (WAIN-HOBSON *et al.*, 1985). Esses transcritos de RNA servem como mRNA dirigindo a síntese de proteínas virais e posteriormente, como RNA genômicos nas novas partículas virais que escapam da célula infectada por brotamento da membrana plasmática.

O genoma completo do HIV consiste de nove genes ladeados por longas sequências terminais repetitivas (LTRs), as quais são necessárias para a integração do provírus ao DNA da célula hospedeira e contêm sítios de ligação para proteínas reguladoras dos genes. As LTRs podem ser divididas em três subregiões: U3, R e U5, com funções na integração e transcrição viral (WU & MARSH, 2003).



**Figura 5:** Organização genômica do HIV-1.

Fonte: [www.bioscience.org/1997.v2/d/gottfred/fig2.jpg](http://www.bioscience.org/1997.v2/d/gottfred/fig2.jpg).

O HIV tem três genes principais: *gag*, *pol*, *env* e seis pequenos genes acessórios codificando proteínas auxiliares que afetam a replicação viral e a virulência: *Rev* (regulador da expressão do vírion); *Tat* (transativador da transcrição); *Nef* (fator regulatório negativo); *Vif* (fator de infectividade do vírion); *Vpu* (proteína viral U) e *Vpr* (proteína viral R) (revisto por MORROW *et al.*, 1994).

Algumas proteínas, como a *Tat* e *Rev*, são claramente essenciais para a replicação viral e afetam a expressão gênica, sendo denominadas proteínas regulatórias. As demais são essenciais para a maturação da partícula viral e também exercem papéis importantes na replicação viral.

## GAG

A primeira região gênica estrutural é a *gag* que codifica as proteínas estruturais do cerne viral, sendo traduzido em uma poliproteína precursora, cujo processamento proteolítico origina a proteína de matriz (p17), que se associa à face interna do envelope e ao capsídeo; a proteína do capsídeo (p24), constituinte da estrutura que abriga e protege o RNA genômico viral e enzimas virais, sendo o antígeno viral detectado mais precocemente, portanto, sua detecção é importante no diagnóstico das infecções agudas; e a proteína do nucleocapsídeo (p7), que se associa ao RNA genômico viral contido no interior do capsídeo, e a p6 (MORROW *et al.*, 1994).

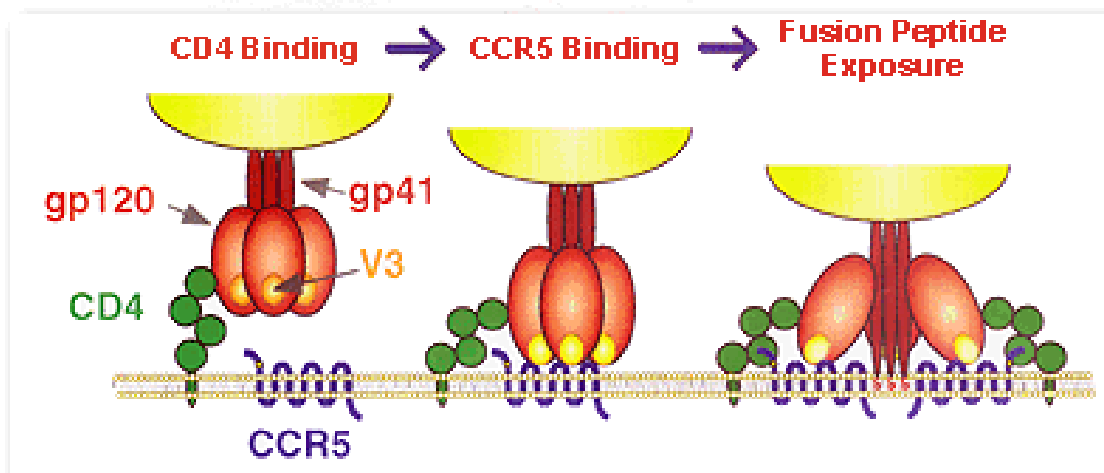
## **POL**

A segunda região é a *pol*, a qual codifica todas as enzimas necessárias para a replicação e integração do HIV. A protease, transcriptase reversa e integrase são inicialmente sintetizadas sob a forma de um precursor Pr160<sup>gag-pol</sup>, que no momento da montagem de novos vírions sofre uma autocatálise da protease viral, liberando-a do restante do precursor. A protease então irá clivar todas as demais proteínas contidas no precursor, iniciando o processo de maturação viral. A clivagem proteolítica de gag e gag/pol é absolutamente essencial para infectividade das partículas. Mutações no gene responsável pela codificação da protease, por exemplo, podem tornar a protease inativa ou com atividade reduzida, resultando na produção de partículas virais imaturas, não infecciosas ou com diminuição do índice replicativo viral (fitness) (ALDOVINI, *et al.*, 1990; KOHL, *et al.*, 1998; GOTTLINGER *et al.*, 1989). A transcriptase reversa apresenta múltiplas atividades catalíticas, incluindo uma atividade de DNA polimerase, que copia moldes de DNA ou RNA (HIRSCH & D'ÁQUILA, 1993) e uma atividade de ribonuclease H (Rnase H), a qual degrada especificamente a cadeia de RNA contida em um complexo híbrido RNA-DNA (HANSEN *et al.*, 1988). A integrase é essencial para a integração do DNA retroviral no cromossomo da célula hospedeira (GRANDGENETT & MUMM, 1990).

## **ENV**

A terceira região gênica estrutural, *env*, codifica a porção mais externa da partícula viral, o envelope. Este é formado por uma bi-camada fosfolipídica de origem celular, obtida no momento do brotamento do vírion, carregando porções da membrana citoplasmática da célula hospedeira infectada. A glicoproteína precursora gp160, deve ser clivada por uma protease da célula hospedeira em gp120 (proteína de superfície) e gp41 (proteína transmembranar), que são então montadas como trímeros no envelope viral (LU, BLACKLOW & KLIM, 1995; SANDERS *et al.*, 2002). Devido à sua localização na superfície do vírion, as glicoproteínas do envelope viral desempenham importantes funções no reconhecimento, na entrada do vírus na célula hospedeira e na subsequente fusão de membranas, etapas fundamentais no ciclo biológico do HIV-1. A proteína gp120 apresenta em sua estrutura domínios conservados (C1 a C5) e domínios hipervariáveis (V1 a V5). O terceiro domínio hipervariável (alça V3) além de ser um importante epítopo para neutralização, tropismo viral e indução de sincício e ainda contém os determinantes que interagem com o receptor celular CD4 (NEHETE

*et al.*, 2002; DETTIN *et al.*, 2003). A função primária da gp41 é mediar a fusão entre as membranas viral e celular após a ligação ao receptor (CXCR4 ou CCR5) (HERNANDEZ *et al.*, 1996). A interação entre a gp120 e o CD4 causa mudanças estruturais que facilitam a ligação ao co-receptor e a subsequente entrada do vírus na célula (revisto por FRANKEL & YOUNG, 1998) (Figura 6). As alterações conformacionais possuem dois objetivos. O primeiro é agir como um sinal para o início da Transcrição Reversa e o outro é o de promover a desmontagem do núcleo-capsídeo para a liberação do genoma viral no citoplasma da célula hospedeira.



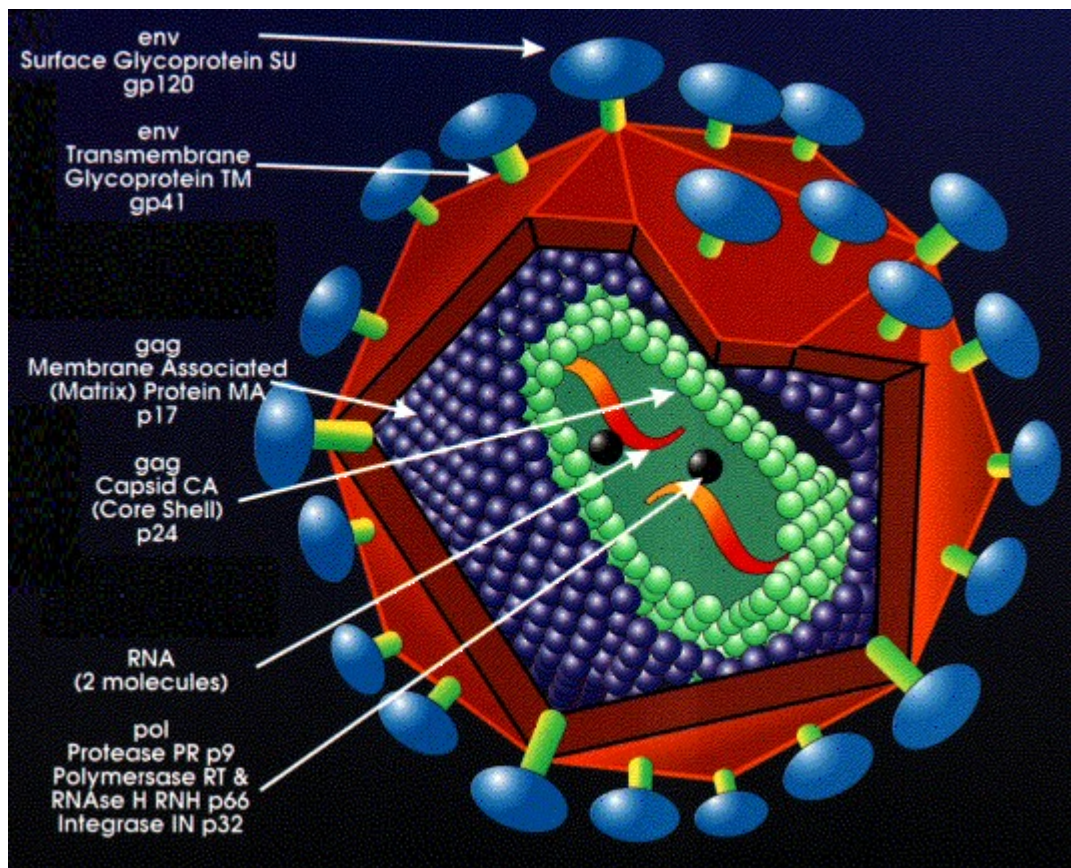
**Figura 6.** Interação entre a gp120 e o CD4 causando mudanças estruturais que facilitam a ligação ao co-receptor e a subsequente entrada do vírus na célula.

Fonte: [www.chemsoc.org/.../images/1999/johnston\\_jun99\\_fig1.gif](http://www.chemsoc.org/.../images/1999/johnston_jun99_fig1.gif)

Os principais co-receptores para o HIV, são receptores de quimiocinas: a) o CCR5, expresso nas células dendríticas, macrófagos e células T CD4 e b) o CXCR4, expresso predominantemente nas células T (revisto por FRANKEL & YOUNG, 1998). Após a ligação simultânea da gp120 ao receptor (CD4) e ao co-receptor (CCR5 ou CXCR4), a gp41 promove a fusão do envelope viral com a membrana citoplasmática da célula, permitindo que o genoma viral e as proteínas virais associadas cheguem ao citoplasma (STEIN *et al.*, 1987). No citoplasma ocorre a transcrição reversa do RNA viral de fita simples, resultando na síntese do DNA viral de fita dupla através da reação da enzima transcriptase reversa. Em seguida, o cDNA, também conhecido como DNA pró-viral é transportado até o núcleo celular onde ocorre a integração do mesmo ao genoma da célula infectada mediada pela enzima integrase. Os produtos iniciais da expressão gênica viral são pequenos RNAs processados por “*splicing*” (corte e junção) que codificam as proteínas regulatórias *Tat*, *Rev* e *Nef*. A proteína *Rev*, codificada pelo gene *rev*, é responsável pelo controle dos processos de “*splicing*” e por facilitar o

transporte do RNA viral do núcleo para o citoplasma. A proteína *Tat*, codificada pelo gene *tat*, atua como transativador, aumentando os níveis de transcrição dos genes do HIV, sendo o único fator de transcrição viral absolutamente indispensável para a replicação viral *in vitro* (VAISHNAV and WONG-STAAAL, 1991). A função da proteína *Nef*, no ciclo replicativo, continua sendo uma incógnita até hoje, já a proteína *Vif*, é capaz de aumentar em 1.000 vezes o nível de infectividade viral (SAKAI *et al.*, 1991). Os últimos estágios de ciclo replicativo do HIV envolvem a montagem dos componentes virais para a formação do vírion, sua liberação da célula através do processo de brotamento, e sua maturação em partículas virais infecciosas.

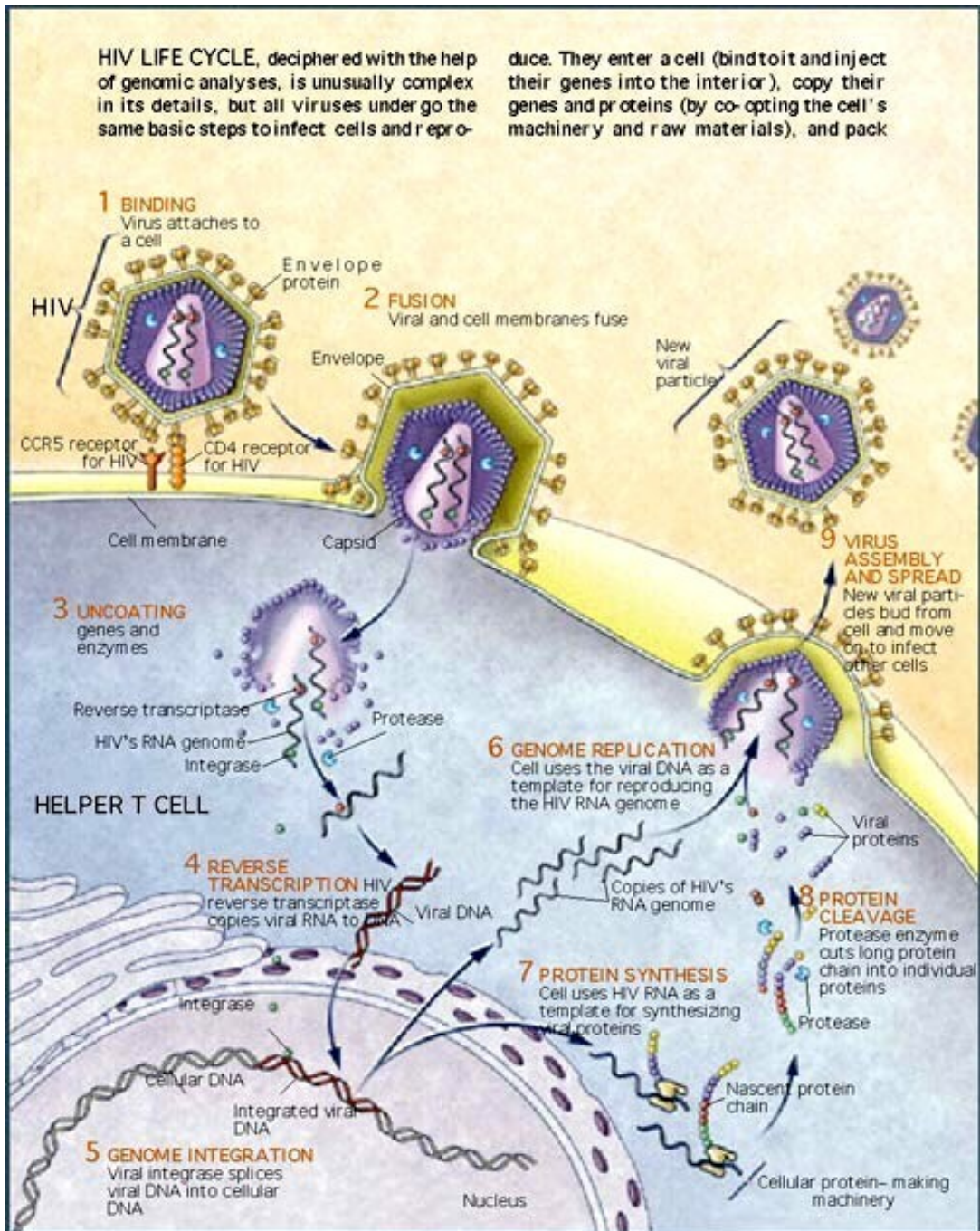
A organização estrutural do HIV-1 encontra-se ilustrada na **figura 7**, e o ciclo de replicação do HIV-1 encontra-se detalhado na **figura 8**.



**Figura 7.** Organização estrutural do HIV-1.

Fonte: [www.wellesley.edu/.../chem101/hiv/maturhiv.gif](http://www.wellesley.edu/.../chem101/hiv/maturhiv.gif).



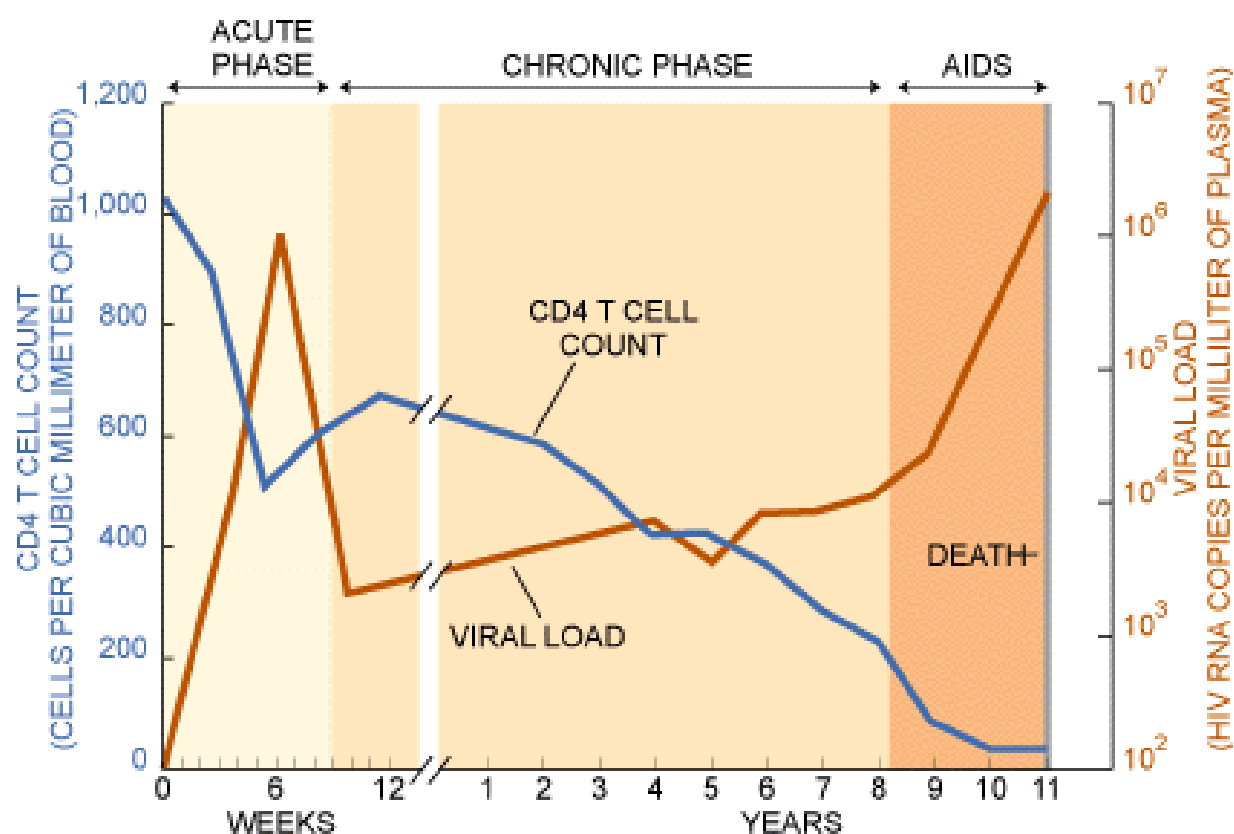


**Figura 8.** Ciclo de vida do HIV.  
Fonte: [hiv.buffalo.edu/html/hiv\\_pharm.html](http://hiv.buffalo.edu/html/hiv_pharm.html)

## 1.6. Patogênese

O curso clínico da infecção pelo HIV inclui, geralmente, três estágios: a) infecção primária (ou fase aguda), b) latência clínica e c) AIDS (figura 9) (PANTALEO *et al.*, 1993; LIFSON *et al.*, 1988). A carga viral plasmática durante todos os estágios da infecção pode variar substancialmente, de 50 a 11 milhões de vírions/ml (PIATAK *et al.*, 1993). A infecção aguda é um período de intensa replicação viral, com o HIV colonizando órgãos linfóides em diversas áreas do organismo que funcionam como reservatórios de células infectadas, causando um aumento no número de partículas virais no sangue periférico e uma queda significativa nos níveis das células T CD4+ circulantes (TINDALL & COOPER, 1991). Durante esta fase, a maioria (80-90%) dos pacientes desenvolve um quadro gripal ou uma síndrome que se assemelha à síndrome de mononucleose (febre, mialgias, linfadenopatia, faringite, cefaléia e “rash” cutâneo) (KAHN & WALKER, 1998). Essa viremia aguda está associada com a ativação das células T CD8+, as quais destroem as células infectadas pelo HIV, e subsequente, à produção de anticorpos, que leva à soroconversão. A maioria dos pacientes infectados desenvolverá AIDS após um período de quiescência aparente da doença, denominada de fase de latência clínica ou período assintomático, caracterizada por uma replicação persistente do vírus e um declínio gradual da função e do número das células T CD4+ (**figura 9**).

O prognóstico dos indivíduos infectados pelo HIV é extremamente variável, sendo, o tempo decorrido entre a soroconversão e o desenvolvimento de AIDS é estimado em pouco mais de 10 anos em média (MUÑOZ *et al.*, 1995). No entanto, uma pequena proporção de pacientes pode vir a desenvolver AIDS em um tempo inferior a 5 anos. Existem relatos de casos de imunossupressão severa até 2 meses após a soroconversão (ISAKSSON *et al.*, 1988). Por outro lado, existem pacientes que permanecem estáveis por mais de 10 anos sem alterações no seu estado imunológico ou sinais de progressão, segundo alguns autores, esses indivíduos são denominados de “*long-term non-progressors*”, e podem permanecer livres da doença por até 20 anos (MUÑOZ *et al.*, 1995).



**Figura 9.** Progressão da Infecção pelo HIV em pacientes não tratados

Fonte: [www.wellesley.edu/.../ Chem101/hiv/HIV-1.htm1](http://www.wellesley.edu/.../Chem101/hiv/HIV-1.htm1)

Nas crianças infectadas por transmissão vertical observa-se uma ativação policlonal de precursores de linfócitos B, devido à presença do HIV ou de seus antígenos (KRIVINE *et al.*, 1992). Esta ativação provoca o aparecimento de hipergamaglobulinemia policlonal e da inabilidade funcional das células B frente a novos antígenos, tanto T-dependentes quanto T-independentes (ROSENBERG & FAUCI, 1994). Estudos de produção espontânea de anticorpos em cultura de linfócitos de pacientes pediátricos demonstraram que 20% a 50% da produção total de imunoglobulinas é dirigida contra antígenos do HIV (AMADORI & CHIECO-BIANCHI,

1990). Essas alterações no sistema imune humoral antecedem, na maioria dos casos, às alterações de imunidade celular, levando a um quadro clínico constituído primariamente por infecções bacterianas de repetição causadas por agentes comuns a esta faixa etária (WILFERT, 1998). Este quadro clínico não é habitualmente observado nas crianças infectadas mais tardiamente ou nos adultos, pois parece não haver interferência nas células de memória presentes nestes indivíduos.

Sabe-se que os níveis médios da carga viral do HIV-1 em crianças infectadas via perinatal apresentam-se elevados nos dois primeiros meses de vida e evoluindo em seguida para uma queda gradual até a idade de 2 anos, contrastando significativamente com o controle mais rápido da replicação viral observada em pacientes adultos, os quais alcançam uma estabilização do nível de RNA viral em torno de 6 meses pós-infecção (SHEARER *et al.*, 1997; LUZURIAGA *et al.*, 1999).

Foi demonstrado por GEA-BANALOCHE *et al.*, 1998 que a diminuição do número de células T CD4+ induzida pela infecção pelo HIV, acompanhada por uma perda progressiva da diversidade do repertório de receptores de células T, resulta em uma queda da resposta imune a antígenos *in vitro* e a uma maior suscetibilidade a patógenos oportunistas *in vivo*. Portanto, a contagem de linfócitos T CD4+ tem sido considerada um importante marcador da progressão para a doença, assim como para a introdução e avaliação da terapia antiretroviral. A quantificação da carga viral, introduzida mais recentemente na rotina laboratorial de avaliação dos indivíduos infectados pelo HIV, é um parâmetro importante para o acompanhamento da dinâmica da população viral circulante no indivíduo (MELLORS *et al.*, 1996), assim como da eficácia terapêutica dos anti-retrovirais.

### 1.7. Drogas Antiretrovirais

Avanços terapêuticos ocorridos nos últimos anos, principalmente com a introdução da terapia anti-retroviral de alta potência (HAART), têm permitido modificar a história natural da infecção pelo HIV em crianças (GORTMAKER *et al.*, 2001). O esquema terapêutico HAART consiste na combinação de diferentes drogas anti-retrovirais, sendo elas: **a) inibidores de transcriptase reversa análogos de nucleosídeos**, dos quais o AZT foi o primeiro a surgir em março de 1987, permanecendo por longo período com monoterapia, para em outubro de 1991 surgir o DDI e em 1995 iniciando a fase da terapia dupla com o surgimento de outros ITR; **b) inibidores da transcriptase reversa não análogos de nucleosídeos**, que atuam

após a entrada do vírus na célula e antes que este se integre ao genoma celular; a Nevirapina foi a primeira desta classe de drogas a surgir em junho de 1996, posteriormente o Efavirenz em setembro de 1998; **c) inibidores da protease**, que exercem seu papel no momento em que ocorre a produção e a liberação de novas partículas virais (PERELSON *et al.*, 1997); iniciou-se então a era do HAART, sendo o Ritonavir o primeiro a surgir em março de 1996 (primeiro IP liberado para uso em pediatria) e daí seguiram os demais; **d)** em outubro de 2001 surgiu a nova classe denominada **ITR análoga aos nucleotídeos** que tem como representante o Tenofovir; e **e)** recentemente, em 2004, surgiram os **inibidores de entrada do HIV-1**, moléculas que se ligam a superfície celular ou a superfície viral impedindo a ligação entre o vírus e co-receptores celulares. Desta forma, o ciclo replicativo do HIV-1 é inibido em sua fase mais precoce. Por se tratarem de drogas novas e de classe diferente das que têm sido utilizadas atualmente, não haverá resistência cruzada entre essas e os inibidores de transcriptase reversa ou inibidores da protease (KILBY *et al.*, 1998).

### **1.8. Determinantes de Falhas Terapêuticas**

Os objetivos da terapêutica anti-retroviral são: a supressão máxima da replicação viral, a restauração e/ou preservação da função imune, melhoria da qualidade de vida, redução da morbidade e mortalidade relacionada à infecção pelo HIV. Estes objetivos são atingidos quando a carga viral (n.º de moléculas de RNA viral) no plasma se torna indetectável, um nível no qual a resistência aos anti-retrovirais tem menos probabilidades de ocorrer (HAVLIR & RICHMAN, 1996; CONDRA & EMINI, 1997). A impossibilidade de suprimir completamente a replicação viral conduz quase que invariavelmente à seleção de variantes resistentes às drogas utilizadas.

Inúmeros fatores podem contribuir para falha terapêutica aos anti-retrovirais, sendo a baixa aderência ao tratamento uma das causas mais freqüentes, dada a complexidade da posologia e os efeitos colaterais dos esquemas terapêuticos (D'ARMINIO *et al.*, 2000). As causas farmacológicas também têm papel na falha terapêutica, dentre estas: absorção deficiente da droga, eliminação acelerada da medicação, penetração deficiente em alguns santuários de replicação viral e interações com outros medicamentos (BEAN *et al.*, 2000). Há evidências que fatores virais ou relacionados ao sistema imune do hospedeiro poderiam influenciar também a resposta terapêutica (ACCETTURI *et al.*, 2000).

## 1.9. Tipos de Resistência aos anti-retrovirais

A resistência aos antiretrovirais constitui uma das principais causas de falha terapêutica, podendo ser **viral** ou **celular**.

A **resistência celular** pode interferir na **penetração** ou na **ativação** da droga, a partir de um mecanismo semelhante ao que proporciona a resistência das células neoplásicas aos quimioterápicos, podendo haver alteração na concentração intracelular dos **inibidores da protease**, por ação da **glicoproteína p** (LEE *et al.*, 1998; KIM *et al.*, 1998). A glicoproteína *p* se expressa na superfície celular, em alguns casos, é responsável pela extrusão dos IPs após sua absorção, tanto no trato gastrointestinal, como nos linfócitos. Teoricamente, poderia haver um aumento na expressão da glicoproteína *p* na superfície celular diretamente proporcional a duração do uso do IP, levando a uma conseqüente queda na concentração intracelular da droga.

Com relação aos **inibidores da transcriptase reversa análogos aos nucleosídeos (ITRN)**, a resistência celular estaria relacionada à ativação da droga, mais especificamente à **fosforilação**. Todos os ITRN necessitam da ativação em sua forma trifosfato, que seria na verdade a forma que interrompe a transcrição reversa. Mecanismos enzimáticos celulares poderiam também ser modulados para progressivamente reduzir a fosforilação intracelular de nucleosídeos.

A resistência viral aos anti-retrovirais pode ser classificada como primária ou secundária. Resistência primária é aquela presente mesmo antes do uso da medicação pelo paciente portador de infecção pelo HIV. Isto pode ocorrer pela transmissão de cepas resistentes ou mesmo pela geração espontânea de mutantes resistentes em um indivíduo, decorrente do alto índice replicativo do HIV-1. Portanto, a resistência do HIV-1 às drogas anti-retrovirais pode ser transmitida de um adulto para outro (HECHT *et al.*, 1998; YERLY *et al.*, 1999; HIRSCH *et al.*, 2000) e de mães para seus filhos através da transmissão vertical (SIEGRIST *et al.*, 1994; FRENKEL *et al.*, 1995; COLGROVE *et al.*, 1998; JOHNSON *et al.*, 2001). É importante ressaltar que a presença de resistência primária está provavelmente mais relacionada à transmissão do que à geração espontânea de cepas de HIV-1 resistentes. Já a resistência secundária é aquela que emerge em decorrência de um mecanismo de seleção natural, ou seja, a pressão seletiva do ambiente onde o vírus vive. Na presença de anti-retrovirais, as cepas virais mais adaptadas a este ambiente vão ser selecionadas e prevalecerão (“fitness viral”).

A determinação da prevalência da resistência primária em diferentes localidades do mundo é de extrema importância no monitoramento da epidemiologia molecular do HIV-1, podendo teoricamente orientar a terapêutica empírica inicial dos pacientes de acordo com a área geográfica. No Brasil, um estudo conduzido pelo Ministério da Saúde avaliando 535 pacientes portadores crônicos de infecção pelo HIV-1 e provenientes dos Centros de Testagem e Aconselhamento de todo o país, revelou que a resistência primária não ultrapassou 6%, sendo 2,2% para os IPs, 2,4% para os ITRN e 2,1% para os ITRNN (BRINDEIRO *et al.*, 2003). Outro estudo conduzido avaliando 100 pacientes com infecção recente pelo HIV-1 da cidade de Santos revelou uma prevalência de 22% de resistência aos ITRN, 15% de resistência aos ITRNN e 13% de resistência aos IP, com um índice de resistência cumulativa de 36% (SUCUPIRA *et al.*, 2004). Outros estudos em adultos não tratados com ARVs, demonstraram que a prevalência de mutações primárias variou de 0-2% no País (DUMANS *et al.*, 2002; SOARES *et al.*, 2003; PIRES *et al.*, 2004; BRINDEIRO *et al.*, 1999).

Com relação à resistência primária a tendência seria de se esperar que a prevalência destas aumentassem ao longo do tempo, devido ao acúmulo de tempo em uso de anti-retrovirais. Contudo, em alguns países isso não vem sendo observado, estudos americanos longitudinais em pacientes com infecção primária demonstraram que após um aumento crescente da prevalência de resistência primária entre 1996 e 2000 (LITTLE *et al.*, 2002a e 2002b) houve uma redução de 12,4% para 6,7% no período de 2000 a 2002, o mesmo ocorrendo em uma coorte na Suíça, onde a resistência genotípica foi de 8,6% em 1996, 14,6% em 1997, 8,8% em 1988 e 5,0% em 1999 (YERLY *et al.*, 2001). Na realidade estas análises são de difícil interpretação, pois há uma dificuldade em analisar os fatores de risco para aquisição do HIV. Sabe-se que a prevalência de resistência primária é menor entre os que adquirem o vírus pela via heterossexual, seguido dos homossexuais masculinos, sendo sua prevalência significativamente maior entre os usuários de drogas injetáveis. Um dos fatores que podem justificar a queda da taxa da resistência primária talvez seja o nº crescente de pessoas infectadas pelo vírus dos subtipos não-B, originários de países africanos, onde o uso de ARVs é bastante restrito. Outro fato que pode explicar é o uso de esquemas de ARVs mais potentes, capazes de manter a viremia bastante reduzida nestes pacientes, os quais terão uma chance menor de transmissão do HIV.

Outro fenômeno que vêm sendo observado é o fato da prevalência de resistência primária ser maior em indivíduos com infecção recente, quando

comparadas com indivíduos infectados há mais tempo. Uma das explicações plausíveis para este fenômeno se deve ao fato de que pessoas que não tenham infecção recente teriam sido infectadas em uma época em que a pressão dos ARVs era muito restrita, e dessa forma, a transmissão de vírus resistente teria sido menos provável. Até recentemente, a tendência era de se acreditar que a menor prevalência de vírus resistentes em amostras de pessoas infectadas há longos períodos ocorria devido a reversão das mutações na ausência da pressão seletiva de ARVs. Atualmente, não é o que parece acontecer, inúmeros estudos apontam que as mutações de resistência primária persistem por longos períodos de tempo, mesmo na ausência de tratamento (DELAUGERRE *et al.*, 2004, BARBOUR *et al.*, 2004; WAINBERG *et al.*, 2002; LITTLE *et al.*, 2004; BRENNER *et al.*, 2004). A explicação para isso reside no fato de que no momento que uma pessoa se infecta, ela se infecta com uma população viral muito homogênea, e não por uma mistura de cepas virais, em um fenômeno conhecido como transmissão seletiva. Desta forma, não haveria uma população de vírus pré-existentes que pudesse emergir. Mesmo com o aparecimento diário e ao acaso de cepas sensíveis no paciente com resistência primária, estas cepas não se fixariam pela grande quantidade de cepas mutantes produzidas diariamente nesta pessoa (SIMON *et al.*, 2003).

### **1.10. Mecanismos de Resistência aos Anti-retrovirais**

A **resistência viral** às drogas anti-retrovirais é produto da alta taxa de replicação e de mutação característica do HIV, combinada a sua capacidade de integração ao genoma da célula hospedeira e latência. A rápida replicação do HIV, gerando  $10^9$  a  $10^{10}$  vírions por dia, associada a uma taxa de mutação de aproximadamente  $3 \times 10^{-4}$  /nucleotídeos por ciclo de replicação, leva à produção de diversas variantes de HIV em um único paciente infectado durante o curso da infecção (PERELSON *et al.*, 1996). Estas mutações podem ocorrer em qualquer posição do genoma viral, inclusive nas regiões alvo dos anti-retrovirais, podendo, assim, levar ao surgimento de variantes com mutações de resistência, as quais poderão ser selecionadas em presença das drogas anti-retrovirais. A transcriptase reversa do HIV, codificada pelo gene *Pol* (polimerase), não tem capacidade "proofreading" (entendida como capacidade de analisar as novas seqüências resultantes da replicação viral e editar as que não são fiéis às seqüências originais), permitindo desta forma que ocorram regularmente mutações espontâneas (HAVLIR and RICHMAN, 1996). Esta taxa de mutação elevada permite o acúmulo de um complexo de variantes, chamadas



de “*quasispecies*”, geneticamente relacionadas entre si, mas distinguíveis através de uma ou mais mutações pontuais. (WAIN-HOBSON, 1989; SAAG *et al.*, 1988), Estas “*quasispecies*”, podem existir tanto em indivíduos distintos quanto em um mesmo indivíduo infectado (SAKAI *et al.*, 1988).

Na presença de alterações ambientais criadas pela terapêutica, só a variante com maior capacidade de replicação nessas condições (“fitness viral”) tornar-se-á dominante. A mudança dos fármacos resulta numa mudança da estirpe dominante; mesmo uma população viral extremamente minoritária sob condições normais pode tornar-se dominante sob a pressão seletiva de uma dada terapêutica anti-retroviral (CONDRA and EMINI, 1997).

Como resultado do surgimento relativamente rápido de resistência a todas as drogas anti-HIV conhecidas, o tratamento medicamentoso bem-sucedido depende do desenvolvimento de drogas anti-retrovirais que possam ser usadas em combinação. O tratamento eficaz da infecção é importante, pois atua reduzindo as chances de uma variante do vírus acumular todas as mutações necessárias para resistir ao esquema na sua totalidade. Os tratamentos atuais seguem essa estratégia e usam combinações de inibidores da protease juntamente com análogos de nucleosídeos e não análogos.

As mutações genéticas do HIV podem ser classificadas como primárias, secundárias, ou polimorfismos naturais. As primárias alteram a ligação de uma droga ao seu alvo específico, resultando em um aumento constante da concentração de droga necessária para inibir a enzima-alvo (protease ou transcriptase reversa). As mutações secundárias são incapazes, na ausência de mutações primárias, de conferir resistência farmacológica, mas quando aquelas ocorrem, contribuem para reconstituir a capacidade replicativa do vírus, afetada pela alteração genômica primária. Raramente um vírus será viável com uma única mutação principal, necessitando um grupo de mutações para que possa re-equilibrar o seu “fitness viral” e replicar (CONDRA *et al.*, 2000).

Finalmente, os polimorfismos naturais, consistem em variantes genéticas com capacidade de replicação semelhantes à variante do tipo selvagem (logo, sem expressão fenotípica), ocorrendo com freqüência em doentes não submetidos a qualquer terapêutica (WILSON and BEAN, 2000).

### **-Mecanismo de Resistência aos Inibidores da Transcriptase reversa**

Os inibidores análogos de nucleosídeos aprovados (ITRN) para uso em pediatria são: Zidovudina (AZT), Didanosina (DDI), Lamivudina (3TC), Estavudina (D4T) e Abacavir (ABC). Os ITRN são drogas estruturalmente muito semelhantes aos nucleosídeos verdadeiros: adenosina (A), guanosina (G), citosina (C) e timidina (T). Os nucleosídeos formam a base do conteúdo genético que vai codificar os aminoácidos, os quais são por sua vez a base da formação das estruturas protéicas. Durante o processo da transcrição reversa, os ITRN vão substituir competitivamente os nucleosídeos verdadeiros. Os anti-retrovirais AZT e D4T são análogos à timidina, o 3TC e o DDC análogos à citosina, DDI análogo à adenosina e o Abacavir é análogo à guanosina. Desta forma, durante a polimerização do RNA viral, a transcriptase reversa pode ao invés de um nucleosídeo verdadeiro incorporar um falso nucleosídeo no final da cadeia (AZT no lugar da timidina, por exemplo) e interrompendo desta forma o ciclo replicativo do HIV. Os ITRN necessitam ser trifosforilados, ou seja, necessitam incorporar três moléculas de fósforos, para estar ativados (FURMAN *et al.*, 1986). Recentemente surgiu a nova classe denominada ITR análoga aos nucleotídeos que tem como representante o Tenofovir. A diferença entre os análogos de nucleotídeos e os análogos de nucleosídeos consiste no fato de que os primeiros já vêm pré-fosforilados, necessitando de uma etapa a menos de fosforilação que os últimos. O Tenofovir, como o DDI é um análogo da adenosina. Os mecanismos pelos quais as mutações na TR causam resistência aos ITRN têm sido categorizados em dois grupos: (1) aquele no qual as mutações propiciam um aumento na habilidade da TR do HIV-1 em discriminar entre o ITRN e o substrato natural, levando a uma incorporação preferencial deste último e (2) mutações que aumentam a habilidade da enzima em eliminar o ITRN que se encontra ligado ao final da cadeia, impedindo o alongamento da mesma. Em outras palavras, no primeiro mecanismo, devido à presença da mutação, por exemplo, a enzima passa a incorporar preferencialmente a citosina, ao invés do 3TC. No segundo caso, o AZT que se encontraria ligado no final da cadeia de nucleotídeos impedindo a continuação da transcrição reversa, seria removido possibilitando a incorporação da timidina. Para ilustrar melhor este último cenário, na TR com mutações de resistência ao AZT, haveria uma incorporação de AZT no final da cadeia sendo polimerizada de forma quase tão eficiente quanto por uma TR sem mutações de resistência. Entretanto, as mutações de resistência aumentariam a habilidade da TR em retirar a molécula de AZT presente no final desta cadeia. Esta remoção é catalizada por uma pirofosfatase que retira o fósforo do AZT levando a excisão do mesmo. Mutações relacionadas ao AZT provavelmente aumentam a

afinidade destas pirofosfatases com a enzima mutante. Esta capacidade aumentada de excisão da enzima mutante não é específica para o AZT, o que ajuda a explicar a enorme resistência cruzada entre o AZT e outros ITRN.

As TAMs aumentam a excisão do AZT, é interessante notar que as mutações 65R, 74V, 184V diminuem a excisão do AZT provocada pelas TAMs, revertendo desta forma a resistência adquirida.

A **tabela 2** apresenta os códons do gene da transcriptase reversa, os quais quando mutados se correlacionam com resistência genotípica a esta classe de ARV. Especificamente para os ITR, uma mutação no códon principal leva a resistência completa aos ARV em questão. Por exemplo, uma mutação no códon 215 levaria a uma diminuição de susceptibilidade ao AZT em torno de 70 vezes. Se esta mutação se somar uma mutação em um códon acessório como o 41 ou 70, esta diminuição de susceptibilidade pode dobrar ou triplicar. A presença de mutações acessórias sozinhas no caso dos ITR pode levar a uma pequena diminuição de susceptibilidade e, portanto, a resistência é considerada “parcial” à droga em questão.

**Tabela 2.** Localização dos códons principais e acessórios na TR relacionados à resistência aos ITRN e nucleotídeo

INS significa inserção, DEL significa deleção

Droga	Códons Principais	Códons Acessórios
AZT	T215F/Y	E40F, M41L, D67N/E/G, K70R/G/E/N, L210W, T215C/D/S/I/E/N/V, K219Q/E/N/R
3TC	M184V/I, P157S	E44A/D, V118I
D4T	I50T, V75M/S/A/T	M41L, D67N/E/G, K70R/G/E/N, M184V/I, L210W, K219Q/E/N/R
DDI	K65R, T69A/D/S/N/G, L74V/I	M41L, D67N/E/G, K70R/G/E/N, M184V/I, L210W, K219Q/E/N/R
ABV	Y115F	K65R, L74I/V, M184I/V, T215F/Y
TDF	K65R	M41L, D67N/E/G, K70R/G/E/N, L210W, K219Q/E/N/R
MDR	Ins 69, Q151L/M*, del 67	* A62V, 75M/S/A/T, F77L, F116Y

\* Códons acessórios relacionados ao códon Q151L/M

Os inibidores não-análogos de nucleosídeos, como por exemplo o Efavirenz (EFZ) e a Nevirapina (NVP), são moléculas que entram no sítio ativo da enzima Transcriptase Reversa alterando sua conformação tridimensional e impedindo a alongação da cadeia de DNA (TANTILO *et al.*, 1994).

Em relação aos ITRNN (**Tabela 3**), considera-se que não existam códons principais ou acessórios, posto que a mutação em um único códon relacionado à

resistência leva a uma diminuição significativa da susceptibilidade à droga. Outra peculiaridade dos ITRNN é a grande quantidade de códons de resistência que são comuns às várias drogas desta classe. Desta forma, quando ocorre uma mutação em códons relacionados à diminuição de susceptibilidade aos ITRNN, normalmente perdemos esta classe de drogas por completo. Um outro fato que se observa é que as mutações relacionadas à resistência a esta classe de drogas não proporcionam uma perda significativa da capacidade replicativa do vírus.

**Tabela 3.** Localização dos códons na TR relacionados à resistência aos ITRNN

Droga	Códons
Nevirapina	A98G, L100I, K101E/P, K103N/A/S/T/Q, V106A/M, V108I, V179D/E, Y181C/I/V, Y188L/H/C, G190A/E/Q, F227L/C, M230L
Efavirenz	L100I, K101E/P, K103N/A/S/T/Q, V106A/M, Y181C/I/V, Y188L/H/C, G190A/E/Q, P225H, M230L

### **-Mecanismo de Resistência aos Inibidores de Protease**

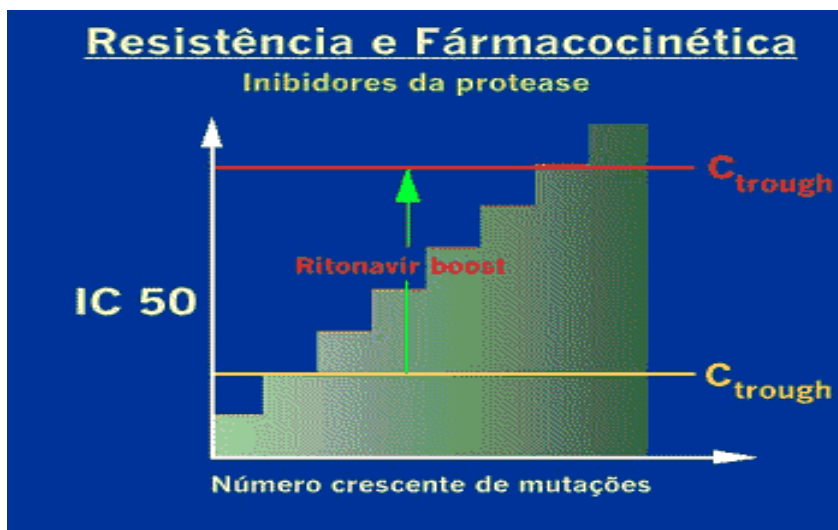
A partir do momento que as etapas do ciclo replicativo do HIV-1 foram melhor compreendidas e se obteve um modelo da conformação tridimensional da protease, foram desenvolvidas moléculas capazes de interagir e ocupar o sítio ativo da mesma, impedindo assim a sua ação. A protease apresenta-se na forma de um dímero e é responsável pela clivagem de grandes poliproteínas virais antes do encapsulamento do vírus. Os inibidores de protease foram desenvolvidas para, de forma competitiva, ocupar o sítio ativo da protease. Isto significa que aleatoriamente o sítio ativo da protease pode ser ocupado tanto pelo seu substrato natural, as poliproteínas virais a serem clivadas, quanto pelas moléculas produzidas artificialmente, os inibidores de protease. É o excesso de inibidores de protease dentro da célula, em comparação à quantidade do substrato natural do HIV, que leva a inibição da replicação do vírus. As mutações de resistência selecionadas pelos inibidores de protease levam a uma alteração na conformação tridimensional da protease, conseqüentemente temos: (1) a diminuição do tempo de ligação dos inibidores da protease à protease, e (2) a diminuição do tempo que a protease levaria para clivar seu substrato natural, o que corresponde a uma diminuição do “fitness” viral (KOHL *et al.*, 1998).

Os inibidores desta classe de drogas em uso são: Amprenavir (APV), Indinavir (IDV), Nelfinavir (NFV), Ritonavir (RTV), Saquinavir (SQV), Lopinavir/Ritonavir (LPV) e Atazanavir (ATZ).

**Tabela 4.** Localização dos códons principais e acessórios na protease relacionados à resistência aos IP

DROGA	Códons Principais	Códons Acessórios
IDV	M46I/L, V82A/F/I/S/T, I84V/A/C	L10I/R/F/V, K20M/R/T/I, L24I, V32I, E35D, M36I/L/V, G48V, I54L/T/V, Q58E, L63A/I/P/Q/V/Y/T, A71T/V, G73S/T/C/A, V77I, L89M/V, L90M, I93L
RTV	V82A/F/I/S/T, I84V/A/C	L10I/R/F/V, G16E, K20M/R/T/I, L24I, V32I, L33I/F/V, E34K, M36I/L/V, G48V, F53L, I54L/T/V, Q58E, D60N, I62V, L63A/I/P/Q/V/Y/T, A71T/V, L90M
SQV	G48V, I84V/A/C, L90M	L10I/R/F/V, T12I, K20M/R/T/I, D30N, V32I, M36I/L/V, M46I/L, I54L/T/V, R57K, Q58E, D60N, I62V, L63A/I/P/Q/V/Y/T, A71T/V, G73S/T/C/A, T74S, L76M, V82A/F/I/S/T, N88D/S
NFV	D30N, L90M	L10I/R/F/V, I13V, K20M/R/T/I, M36I/L/V, M46I/L, G48V, I54L/T/V, Q58E, D60N, I62V, L63A/I/P/Q/V/Y/T, V77I, V82A/F/I/S/T, I84V/A/C, N88D/S, I93L
APV	I50V, I84V/A/C	L10I/R/F/V, V32I, L33I/F/V, R41K, M46I/L, I47A/V, I54L/T/V, G73S/T/C/A, V82A/F/I/S/T, L90M
LPV	L10I/R/F/V, G16E, K20M/R/T/I, L24I, V32I, L33I/F/V, M36I/L/V, M46I/L, I47A/V, I50V, F53L, I54L/T/V, Q58E, L63A/I/P/Q/V/Y/T, A71T/V, G73S/T/C/A, T74S, V82A/F/I/S/T, I84V/A/C, L89M/V, L90M, T91S	
ATV	I50L, N88S, I84V/A/C	L10I/R/F/V, K20M/R/T/I, L24I, V32I, L33I/F/V, M36I/L/V, M46I/L, G48V, I54L/T/V, L63A/I/P/Q/V/Y/T, A71T/V, G73S/T/C/A, V82A/F/I/S/T, L89M/V, L90M
TIPRAN AVIR	L33I/F/V, V82T, I84V/A/C, L90M	L10I/R/F/V, I15V, K20M/R/T/I, E35D, M36I/L/V, N37D, R41K, I47A/V, I54L/T/V, D60N, A71T/V, T91S

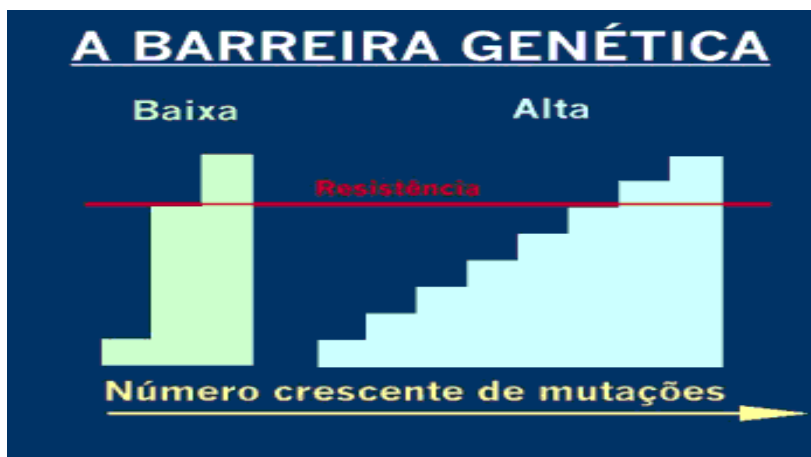
A resistência aos IPs pode ser vencida efetivamente através do aumento da disponibilidade da droga, a qual pode ser obtida pelo uso combinado de alguns IPs com Ritonavir. O RTV inibe o citocromo P-450 (CYP450), diminuindo a metabolização dos outros IP usados concomitantemente. A administração de um inibidor de protease propicia um pico sérico e um nível basal na corrente sanguínea do indivíduo tratado. Especificamente para os inibidores de protease, o pico sérico (concentração máxima ou Cmax) está relacionado aos efeitos adversos, enquanto que os níveis basais (imediatamente antes da próxima dose que é a concentração mínima ou Cmin) estão associados à potência e efetividade do efeito anti-retroviral, principalmente no contexto da presença de mutações de resistência. Os esquemas contendo inibidores de protease quando incrementados pelo Ritonavir aumentam os níveis basais destes inibidores de protease, sem alteração significativa no pico sérico da droga. Esta estratégia nos levaria a um aumento na **barreira genética para resistência aos anti-retrovirais**. A barreira genética representa a “proximidade” genética para aquisição de resistência completa aos anti-retrovirais (**Figura 10**).



**Figura 10.** A resistência pode ser ultrapassada com o aumento da potência de um regime terapêutico

Fonte: [www.aidscongress.net/print.php?sid=64](http://www.aidscongress.net/print.php?sid=64)

Uma droga que necessita de várias mutações para resistência apresenta uma grande barreira genética. A **Figura 11** ilustra o conceito de barreira genética, cada degrau representa uma mutação e a linha vermelha representa o limiar que quando ultrapassado culmina em resistência.



**Figura 11.** O conceito de barreira genética

Fonte: [www.aidscongress.net/print.php?sid=64](http://www.aidscongress.net/print.php?sid=64)

No geral, os IPs necessitam de no mínimo três mutações para uma repercussão fenotípica levando a resistência alta (KEMPF *et al.*, 2001; LARDER and KEMP, 1989; MOLLA *et al.*, 1996).

Um exemplo de uma baixa barreira genética é dado pelo alto grau (>1000 X) de resistência ao 3TC que emerge rapidamente como resultado da mudança de um único nucleotídeo no códon 184 - uma adenina por uma citosina, mudando o aminoácido resultante de uma metionina para uma valina (M184V) (GÄTTE *et al.*, 2000).

#### - Resistência aos inibidores de fusão

Os inibidores de fusão são moléculas que se ligam à região trans-membranar do complexo *gp160* do HIV-1, e a *gp41*, exercendo sua atividade anti-retroviral através do bloqueio da fusão entre vírus e célula. O inibidor de fusão aprovado para uso atualmente é a molécula conhecida como T20 ou “enfuvirtida”, sendo que outra molécula conhecida como T-1249 encontra-se ainda em fase de testes. O T-20 se liga a região da *gp41* conhecida como HR1, enquanto que o T-1249 se liga a região HR2. São moléculas grandes e complexas, o que em um primeiro momento dificultou a sua produção em larga escala e continua mantendo o seu custo extremamente elevado. As mutações selecionadas na *gp41* do HIV-1 e que estão relacionadas à diminuição de susceptibilidade ao T20 estão localizadas entre os aminoácidos 36 a 45, sendo as mais freqüentes as mutações: **G36D/S, I37V, V38A/M, Q39R, N42T e N43D**.

O outro inibidor de fusão conhecido, o T-1249, que apesar de um perfil favorável para resgate de pacientes com resistência ao T-20, está com o seu desenvolvimento suspenso no presente momento, é um polipeptídeo de 39 resíduos derivados de uma região altamente conservada da *gp41* do HIV-1, e como mencionado anteriormente, as mutações selecionadas na região HR1 pelo T20 terão mínimo ou nenhum efeito na suscetibilidade desta droga.

#### - Resistência Cruzada

Resistência cruzada é aquela selecionada por uma droga levando ao aparecimento de resistência a uma outra droga ainda não utilizada. Um dos exemplos que tem sido observado com freqüência refere-se às mutações associadas aos timidínicos (**TAM**). As TAM são 6 mutações selecionadas na TR pelo AZT e/ou D4T: M41L, D67N, K70R, L210W, T215Y/F, K219Q/E/N. Estas mutações proporcionam uma redução de suscetibilidade “*in vitro*” em grau variado a todos os ITRN com um conseqüente potencial para resistência cruzada “*in vivo*” para estas drogas (SHIRASAKA *et al.*, 1995).

Em relação aos IPs, apesar das mutações primárias serem relativamente específicas de cada droga, o acúmulo de mutações secundárias compartilhadas por várias drogas contribui para o aparecimento de episódios de resistência cruzada (CONDRA and EMINI, 1997).

Algumas alterações genéticas podem levar a resistência a múltiplas drogas (**MDR**). Estas alterações emergem na transcriptase reversa sendo uma delas é a **inserção no códon 69 (INS 69)**, a qual pode levar a introdução de um ou mais aminoácidos nesta região, este fenômeno pode ser decorrente da seleção imposta por qualquer ITRN. A outra MDR conhecida é a mutação **Q151M** que emerge sempre acompanhada de um grupo de mutações acessórias, neste caso, assim como observado para a **INS 69**, haverá resistência a todos os ITRN e TDF. Outra alteração genética relacionada à MDR é a **deleção no códon 67 ( $\Delta 67$ )** (IMAMICHI *et al.*, 2000). A  $\Delta 67$  também vem acompanhada de mutações acessórias específicas e quando existem mutações de resistência para os não-nucleosídeos, como a K103N, o impacto na perda de suscetibilidade aos não-nucleosídeos torna-se mais dramático. Este é um exemplo de resistência entre classes de ARVs, pois a resistência será aos ITRN e aos ITRNN.

Mais recentemente tem sido proposto que o acúmulo de grande número de **TAMs** pode levar a resistência a todos os ITRN, sendo considerada também como causadora de **MDR**. O mesmo tem sido definido a respeito da mutação **K65R**, selecionada pelo DDI, ABC ou TDF, a qual era considerada rara até o final da década de 90 (0,8%) tem apresentado atualmente uma prevalência aumentada devido ao aumento no uso do TDF, levando a uma resistência 2,5 a 10 vezes maior a todos os ITRN, exceção feita ao AZT (PARIKH *et al.*, 2004).

### - Hipersuscetibilidade

Outro fenômeno possível é o da hipersuscetibilidade, situação em que a(s) mutação(ões) selecionada(s) aumentaria(m) a ação de algum ou vários anti-retrovirais sobre os vírus que portassem esta(s) mutação(ões), por exemplo: a presença da mutação M184V selecionada pelo 3TC promove a um aumento da ação do AZT e TDF sobre o vírus que a possui (TISDALE *et al.*, 1993; MILLER *et al.*, 1998). Análises “*in vitro*” demonstram que o vírus que possui a mutação T215Y/F (mutação da ZDV) associada a mutação M184V/I (3TC) apresenta a mesma sensibilidade do vírus do tipo selvagem à associação ZDV/3TC. Para que haja resistência ao ZDV/3TC seriam necessárias, além das mutações nos códons 215 e 184 a mutação em um terceiro



códon que incluiria o 208 ou 210 ou 211 ou 214. Alguns algoritmos de interpretação ou alguns laudos de genotipagem relatam sensibilidade a ZDV quando existem mutações nos códons 215 e 184, pela premissa da hipersensibilização que a mutação no códon 184 leva em relação ao ZDV. Porém, deve-se tomar muito cuidado nesta interpretação, pois o uso da ZDV sem o 3TC leva ao desaparecimento rápido da mutação do códon 184 e conseqüentemente leva a falha do AZT. Deve-se, neste contexto, sempre se utilizar a associação ZDV/3TC para que se colha o benefício da hipersensibilização. A mutação no códon 184 também hipersensibiliza ao Tenofovir, sendo capaz de reverter totalmente a resistência a esta droga proporcionada por algumas mutações, como a mutação K65R e Q151M, e parcialmente a resistência proporcionada pelas TAMs. Um estudo recente avaliou o efeito da mutação M184V na remissão da resistência proporcionada pelo acúmulo de TAMs (WHITCOMB *et al.*, 2002), como comentado anteriormente, o acúmulo das TAMs leva à MDR, e um estudo “*in vitro*” avaliou o efeito do número de TAMs em cada um dos ITRN em relação à presença ou ausência da mutação M184V. Percebe-se que o efeito de M184V é bem evidente na recuperação da susceptibilidade ao AZT a despeito do número de TAMs. O mesmo ocorre com relação ao Tenofovir, sendo que a completa ressensibilização ao tenofovir ocorre se o número de TAMs for inferior a três. Não existe um claro efeito benéfico desta mutação com relação ao D4T, no geral a mutação M184V leva a uma piora na resistência ao DDI. Este estudo também demonstrou claramente que a associação da mutação M184V às TAMs é deletéria ao ABC. A adição “*in vitro*” da mutação K65R à vírus construídos com a presença de 4 TAMs leva a uma diminuição da resistência ao AZT podendo variar de 10 a 37 vezes (PARIKH *et al.*, 2004). Da mesma forma, a adição de TAMs à vírus que possuam a mutação K65R leva a uma remissão da resistência aos ITRN produzida pela K65R (PARIKH *et al.*, 2004). Estas observações nos levam a concluir que a associação do AZT com anti-retrovirais que selecionem a K65R podem prevenir a emergência das mesmas. Outra mutação capaz de atenuar o efeito deletério das TAMs ao AZT é a L74V (DDI) a qual é associada a uma diminuição de cerca de 8 vezes na resistência proporcionada por 4 TAMs ao AZT. (BAZMI *et al.*, 2000).

Na protease encontramos alguns exemplos de hipersuscetibilidade também. Um deles está relacionado à mutação N88S selecionada pelo saquinavir ou atazanavir e que leva a hipersuscetibilidade ao APV. Vírus com a mutação I50L selecionada pelo ATZ apresentam uma sensibilidade mantida ou uma hipersuscetibilidade a todos os

outros inibidores de protease (COLONNO *et al.*, 2003). A mutação I50V é a principal mutação do APV, que coincidentemente leva a hipersuscetibilidade ao ATZ.

Para o Tipranavir, onde os vírus com as mutações G48V e V82A levariam a hipersuscetibilidade à esta droga (LARDER *et al.*, 2000), não se sabe ainda se caso estas mutações desaparecessem na ausência da pressão seletiva do ARV que a selucionou, o fenômeno de hipersuscetibilidade seria mantido ou revertido.

### -“Vias mutacionais” para seleção de resistência

A partir da pressão seletiva exercida por uma droga, o vírus pode desenvolver algumas mutações específicas, seguindo o que chamamos de “vias mutacionais” distintas. Estas vias têm relevância no sentido que algumas delas implicam em resistência cruzadas e outras não. Como exemplo, temos a seleção dos códons D30N ou L90M pelo **Nelfinavir**, cada um deles acompanhado de mutações acessórias específicas, que emergem tanto “*in vitro*” quanto “*in vivo*”. É interessante notar neste caso que quando emerge a mutação do códon 30, é possível o resgate com um inibidor de protease subsequente, posto que esta mutação é praticamente exclusiva e seu aparecimento oferece pouca possibilidade de resistência cruzada. Por outro lado, quando a mutação do códon 90 é selecionada, o resgate é bem mais difícil, já que este é um códon de resistência comum a todos os inibidores de protease. É interessante notar que quando o vírus submetido à pressão seletiva do NFV não é do subtipo B, a via mutacional seguida é quase exclusivamente a do códon 90, sugerindo que a escolha da via mutacional pode estar relacionada à estrutura genética da cepa viral sobre pressão seletiva. No Brasil, temos cerca de 50% de vírus do subtipo C na região extremo sul e 20% de vírus do subtipo F em São Paulo e Rio de Janeiro. Nossa avaliação de pacientes brasileiros infectados por vírus do subtipo B em uso de NFV como único inibidor de protease, mostra que cerca de 50% dos pacientes desenvolvem mutações pela via do códon 90 quando o tratamento falha, e a outra metade pelo códon 30, sendo que alguns estudos com pacientes norte americanos mostram que a via do códon 30 é a mais freqüente naquele país (CLOTET *et al.*, 2002).

Outro exemplo ocorre com o **AZT**, onde uma das vias leva em um momento inicial à seleção dos códons M41L, L210W e T215Y e outra aos códons D67N, K70R K219Q/E/M. Aparentemente, a probabilidade de se selecionar qualquer uma destas vias é a mesma. A via mutacional envolvendo os códons 41, 210 e 215 leva a um maior nível de resistência ao AZT ou d4T e à resistência cruzada ao Tenofovir. No caso das TAMs, após o momento inicial onde uma das vias prevalece, vai haver um

acúmulo progressivo de mutações, sendo que alguns pacientes muito experimentados podem ter 5 ou até mesmo 6 TAMs.

Para o **Atazanavir**, estudos “*in vitro*” indicam que é possível que exista também inúmeras vias mutacionais distintas: uma das mutações típicas selecionadas pelo HIV-1 na presença do ATV é a mutação I50L. A mutação I50L é considerada típica e exclusiva do ATZ. Outra mutação que aparece com frequência precocemente com ou sem a presença I50L é a mutação N88S. A mutação N88S também diminui a susceptibilidade do vírus ao SQV e NFV e tem a peculiaridade já conhecida de hipersensibilizar o vírus ao APV. Outra mutação que aparece precocemente é a mutação I84V, a qual é uma mutação considerada principal para o IDV e RTV. Temos, portanto três vias mutacionais (códon 50, 88 ou 84), cada uma delas também acompanhada de mutações secundárias específicas (GONG *et al.*, 2000).

### 1.11. Testes para Resistência às Drogas

A resistência aos anti-retrovirais pode ser determinada tanto “*in vitro*” quanto “*in vivo*”. Objetivando identificar mutações que confirmam resistência aos ARVs, estudos “*in vitro*” normalmente são os primeiros a serem realizados. Para tal cultiva-se o vírus do tipo selvagem na presença de quantidades sub-inibitórias da droga em questão (concentrações reduzidas de droga que levam a uma supressão parcial da replicação viral). Monitora-se a cultura com a ajuda da dosagem de antígeno p24 para a quantificação do número de partículas virais liberadas. Realiza-se então um grande número de passagens sucessivas, em outras palavras, utiliza-se o sobrenadante da cultura que contém os vírus que estão emergindo das células para serem transferidos para novas culturas celulares. Após um determinado número de passagens (10 a 15), caso a concentração de antígeno p24 tenha aumentado consideravelmente no sobrenadante de cultura, pode-se concluir que o vírus adquiriu resistência ao anti-retroviral que está sendo testado. Neste momento, procede-se o seqüenciamento do genoma do HIV que se tornou resistente e identificam-se a(s) mutação(ões) presentes. Para a confirmação da importância destas mutações, lança-se mão da mutagênese reversa, uma metodologia laboratorial que se reverte(m) a(s) mutação(ões) que surgiram e é verificado se após esta reversão houve uma re-sensibilização do vírus à droga testada.

Os testes para determinação de resistência “*in vivo*” observam a emergência de mutações relacionadas à falha virológica em pacientes virgens de tratamento ou

que já utilizaram anti-retrovirais nos quais já foram registradas falhas no tratamento. Após o aumento da carga viral nestes pacientes, avaliam-se as mutações que surgiram e o recurso da mutagênese reversa para confirmação do impacto fenotípico das mutações que surgiram é utilizado para confirmá-las.

Outra forma de determinar e classificar as mutações de resistência utiliza a testagem fenotípica de painéis com vírus multi-resistentes coletados “in vivo” a partir de pacientes com falha virológica conhecida. Nestes casos, porém, detecta-se a resistência cruzada, posto que as mutações não foram selecionadas pela droga que está sendo testada. A partir do momento que se detecta(m) mutação(ões) relacionada(s) a diminuição da susceptibilidade à droga testada, pode-se utilizar, também, a mutagênese reversa para confirmação do seu efeito.

A complexidade dos modelos terapêuticos anti-HIV e o crescente número de indivíduos portadores de vírus resistentes tornaram os testes de determinação de resistência de HIV essenciais para a manutenção de uma terapêutica eficaz e de longo curso no tratamento dos pacientes. Diversos estudos, conduzidos com pacientes em tratamento experimental têm demonstrado fortes associações entre a presença de resistência à droga e falha no tratamento anti-retroviral em suprimir a replicação viral. Dentre os métodos empregados rotineiramente para este fim, destacam-se dois, a genotipagem do HIV e fenotipagem do HIV.

O objetivo dos testes de fenotipagem é determinar a capacidade de uma determinada população viral replicar-se em culturas de células contendo diferentes concentrações de drogas anti-retrovirais. A realização destes testes é bastante complexa e envolve a utilização de tecnologias avançadas de clonagem e construções genéticas. A idéia deste método é simular o comportamento dos vírus presentes no organismo de um dado paciente, em culturas de células contendo concentrações crescentes das drogas anti-retrovirais, estimando-se, assim, a capacidade de cada droga em inibir a replicação do HIV.

Os testes de genotipagem, por sua vez, buscam determinar a resistência às drogas, por meio da determinação das alterações genéticas ocorridas no genoma viral, as quais podem modificar substancialmente a estrutura conformacional de suas proteínas, bloqueando ou diminuindo a eficiência com que as drogas anti-retrovirais ligam-se às mesmas. Neste método, a determinação da resistência se dá de forma indireta e depende de uma análise precisa dos padrões de mutação para determinar-se a resistência a dada droga. Em resumo, testes genotípicos baseiam-se na amplificação de seqüências do gene *pol* (transcriptase reversa e protease) sendo os produtos

amplificados analisados por hibridização ou por seqüenciamento, com o objetivo de detectar as mutações que conferem resistência (HIRSCH *et al.*, 2000).

Uma alternativa importante e promissora foi recentemente proposta e desenvolvida, designada "fenotipagem virtual" consiste na comparação das seqüências obtidas num teste genotípico com a informação contida numa grande base de dados, que inclui determinações de genótipos e fenótipos obtidos em paralelo de alguns milhares de amostras. Assim, o modelo computacional seleciona as seqüências mais próximas da amostra em estudo e o fenótipo correspondente. Isto é especialmente útil quando se tem resistência ampla e deve se escolher a "melhor" droga entre as que apresentam diminuição de susceptibilidade.

A evidência a favor da utilidade clínica dos testes de resistência veio de estudos retrospectivos e prospectivos. O estudo americano GART (Genotypic Anti-retroviral Resistance Testing), constituiu um estudo randomizado, incluindo 153 doentes com um insucesso terapêutico prévio num regime que incluía IP, uma parte recebeu a conduta clínica empírica e a outra baseada nos resultados de genotipagem, além da avaliação do especialista clínico (BAXTER *et al.*, 2000). Os pacientes conduzidos com auxílio da genotipagem tiveram uma redução na carga viral significativamente maior do que os conduzidos sem genotipagem (-1,17 versus 0,62  $\log_{10}$  cópias/ml com  $p=0,0001$ ).

O estudo francês VIRADAPT dividiu aleatoriamente 108 pacientes com falha terapêutica aos ARV para modificar o tratamento de acordo com critérios clínicos ou baseados em testes de genotipagem (DURANT *et al.*, 1999). Após 6 meses, uma proporção significativamente maior de pacientes orientados pela genotipagem apresentou carga viral indetectável quando comparados aos pacientes orientados somente pelas diretrizes clínicas.

### **1.12. Testes de Resistência e subtipos genéticos do HIV-1**

O HIV, de acordo com sua variabilidade genética, pode ser dividido em grupos, tipos, subtipos, sub-subtipos e formas recombinantes ("Circulating Recombinant Forms" - CRFs). O HIV é subdividido em dois tipos: HIV do tipo 1 e 2. Os três grupos distintos do HIV-1 são: M (major, majoritário), O (fora do grupo, outlier) e mais recentemente, N (new, non-M, non-O: novo – não-M, não-O) (MYERS *et al.*, 1997; SIMON *et al.*, 1998). Enquanto as amostras dos grupos O e N são de distribuição limitada ao continente africano (PEETERS *et al.*, 1997), com casos

isolados do grupo O na Europa e Estados Unidos (LOUSSERT-ÁJAKA *et al.*, 1998; RAYFIELD, 1996), as variantes do grupo M são as responsáveis pela pandemia da AIDS em todo o mundo. Existem atualmente nove subtipos de HIV-1 descritos no grupo M, denominados: A, B, C, D, F, G, H, J e K (VIDAL *et al.*, 2000). Os subtipos E e I são considerados “genomas mosaico”, que são a recombinação entre seqüências de diferentes subtipos genéticos com base em análises do genoma completo de alguns isolados (GAO *et al.*, 1998).

O subtipo B predomina nos Estados Unidos e Europa Ocidental, assim como na América do Sul, Austrália e Ásia, apesar de relatos de subtipos não-B (BRODINE *et al.*, 1995; IRWIN *et al.*, 1997).

O Brasil, maior país da América do Sul, é também o mais afetado pela epidemia. Alguns estudos têm sido realizados no País para avaliar a diversidade do HIV-1, demonstrando a predominância do subtipo B, embora outros subtipos como A, C, D, F e recombinantes B/F e B/C tenham sido documentados (GADELHA *et al.*, 2003; CARIDE *et al.*, 2000; Brazilian Network for HIV Isolation and Characterization, 2000; COUTO-FERNANDEZ *et al.*, 1999; MORGADO *et al.*, 1998; CORNELISSEN *et al.*, 1996; LOUWAGIE *et al.*, 1994; SABINO *et al.*, 1994; BARRETO, *et al.*, 2006). Estudos recentes, entretanto, tem apontado para uma grande proporção de subtipo C no sul do estado do Brasil, bem como uma taxa aumentando deste subtipo no Rio de Janeiro e São Paulo (BRINDEIRO *et al.*, 2003; SOARES *et al.*, 2003). Além disso, alguns estudos deste grupo e outros têm mostrado que diferentes subtipos de HIV-1 podem ter diferentes respostas à terapia ARV ou resistência a drogas baseada em seus polimorfismos genéticos (DESCAMPS *et al.*, 1997; GONZALEZ *et al.*, 2003; DUMANS *et al.*, 2004; SULLIVAN *et al.*, 2001).

Os testes laboratoriais que utilizam análise de ácidos nucléicos, como é o caso dos testes de genotipagem, são otimizados para os vírus do subtipo B. Desta forma, o desempenho dos testes comerciais aqui no Brasil eventualmente fica um pouco prejudicado, propiciando uma freqüência de resultados falso negativos, pela ausência de amplificação na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).



## 2. OBJETIVOS

Esse estudo foi realizado com o objetivo de se avaliar a prevalência e o nível de resistência genotípica do HIV-1 às drogas anti-retrovirais em pacientes pediátricos infectados pelo HIV em terapia com anti-retrovirais e compará-los à pacientes pediátricos que não utilizam as drogas anti-retrovirais. A presença de mutações no genoma viral foi avaliada, através de genotipagem por seqüenciamento de ácidos nucléicos do HIV. Dados da genotipagem foram correlacionados com a classificação clínico-imunológica, com a carga viral, contagem de linfócitos T CD4+ e com o regime de anti-retroviral em uso nas crianças em tratamento.

### 2.1. Objetivo geral

- Identificar a prevalência de mutações no genoma viral através da genotipagem de crianças infectadas pelo HIV tratadas e não-tratadas com anti-retrovirais, atendidas no Setor de Infectologia/AIDS Pediátrico do Centro de Referência do Hospital Infantil Nossa Senhora da Glória – Vitória / ES, através do exame de Genotipagem pelo sistema ViroSeq HIV-1.

### 2.2. Objetivos específicos

- Identificar a prevalência das mutações no genoma do HIV-1 de crianças infectadas pelo HIV atendidas no Setor de Setor de Infectologia/AIDS



Pediátrico do Centro de Referência do Hospital Infantil Nossa Senhora da Glória – Vitória / ES, através do exame de Genotipagem pelo sistema ViroSeq HIV-1.

- Verificar a frequência de mutações de resistência comparando com o esquema anti-retroviral (ITRN, ITRNN e IP) em uso atual no momento da realização do teste de Genotipagem e os usados anteriormente.
  
- Identificar os subtipos do HIV-1 prevalentes nesta população estudada.

## 3. MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1 – População estudada

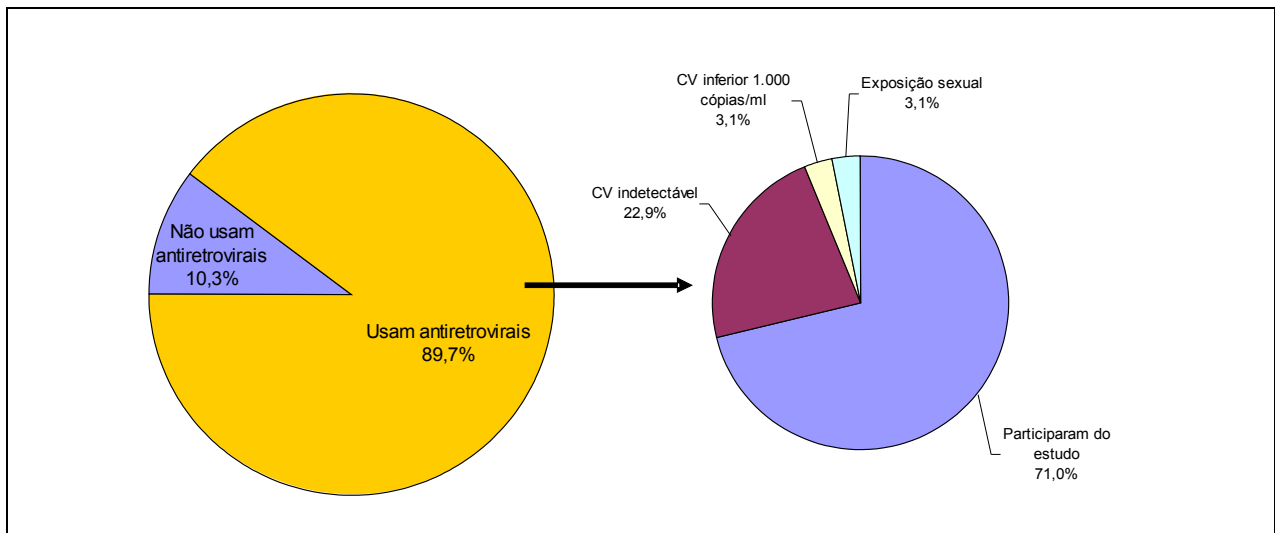
Foram estudados amostras de sangue de 44 crianças com diagnóstico positivo de infecção pelo HIV-1 em tratamento ou não com drogas anti-retrovirais, atendidas no Setor de Infectologia/AIDS Pediátrico do Centro de Referência do Hospital Infantil Nossa Senhora da Glória – Vitória / ES (Unidade Hospitalar do Sistema Único de Saúde, referência em Pediatria e especialidades pediátricas para todo Espírito Santo, atendendo também a pacientes do Sul da Bahia e Leste de Minas Gerais e concentrando a maioria dos casos de AIDS pediátrica do Estado, desde 1989).

O Setor de Infectologia/AIDS do Centro de Referência do Hospital Infantil Nossa Senhora da Glória – Vitória / ES possui 146 crianças com diagnóstico definido de infecção pelo HIV-1 fazendo acompanhamento regular. Dentre estas somente 15 (10,3%) crianças não faziam uso de anti-retrovirais no momento da realização da genotipagem. A indicação de tratamento com anti-retrovirais seguiu os critérios recomendados no Guia de Tratamento Clínico da infecção pelo HIV em crianças do Ministério de Saúde, 2004.

Todas as 15 crianças que não faziam uso de anti-retrovirais foram convidadas a participar do estudo em caráter voluntário, 14 concordaram em participar e foram submetidas ao exame de genotipagem, sendo que para apenas uma das 14 crianças não foi possível obter um seqüenciamento completo da região do gene *pol* (Transcriptase Reversa e Protease) e, portanto a amostra desta criança não pode ser avaliada. Pacientes desta população não-tratada serão denominamos de pacientes do **Grupo A**.

Os critérios de inclusão neste estudo para todas as crianças foram: idade menor de 18 anos; forma de contágio por transmissão vertical e para aquelas tratadas com anti-retrovirais foram: carga viral acima de 1.000 cópias; uso de terapia anti-retroviral atual por pelo menos 5 meses.

Das 131 crianças em tratamento, foram excluídas do estudo: a) 30 crianças que possuíam carga viral indetectável, b) 4 crianças que possuíam carga viral inferior a 1.000 cópias/ml e c) 4 crianças com categoria de exposição sexual (vítimas de abuso sexual). Da população remanescente de 93 crianças, as quais atendiam aos critérios de inclusão, todas estavam em uso de anti-retrovirais há pelo menos 5 meses, 35 crianças na data em que faziam a coleta rotineira de amostras para realização da contagem de linfócitos T CD4 e da quantificação da carga viral foram convidadas a participar do estudo. Portanto, a amostra obtida desta população foi uma amostra de conveniência. Entretanto, em apenas 31 das 35 amostras selecionadas o seqüenciamento completo da região do gene *pol* (Transcriptase reversa e Protease) foi obtido e puderam ser analisadas. Aos pacientes desta população denominaremos de pacientes do **Grupo B**.



**Figura 12:** Esquema representativo da população estudada em 2005, Setor de Infectologia/Aids HINSG-Viória/ES.

Após a explicação detalhada do Projeto e antes da coleta das amostras, o responsável legal assinava o Termo de Consentimento Informado (Anexo D), aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Hospital Infantil Nossa Senhora

da Glória, Vitória-ES e pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo.

As seguintes informações foram transcritas em protocolo específico (ANEXO A): idade, sexo, procedência, ano de diagnóstico, classificação da AIDS em categorias clínico-imunológicas, categoria de exposição da mãe e uso de quimioprofilaxia e determinação da carga viral (Cópias/ml e Log), contagem de linfócitos T CD4 (número absoluto e percentual), mutações nos códons da transcriptase reversa e protease presentes, terapias anti-retroviral anterior(es) e atual.

Os critérios utilizados para o diagnóstico e classificação do grau de imunossupressão da AIDS foram aqueles descrito nos *Critérios de definição de casos de AIDS em adultos e crianças*, do Ministério da Saúde, ANEXO B, no qual os principais parâmetros utilizados são as categorias clínicas, a evidência de imunodeficiência e a evidência laboratorial de infecção pelo HIV.

Em crianças com idade abaixo dos 18 meses, foi utilizado o resultado do exame de carga viral como evidência laboratorial de infecção pelo HIV, em nosso estudo a carga viral foi aferida pela técnica RNA - PCR Amplicor® (Roche), sendo que para serem consideradas como positivas para a infecção pelo HIV, estas crianças deveriam apresentar valores de carga viral acima de 400 cópias por ml, em pelo menos duas coletas, sendo que valores até 10.000 cópias/ml eram sugestivos de resultados falso-positivos, devendo ser analisados cuidadosamente dentro do contexto clínico e repetidos em um intervalo de 4 semanas. Após os 18 meses, o diagnóstico da infecção utilizados neste estudo foi semelhante ao do diagnóstico em adultos, ou seja, resultado positivo em duas amostras testadas com sorologia Anti-HIV 1 e 2 (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*, ELISA) e Imunofluorescência Indireta (IFI) / Western Blot.

Conforme os resultados de contagem de Linfócitos T CD4, a imunodepressão é classificada da seguinte forma:

Categoria 1 - ausente

Categoria 2 - moderada

Categoria 3 - grave.

Os parâmetros clínicos correspondem aos sinais e sintomas leves, moderados e graves (Anexo C) e classificam os casos em:

Categoria N – criança assintomática,

Categoria A – infecção levemente sintomática,

Categoria B – infecção moderadamente sintomática,

Categoria C – infecção gravemente sintomática.

### **3.2 – Coleta de Sangue**

Foram coletadas amostras de sangue periférico de cada paciente (10 ml) em tubos contendo EDTA K<sub>3</sub>. Essas amostras foram coletadas no Laboratório do Hospital Infantil Nossa Senhora da Glória – Vitória / ES e encaminhadas ao Laboratório de Biologia Molecular do Núcleo de Doenças Infecciosas, Centro Ciências de Saúde, da Universidade Federal do Espírito Santo, onde o exame foi realizado. As amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 1.500 rpm para separação do plasma e da camada leucocitária, e em seguida, foram distribuídos alíquotas em tubos de 1,5 ml e armazenadas à -70°C.

### **3.3 – Teste de Genotipagem**

#### **3.3.1 – Purificação do RNA ou DNA do HIV-1**

O RNA do HIV-1 presente na amostra é extraído utilizando-se tampão de lise com quantidade predeterminada do controle interno de quantificação (QS). São utilizados também ciclos de lavagem e centrifugação com isopropanol e etanol. O QS consiste em cadeia de RNA sintética que possui os mesmos sítios-alvo de ligação dos primers que o RNA do HIV-1, além do mesmo comprimento e composição de bases, exceto pela seqüência de ligação da sonda de captura.

#### **3.3.2 - Transcrição Reversa –RT**

Transcrição reversa é o processo pelo qual a enzima Transcriptase Reversa sintetiza moléculas de cDNA a partir de fitas-molde de RNA. *In vivo*, este processo é observado nos retrovírus, os quais possuem RNA como material genético, mas necessitam sintetizar DNA dupla fita para integrar seu genoma ao genoma da célula infectada e permitindo assim sua replicação no interior da mesma. Para que a reação de transcrição ocorra, além da fita molde de RNA e da enzima propriamente dita, é preciso adicionar à reação um iniciador (“primer”), *in vivo*, o HIV utiliza um tRNA lys (RNA transportador de lisina) celular como iniciador para a reação, já *in vitro*, esta molécula é substituída por uma pequena seqüência de DNA fita-simples

(oligonucleotídeo ou “primer”). Além do primer e da enzima, é preciso acrescentar dNTPs (deoxinucleotídeos) e cofatores (magnésio).

Em todos os processos de manipulação de ácidos nucleicos o risco de contaminação cruzada (contaminação de uma amostra para outra) é muito alto. Por este motivo, as reações de Transcrição Reversa e PCR devem conter algum tipo de mecanismo de controle de contaminação. No caso do sistema ViroSeq, aqui descrito, utiliza-se a enzima AmpErase (UNG/UTP), a qual previne contaminação degradando ácidos nucleicos que possuam UTP (uracil trifosfato) na sua constituição nucleotídica. Sendo assim, durante a PCR, dUTPs que estão contidos no MIX da reação são incorporados às fitas de DNA recém sintetizadas. A enzima AmpErase (UNG) é ativada na primeira etapa da PCR afim de eliminar contaminantes (amplicons contendo UTP) que porventura possam ter sido carregados acidentalmente para a reação. Em relação à reação de Transcrição Reversa, deve-se ter um cuidado especial com a degradação do RNA viral por RNAses contaminantes. Para isso, o mix de reação de RT contém inibidores de RNase. Por fim, adiciona-se DTT ao mix de RT, o qual atua como estabilizante mantendo o pH (potencial hidrogeniônico) da reação e conseqüentemente preservando a estrutura ideal da enzima RT.

O produto da reação Transcriptase Reversa recebe o nome de cDNA (DNA complementar) o qual, neste caso é um cDNA fita simples e será usado como molde para a reação de PCR.

### **3.4 – Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)**

Por definição PCR é a abreviatura de Reação em Cadeia da Polimerase (Polymerase Chain Reaction). Nesta reação, os produtos de um ciclo de amplificação servem como molde para os ciclos subseqüentes, levando a um aumento exponencial e não-linear na quantidade de produtos amplificados ou amplicons.

A reação de PCR somente é possível devido a características das enzimas DNA Polimerases empregadas na reação, as quais são termoestáveis, ou seja, enzimas que apresentam o máximo de sua atividade sob temperaturas em torno de 70°C e resistem a uma ampla variação de temperatura sem degradação de sua atividade enzimática. Estas enzimas atuam adicionando nucleotídeos livres à extremidade 3' de moléculas de DNA dupla fita pré-existentes.

Esta reação é similar ao mecanismo observado *in vivo* na replicação do DNA durante a divisão celular, onde após a separação das duas fitas, pequenas moléculas de RNA complementares a determinadas regiões do DNA a ser copiado, são

sintetizadas por uma enzima denominada Primase, fornecendo a dupla-fita e a extremidade 3' necessárias à polimerização. A seguir estas moléculas de RNA são degradadas e substituídas por DNA para a obtenção das moléculas filhas. Estas moléculas de RNA são denominadas iniciadores ou “primers”. A especificidade da reação de PCR é determinada pela seqüência de nucleotídeos utilizados como primer, ou seja, para cada fragmento a ser amplificado haverá um conjunto de primers específico, e as condições da reação irão variar de acordo com a seqüência destes e de algumas características da seqüência-alvo.

Uma reação de PCR, independente de sua especificidade, é realizada em ciclos, onde cada ciclo apresenta três (3) etapas: a) desnaturação, etapa onde a temperatura gira ao redor de 94-95°C, onde ocorre a desnaturação da molécula de DNA (separação das duas fitas); b) anelamento ou pareamento dos “primers” - nesta etapa a temperatura varia de 50 a 60°C dependendo da seqüência de nucleotídeos dos primers empregados e nela ocorre o pareamento dos primers com sua seqüência complementar na fita de DNA-alvo; c) Alongamento – etapa onde a temperatura é elevada a 72°C tornando a Taq Polimerase ativada o que leva a amplificação na região delimitada pelos “primers”. A repetição destes ciclos entre 20 a 40 vezes leva a amplificação exponencial da região-alvo.

### **3.3.4 – Seqüenciamento do Genoma do HIV**

Todos os métodos para seqüenciamento automatizado utilizam método desenvolvido por Sanger, embora existam diversas variações na maneira como a reação é realizada, tipo de marcação fluorescente e método de detecção do sinal resultante.

No método desenvolvido por Sanger, uma molécula de fita simples de DNA é submetida à ação de um DNA polimerase que sintetizará uma molécula complementar, a partir de um iniciador oligonucleotídico (primer). O alongamento da fita prossegue até que ocorra a incorporação de um “nucleotídeo de terminação”, interrompendo o processo. O chamado nucleotídeo de terminação corresponde a um dideoxynucleotídeo: molécula de deoxynucleotídeo da qual foi removido o grupo hidroxil 3' terminal, o que impedirá a formação das ligações fosfodiésteres responsáveis pela extensão das cadeias nucleotídicas do DNA. Sendo assim, quatro reações diferentes são realizadas para cada amostra individual de DNA a ser seqüenciada. Em cada uma destas reações adicionam-se os quatro nucleotídeos convencionais (deoxynucleotídeos) e um nucleotídeo de terminação específica: A, T, C ou G.

Durante a reação de seqüenciamento, a extensão da cadeia complementar à fita molde prossegue normalmente, até que um nucleotídeo de terminação seja incorporado, detendo o processo. Como a adição dos terminadores ocorre aleatoriamente, o produto final será uma coleção de cadeias representando todas as extensões possíveis entre a extremidade 5' do primer e as posições correspondentes aos dideoxinucleotídeos adicionados.

Nos métodos convencionais de seqüenciamento, as cadeias resultantes desta reação são detectadas por meio da incorporação de um deoxinucleotídeo marcado isotopicamente, em geral, um <sup>35</sup>S-dCTP, seguido de separação eletroforética em gel de poliacrilamida, sob condições desnaturantes e a exposição do mesmo em filmes de raio-x (auto-radiografia).

Os métodos de seqüenciamento automático, como dito acima, empregam exatamente os mesmos princípios básicos, utilizando os nucleotídeos de terminação e marcação fluorocrômica, compostos capazes de emitir fluorescência quando excitados por uma fonte de luz, o que permite a identificação das cadeias resultantes. .

### 3.3.5 – Lista de mutações dos códons

O ViroSeq HIV-1 *Genotyping System* fornece um relatório indicando se as mutações detectadas pelo teste constituem evidências genéticas de resistência viral. A interpretação tem como base um fluxograma que determina o impacto relativo das mutações nas fases de leitura da Protease e Transcriptase no desenvolvimento de resistência. Este método já teve seu desempenho avaliado em amostras pediátricas por alguns autores (CUNNINGHAM *et al.*, 2001).

As mutações incluídas no fluxograma têm como base:

- Mutações listadas como primárias e secundárias, com base em recomendações da International AIDS Society-USA (HIRSCH *et al.*, 2000).
- Mutações listadas nos estudos GART e VIRADAPT como sendo preditoras de resistência a drogas.
- Recomendações do *Resistance Collaborative Group* com base em suas análises de diversos estudos retrospectivos e prospectivos.
- Mutações que têm como base os mais recentes relatórios e consultoria com *experts* nesse campo para uma interpretação consistente com a literatura atual.



### 3.3.6 – Interpretação

A evidência de resistência é fornecida para cada droga dentro de uma classe e tem base nas mutações encontradas na amostra. A principal fragilidade do teste está na falta de conhecimento sobre as mutações que causam diminuição de suscetibilidade às drogas.

A presença ou combinação de mutações específicas resulta em uma das seguintes chamadas:

- *High* - indica uma alta evidência de resistência.
- *Poss* - indica possível resistência. Mutações ou combinações de mutações que não possuem critérios requeridos para *High*, mas são sugestivas de resistência.
- *None* – indica evidência insuficiente para resistência.
- *High-m* e *Poss-m* são usadas na seção dos NRTI no laudo se a determinação da resistência for baseada na presença da mutação Q151M ou da inserção no códon 69. Estas mutações na combinação com outras substituições conferem resistência às múltiplas drogas nucleosídeos.

Mutações são representadas usando estilos, cores e convenções de pontuação para indicar suas relevâncias para o desenvolvimento de resistência às drogas.

**Caixa vermelha** – Mutações que sozinhas ou combinadas com outras resultam em alta evidência de resistência, chamada *High*.

**Sublinhada com laranja** – Mutações que sozinhas ou combinadas com outras resultam em possível resistência, chamada *Poss*.

**Azul** – Mutações que contribuem, no mínimo, para o desenvolvimento de resistência, porém são necessárias mais de uma dessas mutações para um resultado do tipo *Poss*.

**[Entre colchetes, verde]** – Mutações que são compensatórias, ou seja, elas agem contra a resistência fenotípica. Ex.: efeito da mutação M184V/I em cepas resistentes ao AZT.

### 3.4 - Análise estatística

A análise estatística foi feita utilizando o programa Epi Info 2000, versão 1.0 para Windows com o objetivo de calcular as freqüências das mutações encontradas nos códons da transcriptase reversa e da protease dos pacientes pediátricos que usam e não usam anti-retrovirais. As freqüências foram expressas em percentagem. Resultados quantitativos de média, mediana e desvio padrão foram computados para faixa etária, tempo de diagnóstico (meses), tempo de tratamento (meses), carga viral (valor absoluto e log), contagem de linfócitos CD4+ (valor absoluto e percentual). A partir das mutações encontradas pudemos indiretamente calcular a percentagem de resistência às drogas que estavam e que haviam sido anteriormente utilizadas pelos pacientes.

## **4. RESULTADOS**

#### 4.1. Caracterização epidemiológica da população estudada

Neste estudo foram realizados 44 testes de Genotipagem de crianças infectadas pelo HIV, tendo sido os pacientes divididos em 2 grupos: **grupo A** de crianças que não faziam uso de anti-retrovirais e **grupo B** de crianças que faziam uso de anti-retrovirais.

O **Grupo A** é representado por 13 crianças, sendo 8 pertencentes ao sexo feminino e 5 ao sexo masculino, cuja faixa etária variou de 9 a 155 meses, com média de 75 ( $\pm 50$ ) meses e mediana de 87 meses. O tempo médio de diagnóstico variou de 1 a 98 meses, com média de 42 ( $\pm 34$ ) meses e mediana de 31 meses. A carga viral plasmática observada nos pacientes deste grupo variou de 1900 a  $>750.000$  cópias RNA/ml (3,2 a  $> 6,0 \log_{10}$  cópias/ml) (média de 145.235 cópias; 4,4log) e a contagem de linfócitos T CD4+ de 448 a 3110 células/ml (média de 1144). O percentual de linfócitos T CD4+ variou de 20% a 43% (média 31%). Quanto à categoria clínica deste grupo, a maioria 10(77%) pertencia à categoria A (possuíam sinais e/ou sintomas leves), os três restantes pertenciam à categoria clínica N (assintomáticos). Apenas 4 (30%) apresentavam alteração imunológica moderada (grau 2), os nove (70%) restantes não apresentavam alteração imunológica (grau 1). Neste grupo apenas uma mãe do paciente 11 fez uso de quimioprofilaxia durante a gestação contendo DDI no esquema. Dados clínicos e laboratoriais no momento do teste de genotipagem são apresentados na **tabela 5**.

O **Grupo B** é representado por 31 crianças, 17 pertencentes ao sexo feminino e 14 ao sexo masculino. A faixa etária neste grupo variou de 45 a 194 meses, com média de 109 ( $\pm 40$ ) meses e mediana de 112 meses. O tempo médio de tratamento variou de 17 a 138 meses, com média de 61 ( $\pm 33$ ) meses e mediana de 60 meses. A carga viral plasmática variou de 1031 a  $>750.000$  cópias RNA/ml (2,9 a  $> 6,0 \log$ ) (média de 127.441 cópias; 4,5 $\log_{10}$  cópias/ml) e a contagem de linfócitos T CD4+ variou de 86 a 2343 células/ml (média de 706). O percentual de linfócitos T CD4+ variou de 5% a 55% (média 30%). Neste grupo, nenhuma mãe fez uso de quimioprofilaxia durante a gestação. Dados clínicos e laboratoriais no momento do teste de genotipagem são apresentados na **tabela 6**.

**Tabela 5.** Características gerais do Grupo A no momento do teste de genotipagem (crianças não-tratadas com anti-retrovirais), em 2005, HINSG. N = 13 crianças

Núm e r o	Idade (meses)	Sexo	Cate goria Clíni ca e Imun ológi ca	Tem po de diag nós tico (me ses)	Carga Viral		Contagem de CD4+	
					Có pia s/ ml	L	Célul as/ml	%
01	35	F	A2	31	14. 90	4	831	2
02	127	F	N1	48	1.9 00	3	1.012	4
03	87	M	A1	63	28. 30	4	870	3
04	155	M	N2	84	6.7 80	3	500	3
05	76	F	A1	56	2.1 10	3	1.061	3
06	117	F	A2	01	11 4.0 00	5	448	2
07	119	F	A1	20	2.4 20	3	929	3
08	97	F	N1	93	9.4 50	3	684	4
09	27	F	A1	23	11 2.0 00	5	1.524	2
10	10	M	A1	98	39. 70	4	822	2
11	91	M	A1	5	0 >7 50. 00	6	1.775	3

1	1	F	A2	14	0 56.	4	1.307	2
2	8				50			
1	1	M	A1	07	0 >7	6	3.110	3
3	1				50. 00 0			

**Tabela 6.** Características gerais do Grupo B no momento do teste de genotipagem (crianças tratadas com anti-retrovirais), em 2005, HINSG. N = 31 crianças

N ú m e r o	I d e n t i f i c a ç ã o	S e x o	Cate goria Clíni ca e Imun ológi ca	Te mp o de trat am ent o (m es es)	Carga Viral		Contagem de CD4+	
					Có pia s/ ml	L	Cél ula s/m l	%

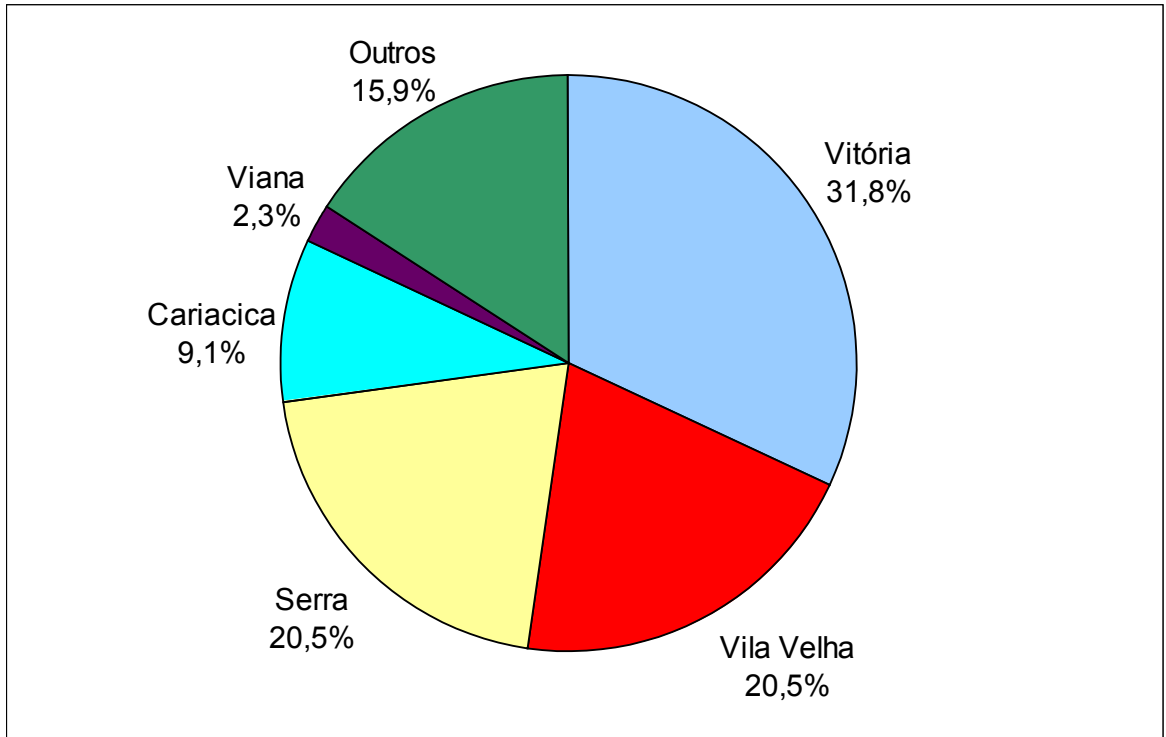
0	1	F	C3	11	18.	4	907	2
1	2			2	70			
0	4	M	C3	24	0	5	753	2
2	8				16			
0	7	F	B3	36	5.0	3	978	4
3	3				00			
0	9	F	B2	36	2.3	2	2.3	5
4	9				33			
0	8	M	A2	17	1.0	5	43	3
5	5				80		1.0	
0	2	M	B2	19	22	4	69	2
6	8				2.0			
0	8	M	C2	77	00	4	756	2
7	1				16.			
0	1	F	B2	36	50	4	685	2
8	1				0			
0	1	F	C3	76	62.	4	524	2
9	3				80			
1	8	F	C3	75	0	4	1.8	4
0	1				86.		15	
1	3	F	A2	48	50	5	394	1
1	7				0			
1	1	M	B3	13	14.	5	266	7
2	4			8	60			
1	6	M	B1	78	0	4	980	3
3	6				72.			
1	1	F	A2	70	90	3	609	3
4	4				0			
1	8	F	B2	36	1.1	4	678	2
5	1				00			
1	8	F	B3	80	37.	2	675	1
6	9				70			
1	6	M	C3	22	0	5	714	2
7	7				1.0			
					31			
					19.			
					10			

1	5	M	C3	24	0	4	246	5
8	6				35.			
					40			
1	1	F	A2	60	0	4	495	2
9	1				40.			
					30			
2	9				0			
0	1	F	B3	36	34	5	128	7
					7.0			
2	7				00			
1	1	F	A2	60	3.0	3	784	2
	0				00			
2	1							
2	1	F	C3	51	63.	4	296	1
2	2				40			
	0				0			
2	1	F	A2	36	1.8	3	640	2
3	7				40			
	2							
2	1	M	A3	12	6.1	3	584	1
4	2			0	30			
	9							
2	1	M	C3	10	>7	6	339	2
5	4			5	50.			
	5				00			
					0			
2	4	M	C3	36	21.	4	1.7	3
6	5				90		45	
					0			
2	8	F	B2	84	35.	4	648	2
7	4				40			
					0			
2	1	M	C3	96	>7	6	260	8
8	2				50.			
	5				00			
					0			
2	1	M	C3	90	>7	6	86	5
9	1				50.			
	2				00			
					0			
3	1	M	B2	89	9.3	3	884	2
0	0				70			
	5				0			
3	1	F	C3	12	48.	4	476	2
1	3			0	20			
	7				0			

---

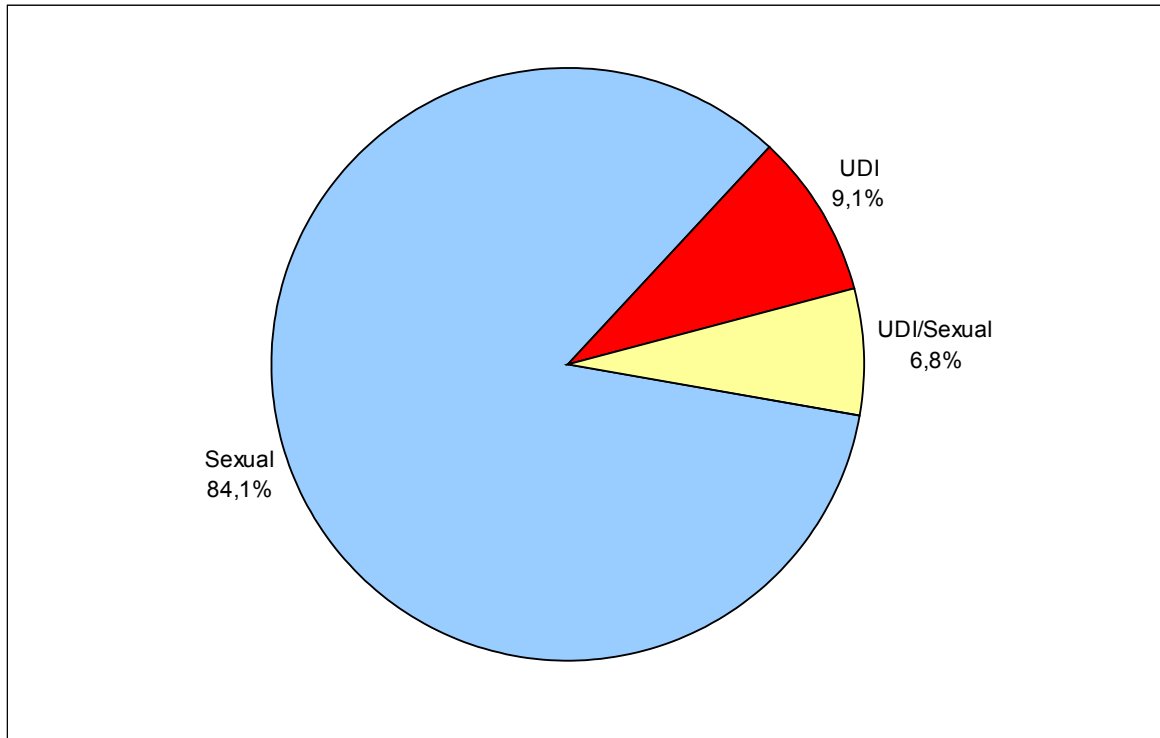


Neste estudo, 84,1% das crianças arroladas eram procedentes da região metropolitana da Grande Vitória (Vitória, Cariacica, Vila Velha, Serra, Viana), e 15,9% dos demais aos Municípios vizinhos e a outros Estados (**Figura 13**).



**Figura 13.** Procedência das crianças submetidas ao teste de genotipagem, em 2005, HINSG. N = 44 crianças

A análise da categoria de exposição das mães das 44 crianças estudadas demonstrou que a forma de transmissão sexual do HIV foi predominante (84,1%), como ilustrado na **figura 14**.



**Figura 14.** Categoria de exposição das mães das crianças submetidas ao teste de genotipagem, em 2005, HINSG. N = 44 crianças

#### 4.2. Listas das Mutações nos Códons da TR e da Protease no Grupo A (crianças não-tratadas com ARVs)

A análise do perfil genotípico do HIV-1 para Inibidores da Transcriptase Reversa Análogos (ITRN) e Não-Análogos de Nucleosídeos (ITRNN), e para Inibidores de Proteases (IP) em crianças não-tratadas com anti-retrovirais (Grupo A) é apresentado na **Tabela 7**. Os subtipos encontrados também estão apresentados nesta tabela.

As mutações encontradas neste grupo consideradas relevantes foram apenas dois: a) o paciente 3 possui a mutação **M46L** no gene da protease, e b) o paciente 11 apresentou a mutação **T69N** no gene da transcriptase reversa. As outras mutações encontradas foram em códons acessórios, e não levaram à resistência a drogas.

**Tabela 7.** Perfil genotípico do HIV para Inibidores da NTR e NNTR, e IP em crianças não-tratadas com anti-retrovirais (Grupo A), em 2005, HINSG. N = 13 crianças

Número	Subtipos	Mutações	Mutações	Mutações IP	Resistência	Possível
	Pr/TR	ITRN	ITRNN			Resistência
01	B/B	-	-	L63P	-	-
02	B/F	<b>K219Q</b>	-	M36I;A71V;V77I	-	-
03	F/F	G333E	-	K20R;M36I; <b>M46L</b>	-	NFV; IDV
04	F/B	-	-	L10I;M36I;V77I	-	-
05	F/B	-	-	K20R;M36I	-	-
06	F/F	-	-	L10I;M36I.L63P	-	-
07	B/B	-	-	L63P	-	-
08	B/F	-	-	A71V;V77I	-	-
09	B/B	G333E	-	L10I;A71T;V77I	-	-
10	B/B	-	-	L63P	-	-
11	F/F	<b>T69N</b>	-	M36I	DDC; DDI	-
12	B/B	-	-	L63P	-	-
13	B/F	G333E	-	L63P;V77I	-	-

#### 4.3. Listas das Mutações nos Códon da TR e da Protease no Grupo B (crianças tratadas com ARVs)

As **Tabelas 8 e 9** apresentam as mutações, relacionadas à diminuição de susceptibilidade aos ITRN, ITRNN e IP, encontradas durante a genotipagem das 31 crianças em uso de ARVs. Os subtipos encontrados também são mostrados nestas tabelas.

O histórico do uso de esquemas ARVs anteriores à realização do Teste de Genotipagem nas 31 crianças do Grupo B é fornecido na **tabela 10**. Dez das 31 (32,2%) crianças do Grupo B se encontravam em seu primeiro esquema de tratamento com drogas anti-retrovirais (pacientes 2, 4, 6, 8, 13, 15, 17, 21, 23, 26) (**Tabela 10**). Dentre estas dez, sete (70%) apresentaram resistência aos ITRN, três (30%) aos ITRNN e apenas duas (20%) aos IP. Destas 10 crianças, cinco (50%) faziam uso de terapia dupla (com 2 ITRN) e apresentavam resistência aos ITRN, mas nenhuma apresentava resistência aos IPs.

**Tabela 8.** Perfil genotípico do HIV para Inibidores da Transcriptase Reversa Análogos e Não Análogos de Nucleosídeos em crianças tratadas com anti-retrovirais, em 2005, HINSG. N = 31

Número	Mutações ITRN	M	ARV	Resistê	Pos
Subtipos		ut	em uso	ncia	sível
Pr/TR		a			Resi
		ç			stên
		õ			cia
		e			

S  
I  
T  
R  
N  
N

<b>01</b>	K70R;D67N;T69N;M1	K103N;L1	D4T+3TC+	AZT;3T	DDI;
<b>F/B</b>	84V;K219E; T215I	00I	EFV	C;FTC; EFV	D4T; ABC
<b>02</b>	E44A/D;K70R;V75A;T	K103N;P2	AZT+3TC+	NVP EFV;NV	DDI;
<b>F/F</b>	69I;V75A/S	25H	EFV	P	D4T
<b>03</b>	-	K103N	AZT+DDI	EFV;NV	-
<b>B/B</b>				P	
<b>04</b>	K70R;D67N	K101E;G1	AZT+DDI+	NVP	AZT;
<b>C/C</b>		90A	NVP		EFV
<b>05</b>	-	K103N;K1	AZT+DDI+	EFV;NV	-
<b>C/C</b>		01Q	EFV	P	
<b>06</b>	K70R;D67N	-	AZT+DDI	-	AZT
<b>F/B</b>					
<b>07</b>	K70R;D67N;M184V;K	-	AZT+3TC	AZT;3T	DDI;
<b>F/F</b>	219Q;T215V			C;FTC	D4T; ABC
<b>08</b>	K70R;D67N;T69N;K21	A98G	AZT+DDI	AZT;D4	DDI;
<b>F/B</b>	9Q;T215F			T	ABC; TDF
<b>09</b>	M184V	-	AZT+3TC	3TC;FT	-
<b>B/B</b>				C	
<b>10</b>	M41L;D67N;V118I;T21	-	AZT+3TC	AZT;D4	DDI;
<b>B/B</b>	5Y			T	ABC; TDF
<b>11</b>	K70R;T69N;K219E;T2	K103N;L1	AZT+3TC	AZT;EF	DDI;
<b>B/B</b>	15F	00I		V;NVP	D4T; ABC
<b>12</b>	D67N;E44D;M41L;T69	-	AZT+3TC	AZT;DD	3TC;
<b>F/B</b>	D;V118I; T215Y;L210W			I;D4T;A BC;	FTC
<b>13</b>	K70R;D67N;M184V;K	-	AZT+3TC	TDF 3TC;FT	AZT; DDI;
<b>B/B</b>	219Q			C	D4T
<b>14</b>	M41L;D67N;K70R;T69	K101E	AZT+3TC	AZT;3T	ABC TDF;
<b>F/F</b>	N;M184V; T215F;K219Q			C;FTC; DDI; D4T;AB	NVP
<b>15</b>	K70R;T69N;K219E;T2	-	AZT+DDI	C; AZT	DDI; D4T;
<b>B/F</b>	15F				ABC
<b>16</b>	M41L;V75M;V118I;T2	-	AZT+DDI	AZT;D4	DDI;
<b>B/B</b>	15Y;L210WG333E			T;	ABC; TDF
<b>17</b>	F77L;V75I;K70R;K65R	K103N;Y1	AZT+3TC+	3TC;FT	-
<b>B/B</b>	;F116Y; Q151M	81C; G190A	EFV	C;AZT; DDI; D4T;AB C;TDF; EFV	
<b>18</b>	M41L;INS69;D67E;V7	K103N;L1	D4T+3TC	NVP AZT;DD	3TC;
<b>F/B</b>	5A;L74I; T69A;T215Y;L210W	00I		I;D4T ABC;TD F;EFV; NVP	FTC
<b>19</b>	E44D;D67N;K70R;V75	-	D4T+3TC	3TC;FT	TDF
<b>B/B</b>	M;M184V;			C;AZT	

	T215Y;K219Q			DDI;D4 T;ABC	
<b>20</b> <b>B/B</b>	T215S	-	AZT+3TC	-	-
<b>21</b> <b>B/B</b>	M41L;D67N;K70R;K21 9E;T215Y	-	AZT+DDI	AZT;D4 T	DDI; ABC; TDF
<b>22</b> <b>F/F</b>	M184V	-	AZT+3TC	3TC;FT C	-
<b>23</b> <b>B/F</b>	K70R;D67N;K219Q;T2 15F; G333E	-	AZT+DDI	AZT;D4 T	DDI; ABC; TDF
<b>24</b> <b>B/B</b>	K70R;D67N;T69N;M1 84V;K219Q	K103N	D4T+3TC	3TC;FT C;EFV; NVP	AZT; DDI; D4T; ABC TDF
<b>25</b> <b>F/B</b>	M41L;D67N;K70R;L74 I;T69N; V118I;M184V;T215F;K 219Q	K103N;Y1 88L	D4T+3TC	3TC;FT C;;AZT; DDID4T ;ABC;E FV; NVP	-
<b>26</b> <b>F/F</b>	-	-	AZT+DDI	-	-
<b>27</b> <b>B/B</b>	M41L;D67N;M184V;T2 15Y;L210WK219N	-	AZT+3TC+ EFV	3TC;FT C;AZT; DDI;D4 T;ABC; TDF	-
<b>28</b> <b>F/F</b>	D67G;E44D;M41L;V75 M;T69D; K219R;T215Y;L210W	K103N;K1 01Q	AZT+DDI	AZT;DD I;D4T;A BC; TDF;;E FV;NVP	3TC; FTC
<b>29</b> <b>F/F</b>	D67N;E44D;M41L;T69 D;V118I; M184V;T215Y;L210W	-	AZT+3TC	3TC;FT C;AZT; DDI; D4T;AB C;TDF	-
<b>30</b> <b>B/F</b>	M41L;A62V;M184V;T2 15F; G333E	K103N;V1 06A	D4T+3TC+ NVP	3TC;FT C;AZT; D4T; EFV;NV P	ABC; DDI
<b>31</b> <b>B/B</b>	E44D;M41L;V118I;M1 84V;L210W;T215Y	-	AZT+3TC	3TC;FT C;AZT; DDI; D4T;AB C	TDF

**Tabela 9.** Perfil genotípico do HIV-1 para Inibidores da Protease em crianças tratadas com anti-retrovirais, em 2005, HINSG. N = 31

Número Subtipos	Mutações IP	AR V em uso	Resistên cia	Possível Resistência
<b>01</b> <b>F/B</b>	K20R;M36I	-	-	-
<b>02</b> <b>F/F</b>	L10R/V;K20M;L33F;M36I;D3 0N; G48V;G73A;V82F;V77I;N88 T	-	IDV;SQV; RTV;NFV; ATV	APV;FOS;LPV
<b>03</b> <b>B/B</b>	L63P;V77I	NFV	-	-
<b>04</b>	K20R;M36I	-	-	-

<b>C/C</b> <b>05</b>	M36I	-	-	-
<b>C/C</b> <b>06</b>	L10I;K20R;M36I;I54V;V82A	RTV	NFV	APV;FOS;IDV;SQV;
<b>F/B</b> <b>07</b>	L10V;L33F;D30N;L90M	NFV	NFV	LPV;RTV;ATV APV;FOS;IDV;SQV;R
<b>F/F</b> <b>08</b>	M36I	-	-	TV -
<b>F/B</b> <b>09</b>	L10V;K20R;M36I;I54V;L63P;	LPV	NFV	APV;FOS;IDV;SQV;L
<b>B/B</b> <b>10</b>	V82A L10F;M36I;D30N;A71V;N88	APV	NFV	OP;RTV;ATV -
<b>B/B</b> <b>11</b>	D K20M;L63P	LPV	-	-
<b>B/B</b> <b>12</b>	L10V;K20R;M36I;M46L;I54V	LPV	APV;FOS;I	-
<b>F/B</b>	;L63P; A71V;V82A;L90M		DV;SQV; LPV;RTV; NFV;ATV	-
<b>13</b>	-	-	-	-
<b>B/B</b> <b>14</b>	L10V;K20R;M36I;I54V;V82A	LPV	NFV	APV;FOS;IDV;SQV;L
<b>F/F</b>				PV;RTV; ATV -
<b>15</b>	-	-	-	-
<b>B/F</b>				
<b>16</b>	M36I;I54V;L63P;A71V;I84V;	RTV	APV;FOS;I	LPV
<b>B/B</b>	L90M		DV;SQV; RTV;NFV; ATV -	
<b>17</b>	L63P;A71V	-	-	-
<b>B/B</b> <b>18</b>	L10V;K20R;M36I;I54V;M46I;	LPV	APV;FOS;I	SQV
<b>F/B</b>	F53L; V82A;V77I		DV;LPV; RTV;NFV; ATV	
<b>19</b>	L10I;K20R;M36I;M46I;I54V;	LPV	APV;FOS;I	-
<b>B/B</b>	L63P; A71T;V82A;L90M;N88D		DV;SQV; LPV;RTV; NFV;ATV	
<b>20</b>	L63P;V77I	LPV	-	-
<b>B/B</b> <b>21</b>	L63P	-	-	-
<b>B/B</b> <b>22</b>	-	LPV	-	-
<b>F/F</b> <b>23</b>	A71V;V77I	-	-	-
<b>B/F</b> <b>24</b>	L10F;M46I;I54V;	LPV	APV;FOS;I	-
<b>B/B</b>	L63P;A77I;V82A;L90M		DV;SQV; LPV;RTV; NFV;ATV APV;FOS;I	
<b>25</b>	L10V;K20R;L33F;M36I;M46I	LPV	APV;FOS;I	-
<b>F/B</b>	;I50V; I54V;L63P;A71V;V82A;L90		DV;SQV;L PVRTV;NF	
<b>26</b>	M K20R;M36I	LPV	V;;ATV -	-
<b>F/F</b> <b>27</b>	L10I;I54V;L63P;A71V;V77I;	-	IDV;SQV;	APV;FOS;LPV
<b>B/B</b>	V82A; L90M		RTV;NFV; ATV	
<b>28</b>	D30N;M36I;L33F;M46L;I54V	LPV	IDV;SQV;	APV;FOS;LPV;ATV
<b>F/F</b>	;L63P; A71V;L90M;V77I		RTV;NFV	
<b>29</b>	V32I;M36I;M46L;I47A;V63P;	APV	IDV;RTV;N	APV;FOS;SQV;LPV;
<b>F/F</b> <b>30</b>	L90M		FV	ATV
<b>B/F</b>	L10I;M46I;L63P;A71T;L90M; V77I	-	NFV	APV;FOS;IDV;SQV;L PV;RTV; ATV

**Tabela 10.** Histórico da terapia Antiretroviral em crianças tratadas com anti-retrovirais, em 2005, HINSG.

N = 31

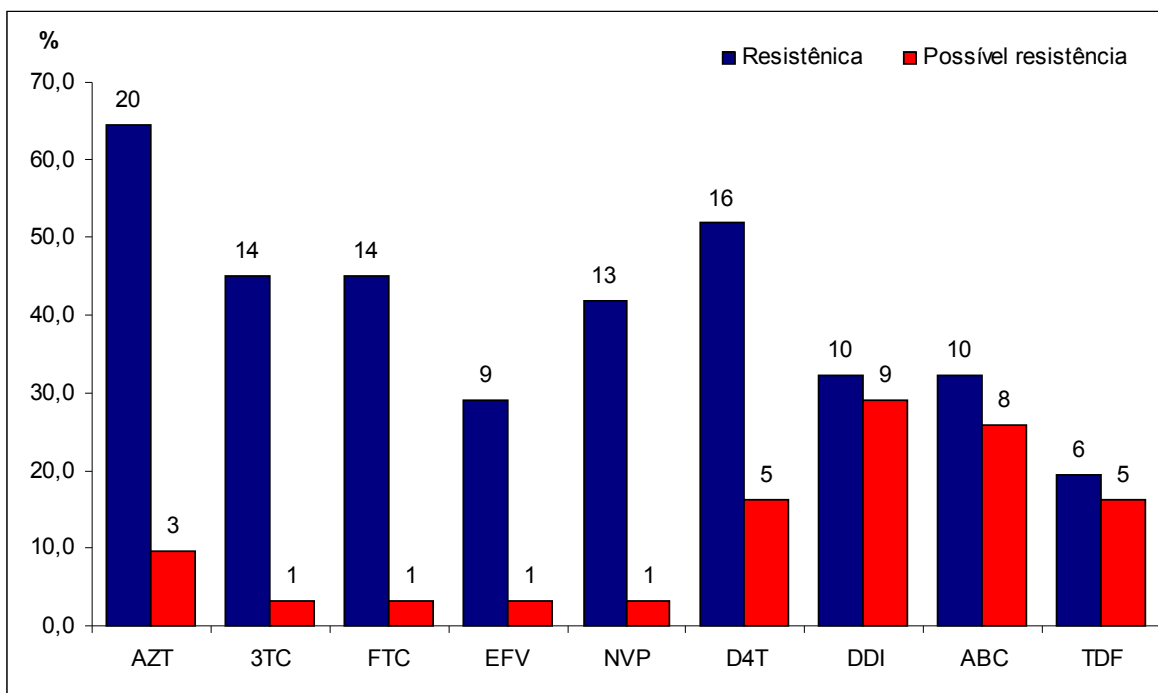
N	ARV em uso atual / Tempo(meses)	Tempo Total de uso de ARVs	Monoterapia	Terapia dupla anterior	Esquemas anteriores
0	D4T+3TC+EFV (44m)	112 M	AZT	AZT+DDI	-
0	AZT+3TC+EFV (24m)	24 M	-	-	-
0	AZT+DDI+NFV (24m)	36 M	-	-	AZT+DDI+NVP
0	AZT+DDI+NVP (36m)	36 M	-	-	-
0	AZT+DDI+EFV (6m)	17 M	-	-	AZT+DDI+NFV
0	AZT+DDI+RTV (19m)	19 M	-	-	-
0	AZT+3TC+NFV (62m)	77 M	-	AZT+DDI	-
0	AZT+DDI (36m)	36 M	-	-	-
0	AZT+3TC+LPV (27m)	76 M	-	AZT+DDI	AZT+3TC+RTV; D4T+3TC+NFV;
1	AZT+3TC+APV (5m)	75 M	-	AZT+DDI	AZT+DDI+EFV AZT+DDI+NFV
1	AZT+3TC+LPV (5m)	48 M	-	AZT+DDI	AZT+3TC+NFV; AZT+3TC+EFV
1	AZT+3TC+LPV (22m)	138 M	AZT	AZT+3TC	AZT+3TC+RTV; D4T+3TC+NFV
1	AZT+3TC (78m)	78 M	-	-	-
1	AZT+3TC+LPV (22m)	70 M	-	AZT+3TC	AZT+DDI+EFV
1	AZT+DDI (36m)	36 M	-	-	-
1	AZT+DDI+RTV (48m)	80 M	-	AZT+DDI	-
1	AZT+3TC+EFV	22 M	-	-	-

1	(22m) D4T+3TC+LPV	24 M	-	-	AZT+DDI+EFV;
1	(12m) D4T+3TC+LPV	60 M	-	AZT	AZT+3TC+RTV
	(24m)			+DD	AZT+3TC+NFV
2	AZT+3TC+LPV	36 M	-		AZT+DDI+EFV
2	(10m) AZT+DDI (60m)	60 M	-	-	-
2	AZT+3TC+LPV	51 M	-	AZT	AZT+3TC+NFV
	(24m)			+DD	
2	AZT+DDI (36m)	36 M	-		-
				-	
2	D4T+3TC+LPV	120 M	-	AZT	AZT+3TC+NFV;
	(24m)			+DD	AZT+3TC+EFV
2	D4T+3TC+LPV	105M	AZT		AZT+3TC+RTV;AZT+DDI
	(36m)			AZT	+EFV;
				+DD	
2	AZT+DDI+LPV	36 M	-		AZT+3TC+NFV
	(36m)			-	-
2	AZT+3TC+EFV	84 M	-	AZT	D4T+3TC+NFV
	(30m)			+DD	
2	AZT+DDI+LPV	96 M	-		D4T+3TC+NFV;
	(12m)			AZT	AZT+3TC+EFV
				+DD	
2	AZT+3TC+APV(	90 M	AZT		AZT+3TC+RTV;
	12m)			AZT	D4T+3TC+NFV;
				+DD	
3	D4T+3TC+NVP	89 M	-		AZT+DDI+LPV
	(17m)			AZT	AZT+3TC+NFV;
				+DD	D4T+3TC+IDV
3	AZT+3TC+RTV	120 M	-		-
	(92m)			AZT	
				+DD	

Podemos observar ainda na **Tabela 10** que 15 (48,3%) das 31 crianças do Grupo B (pacientes 1, 9, 10, 11, 12, 14, 18, 19, 22, 24, 25, 27, 28, 29 e 30) já haviam usado 3 ou mais esquemas de tratamento com drogas anti-retrovirais diferentes, inclusive monoterapia com AZT (quatro dos 15 pacientes: pacientes 1, 12, 25, 28), terapia dupla (14 dos 15) e atualmente todos faziam uso de terapia tripla baseada em IP ou ITRNN. Dentre estas quinze crianças multi-experimentadas, apenas seis apresentavam contagem de linfócitos CD4+ acima de 25% (considerado normal), duas contagem entre 15 a 24% (deficiência imunológica moderada) e sete com contagem menor 15% (deficiência imunológica grave). Por outro lado os níveis de viremia para estes pacientes foram todos elevados (com log carga viral variando de 3,0 a > 6,0).



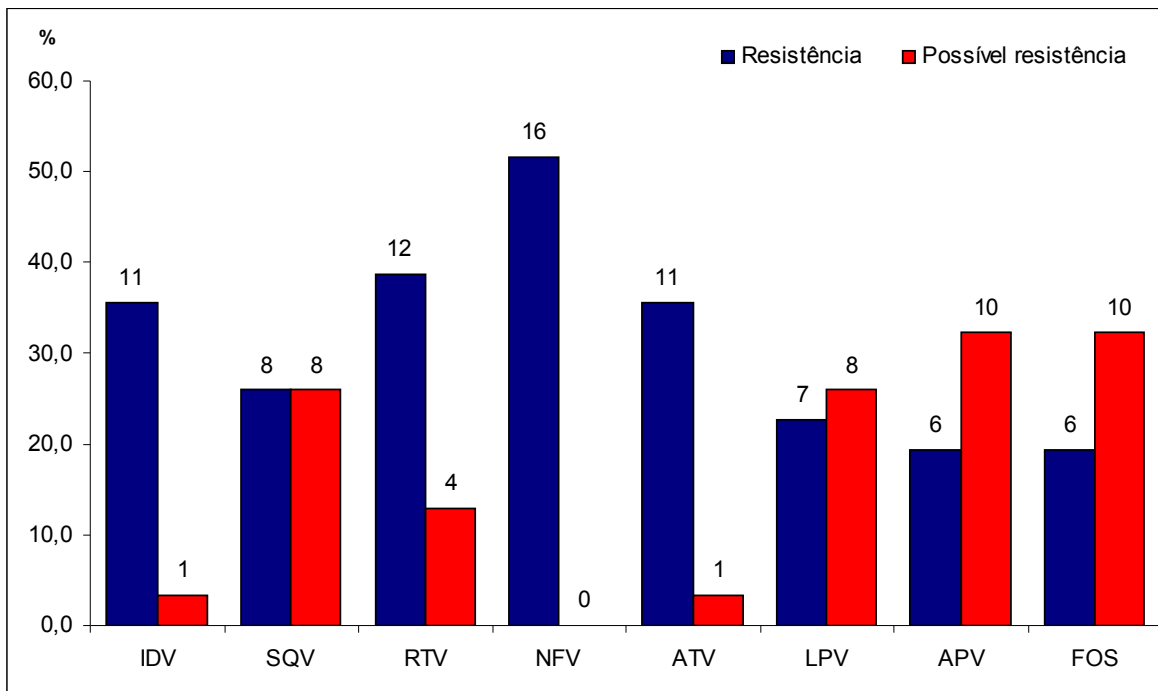
Das 31 crianças do Grupo B submetidas ao teste de Genotipagem, 20 (64,5%) apresentaram resistência ao AZT, enquanto 3 (9,6%) possível resistência a esta droga; quatorze (45,2%) apresentaram resistência ao 3TC, enquanto apenas uma (3,2%) possível resistência (**Figura 15**). Essa mesma frequência foi observada para o FTC. Nove das 31 (29,0%) crianças apresentaram resistência ao EFV, enquanto apenas uma (3,2%) possível resistência; 13 (41,9%) apresentaram resistência ao NVP, enquanto apenas 1 (3,2%) possível resistência; 16 (51,6%) apresentaram resistência ao D4T, enquanto cinco (16,1%) possível resistência; 10 (32,2%) apresentaram resistência ao DDI, enquanto 9 (29,0%) possível resistência; 10 (32,2%) apresentaram resistência ao ABC, enquanto 8 (25,8%) possível resistência; 6 (19,3%) apresentaram resistência ao TDF, enquanto 5 (16,1%) possível resistência.



**Figura 15.** Frequência da Resistência aos anti-retrovirais ITRN e ITTRN, em 31 crianças em uso de ARVs, em 2005, HINSG.

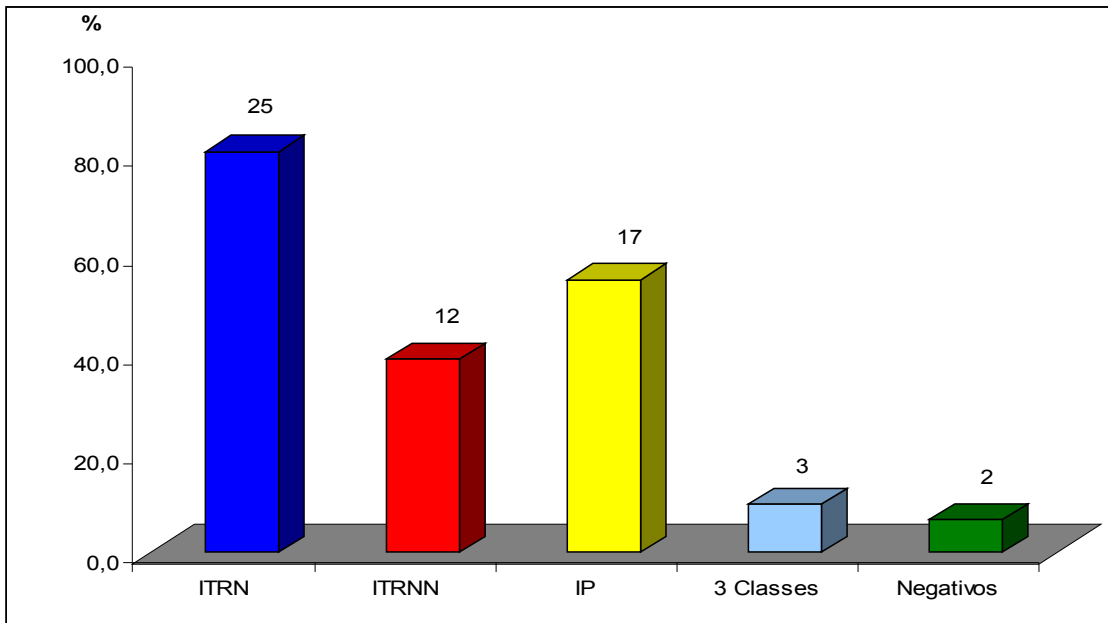
Em uma análise semelhante, mas considerando apenas os IPs, foi observado que das 31 crianças do Grupo B submetidas ao teste de Genotipagem, 11 (35,5%) apresentavam resistência ao IDV, apenas uma (3,2%) possível resistência; 8 (25,8%) apresentavam resistência ao SQV, enquanto 8 (25,8%)

uma possível resistência (**Figura 16**). Doze amostras (38,7%) apresentavam resistência ao RTV, enquanto 4 (12,9%) uma possível resistência. Amostras de dezesseis (51,6%) crianças apresentavam mutações compatíveis com resistência ao NFV. Onze (35,5%) apresentaram resistência ao ATV, enquanto uma (3,2%) possível resistência. Mutações que conferem resistência ao LPV apareceram em 7 (22,6%) amostras e que causam possível resistência em 8 (25,8%). Seis (19,3%) crianças apresentaram resistência ao APV, enquanto 10 (32,2%) possível resistência, essa mesma frequência foi observada para o FOS.



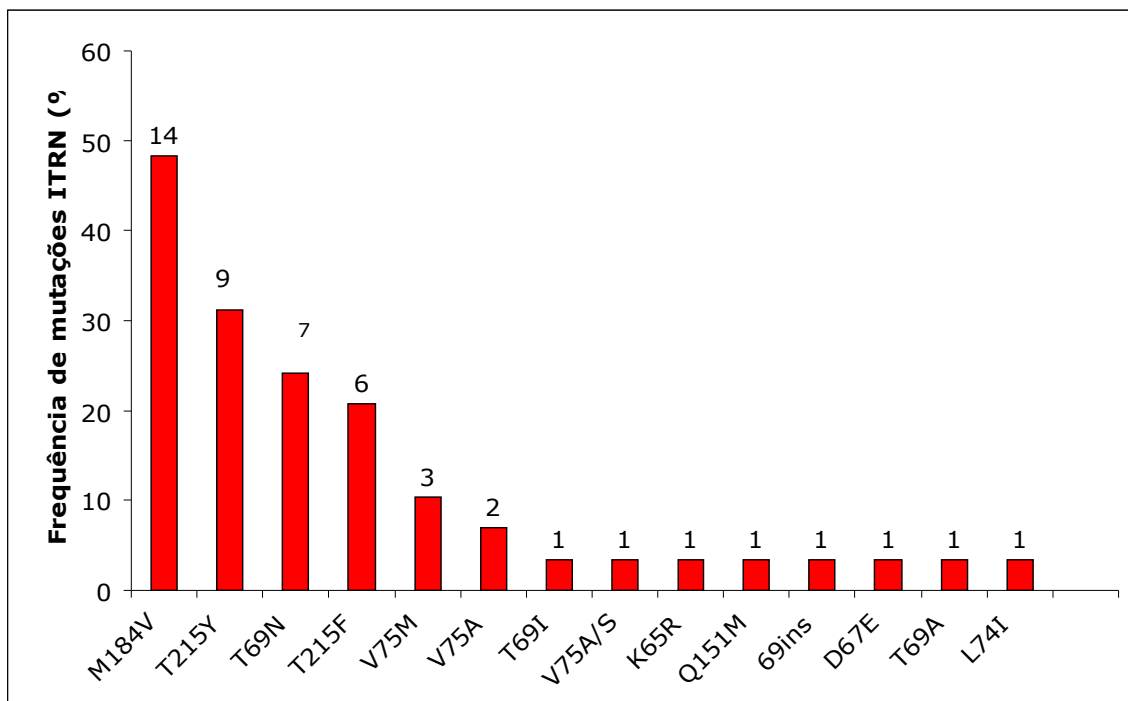
**Figura 16.** Frequência da Resistência aos anti-retrovirais Inibidores de Protease, em 31 crianças em uso de ARVs em 2005, HINSG.

A análise da frequência de crianças com mutações relacionadas à resistência a cada uma das classes de drogas encontradas neste estudo mostraram que: a) 25 das 31 crianças (80,6%) apresentavam mutações de resistência aos ITRNs; b) 12 crianças (38,7%) aos ITRNNs e c) 17 crianças (54,8%) aos IPs. Três (9,6%) das 31 crianças arroladas apresentavam mutações que conferiam resistência às três classes de drogas (pacientes 18, 28 e 30), e duas (6,4%) apesar de fazerem uso de esquema tríplice não apresentaram nenhuma mutação que conferisse resistência a qualquer uma das classes de drogas (pacientes 20 e 26), como mostra a **Figura 17**.



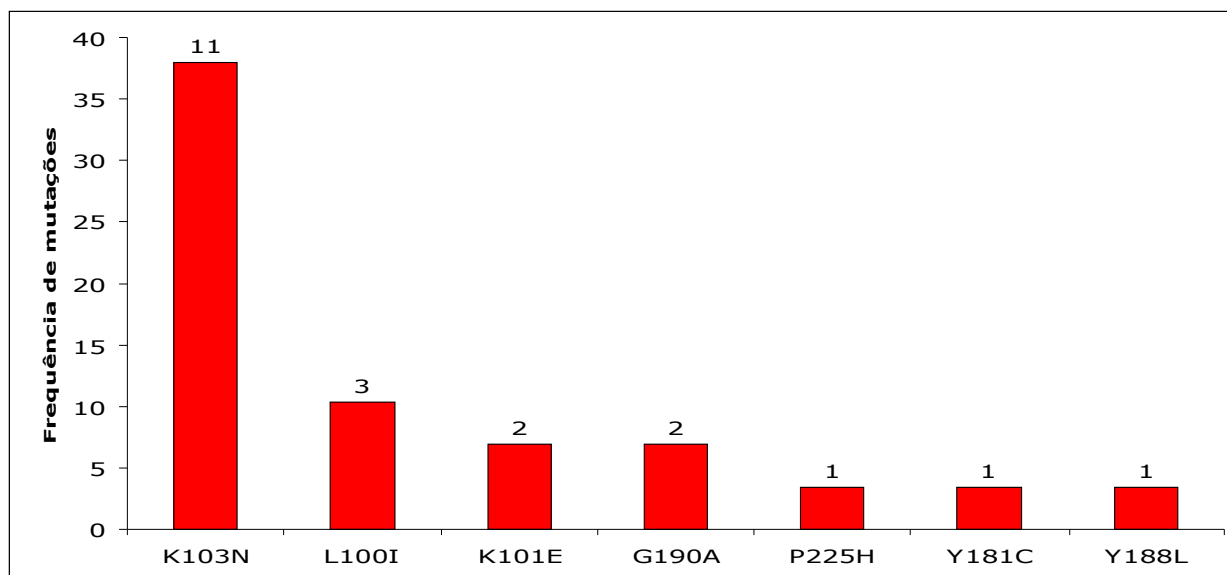
**Figura 17.** Percentagem de resistência segundo a classe de droga em 31 crianças em uso de ARVs, em 2005, HINSG.

A frequência das principais mutações relacionadas à resistência aos ITRNs é apresentada na **figura 18**. Nossos resultados demonstram que as mutações M184V(45,1%), T215Y(29%), T69N(22,58%) e T215F(19,3%) foram as mais frequentemente encontradas.



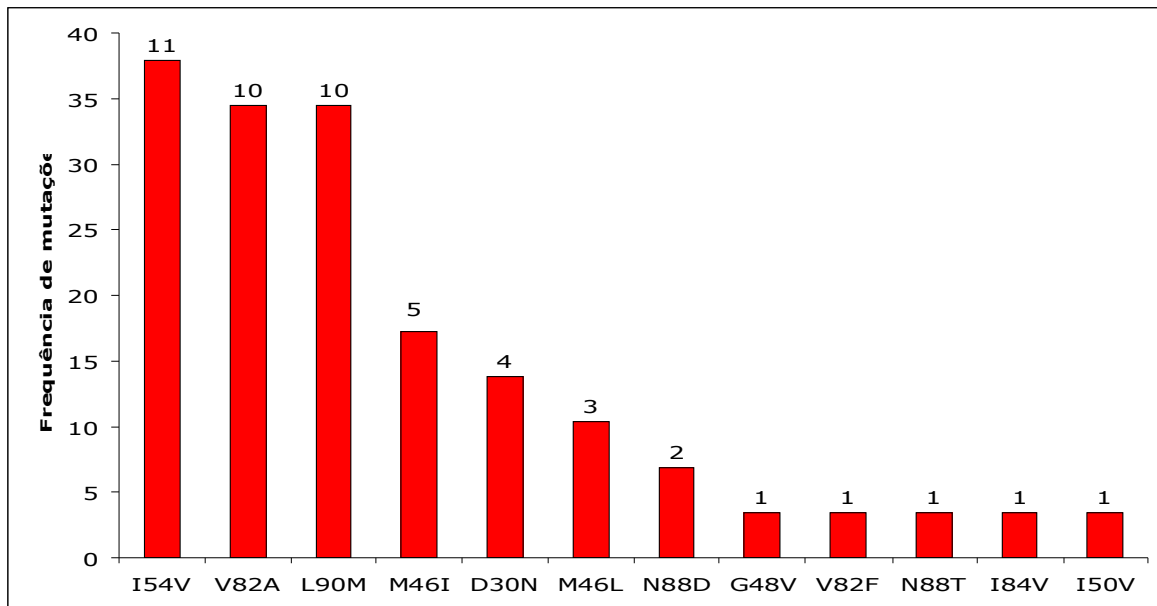
**Figura 18.** Frequência de mutações principais no códon da Transcriptase Reversa em 31 crianças em uso de ARVs, em 2005, HINSG.

A frequência das principais mutações relacionadas à resistência aos ITRNNs é apresentada na **figura 19**. Nossos resultados demonstram que as mutações K103N (35,5%) e a L100I (9,6%) foram as mais frequentes.



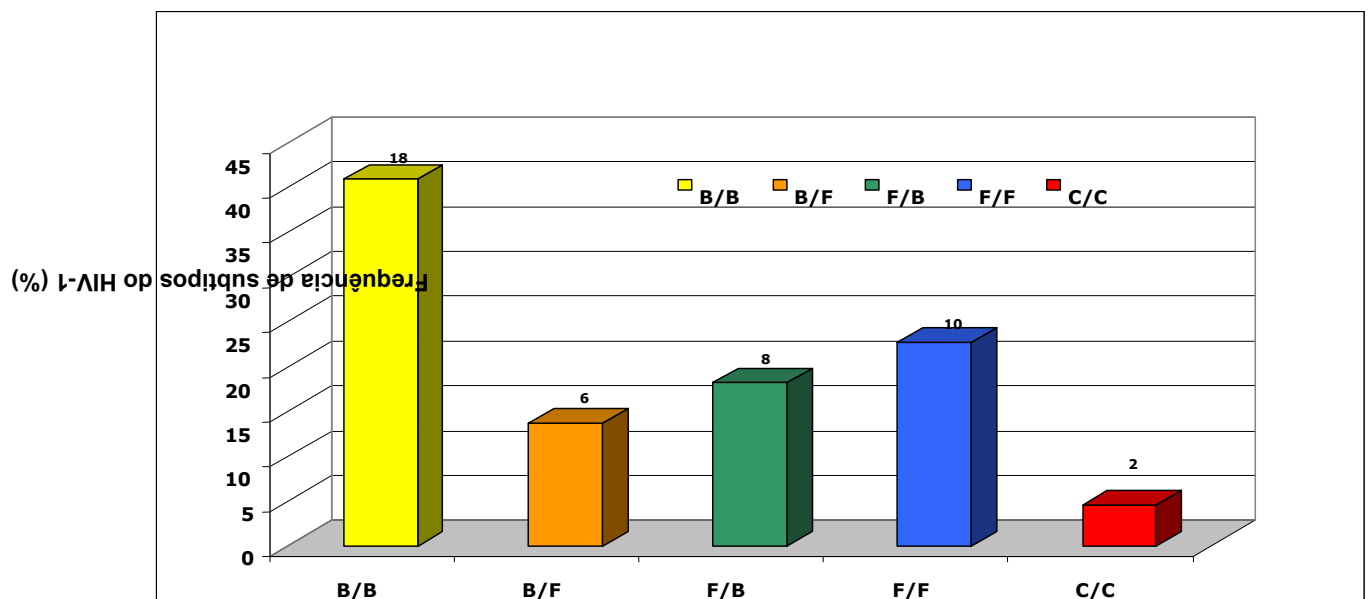
**Figura 19.** Frequência de mutações principais no códon da Transcriptase Reversa não análogo de nucleosídeo em 31 crianças em uso de ARVs, em 2005, HINSG.

A análise da frequência das mutações relacionadas à resistência aos IPs é apresentada na **figura 20**, sendo as mutações I54V (35,4%), V82A (32,2%), L90M (32,2%), M46I (16,1%) e a D30N (12,9%) encontradas com maior frequência.



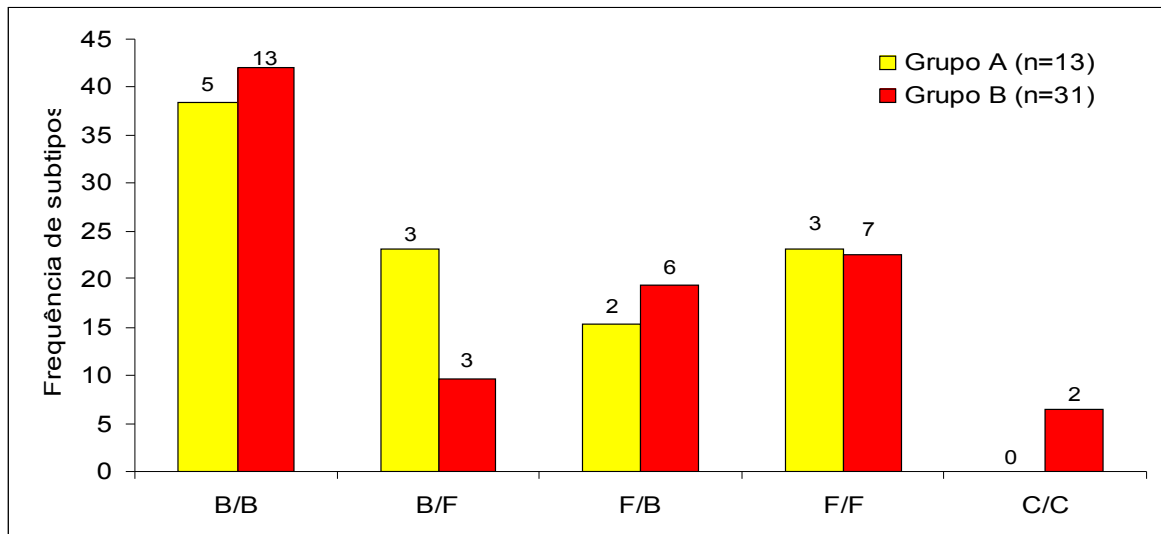
**Figura 20.** Frequência de mutações principais no códon da Protease em 31 crianças em uso de ARVs, em 2005, HINSG.

A maioria (40,9%) das amostras obtidas foi classificada como subtipo B(18/44) pela análise filogenética. As amostras restantes (59,1%) estudadas foram identificadas como vírus não-B: dez pacientes (22,7%) foi classificado como subtipo F e dois (4,5%) foi classificado como subtipo C em ambas as regiões estudadas. Foram encontradas formas recombinantes de subtipo B em uma região: B/F (6 pacientes; 13,6%) e F/B (8 pacientes; 18,1%). Estes dados são mostrados na **figura 21**.



**Figura 21.** Prevalência dos subtipos do HIV-1 no grupo das 44 crianças atendidas em HINSG, Vitória/ES, 2005.

A **Figura 22** apresenta os subtipos do HIV-1 encontrados distribuídos de acordo com os grupos de pacientes.



**Figura 22.** Prevalência dos subtipos do HIV-1 nos diferentes grupos (A e B), HINSG, Vitória/ES, 2005.

## 5. DISCUSSÃO

O presente trabalho descreve, pela primeira vez, a freqüência de mutações nos genes da transcriptase reversa (TR) e protease do HIV-1, localizados no gene *pol*, em crianças com e sem tratamento com drogas anti-retrovirais, atendidas no Setor de Infectologia/Aids Pediátrico do Centro de Referência do Hospital Infantil Nossa Senhora da Glória – Vitória / ES. Mutações nas regiões codificadoras da TR e Protease no gene *pol*, alvos da terapia antiretroviral, adquiridas pelo HIV durante o curso de seu ciclo replicativo, (MITSUYA *et al.*, 1990) constituem um dos mecanismos virais de resistência às drogas e têm implicações diretas na transmissão e na progressão da doença (GALLEGO *et al.*, 2002). Diante da complexidade dos modelos terapêuticos e do crescente número de crianças portadoras de vírus resistentes aos ARVs torna-se crucial a avaliação da resistência do HIV às drogas utilizadas nos esquemas terapêuticos para a manutenção de um tratamento eficaz e de longo curso nestes pacientes.

Mutações de resistência às drogas de todas as classes (ITRN, ITRNN e IP) têm sido descritas mesmo em pacientes virgem de tratamento com ARVs (NÁJERA *et al.*, 1995, BRENNER *et al.*, 2002; BRENNER *et al.*, 2004; HECHT *et al.*, 1998). Porém, os relatos da presença de cepas resistentes aos ARVs em crianças não-tratadas ainda são escassos no Brasil (MACHADO *et al.*, 2004; SIMONETTI *et al.*, 2003). Neste estudo, foi encontrado entre os pacientes do **grupo A**, correspondente às crianças que não faziam uso de ARVs, apenas uma criança com a mutação T69N no gene da

transcriptase reversa, que confere resistência ao DDC e DDI (paciente11), esta criança em questão corresponde à única cuja mãe fez uso de tratamento com anti-retrovirais durante a gestação, o qual continha DDI. Outra mutação importante observada foi a mutação M46L (paciente 3) a qual está associada a uma possível resistência ao NFV e IDV, a mãe deste paciente não fez uso de quimioprofilaxia (ARVs), mas é a única mãe neste grupo cuja categoria de exposição é a de usuária de drogas injetáveis (nesta categoria de exposição a transmissão de cepas resistentes é mais comum) (BARRETO *et al.*, 2006). Algumas pesquisas relatam não encontrarem nenhuma diferença estatisticamente significativa na transmissão de cepas resistentes ao AZT de mãe para o filho (KULLY *et al.*, 1999; EASTMAN *et al.*, 1998; MOFENSON *et al.*, 2000; PALUMBO *et al.*, 2001). Entretanto, WELLES (2000) e outros (SIEGRIST *et al.*, 1994; FRENKEL *et al.*, 1995; COLGROVE *et al.*, 1998; JOHNSON *et al.*, 2001) relataram transmissão vertical de mutações relacionadas ao AZT. DESAI and MATHUR (2003) relatam a transmissão de cepa multiresistente à um recém-nascido à partir de uma mãe não aderente ao regime antiretroviral profilático durante a gestação.

A mutação K219Q foi encontrada no paciente 2, é uma TAM, contudo, sozinha não confere resistência às drogas da classe dos ITRNs. Outra mutação (G333E) no gene da TR foi encontrada em amostras de três crianças do Grupo A, porém esta mutação não se relaciona à resistência aos ITRN nem aos ITRNNs. Por outro lado, todas as 13 crianças deste grupo apresentaram mutações em códons acessórios (L63P, A71V, V77I, K20R, M46I, L10I, A71T) no gene da protease. Todavia, estas mutações são acessórias e não surgiram em número suficiente para conferir resistência aos IPs (BOSSI *et al.*, 1999). A mutação no códon L63P da protease encontrada em 6 crianças que não faziam uso de ARVs, foi relatada como sendo freqüente em vírus que nunca foram expostos a IPs (KOZAL *et al.*, 1996; PIENIAZEK *et al.*, 2000).

Porém, quando os resultados das genotipagens das amostras de HIV-1 obtidas das 31 crianças em uso de anti-retrovirais (**Grupo B**) foram analisados, foi encontrada uma alta incidência (93,5%) de mutações relacionadas à resistência aos ARVs (29 dos 31 pacientes), com uma freqüência variando de acordo com a classe das drogas (80,6% para os ITRNs, 38,7% para ITRNN e 54,8% para os IPs).

As mutações conhecidas como TAMs (mutações relacionadas aos timidínicos) representam um grupo de 6 mutações (M41L, D67N, K70N, L210W, T215Y/F e



K219Q/E/N) selecionadas no gene da TR pelo uso do AZT e/ou D4T. Estas mutações proporcionam redução da suscetibilidade, em grau variado, a todos ITRNs, com uma provável exceção ao 3TC (WAINBERG and WHITE, 2001). Neste estudo foi detectada a presença de TAMs em 25 das 31 crianças em uso de ARVs, ocorrendo simultaneamente em dois ou mais códons de resistência, sendo o suficiente para levar a resistência à esta classe de droga. As TAMs: D67N e a K20R foram as mais freqüentes seguida pela M41L. Doze crianças apresentaram a mutação M41L, a qual causa possível resistência ao AZT e D4T, e quando associada à mutação T215Y causa resistência ou possível resistência ao Abacavir (HIRSCH *et al.*, 2000), a presença destas três mutações ocorreu com muita freqüência neste grupo de estudo. Interessantemente, apesar destes pacientes terem sido exaustivamente tratados ao longo do tempo com DDI e D4T, foi encontrada uma baixa incidência de mutações em códons relacionados à resistência ao DDI (códons 65, 69 e 74) e ao D4T (códons 50 e 75), coincidindo com relatos de literatura (GOMEZ-CANO *et al.*, 1998; HOLGUIN *et al.*, 1998; SALOMON *et al.*, 1998; VIDAL *et al.*, 2002). Apenas três crianças (pacientes 16, 19 e 28) apresentaram a mutação V75M associada à resistência ao D4T (BLOOR *et al.*, 1998). A diminuição da sensibilidade a estas duas drogas (D4T e DDI) está provavelmente mais relacionada ao número de TAMs presentes, sendo maior em amostras com mais de três TAMs, como já observado anteriormente em outros estudos (MOURoux *et al.*, 2001; MAXEINER *et al.*, 2002). O fenômeno de resistência cruzada decorrente da alta freqüência das TAMs neste estudo pode explicar, também, a freqüência elevada de resistência ou possível resistência ao ABC (51,6%) e ao TDF (32,2%), drogas que nunca utilizadas por nenhum dos pacientes deste grupo. A mutação no códon 65 da transcriptase reversa (K65R) associada a um alto grau de resistência ao TDF foi detectada em apenas um paciente. Por outro lado, a mutação no códon 115, específica do Abacavir, não foi encontrada em nenhum dos 31 pacientes deste grupo.

A mutação M184V foi detectada em 14 crianças (45,2%) das 18 que recebiam 3TC, e tem sido associada a um alto nível de resistência ao 3TC (WAINBERG *et al.*, 1995). Todas as 14 crianças que apresentaram esta mutação estavam em uso ou haviam feito uso de 3TC em esquemas anteriores. Segundo MILLER *et al.* (2000) esta mutação pode também ser selecionada durante terapia com Abacavir e de acordo com WINTERS *et al.* (1997) menos comumente com DDI.

SVEDHEM (2002) em seu estudo mostrou que a M184V desaparecia em cerca de 64% dos pacientes que deixavam de usar 3TC, embora ela possa persistir nos reservatórios virais. Seis das 14 crianças que apresentaram a M184V também apresentaram a mutação T215Y/F (TAM que confere resistência aos ITRN), a presença destas duas mutações pode levar ao aparecimento do fenômeno da hipersuscetibilidade aos ARVs. Análises “in vitro” demonstraram que vírus que apresentavam simultaneamente estas duas mutações, T215Y/F e M184V, passavam a apresentar a mesma sensibilidade encontrada no vírus tipo selvagem à associação AZT+3TC. Para que ocorra resistência a associação AZT+3TC seria necessária outra mutação nos códons 208 ou 210 ou 211 ou 214 (TISDALE *et al.*, 1993; NIJHUIS *et al.*, 1997).

A mutação T69D foi detectada em 7 crianças, a qual provoca resistência ao DDC (FITZGIBBON *et al.*, 1992) e contribui para a resistência aos ITRNs quando ocorre concomitantemente com a presença das TAMs (WINTERS *et al.*, 2001).

Outras mutações associadas com resistência a drogas não utilizadas nos esquemas terapêuticos pelos pacientes do Grupo B no momento da realização do teste de genotipagem incluíam aquelas relacionadas aos ITRNs (K103N; pacientes 3, 11, 18, 24, 25 e 28), ao NFV (D30N; pacientes 2 e 10; e a L90M: pacientes 12, 16, 19, 24, 25, 27, 28 e 29). Nestes casos, estas mutações foram selecionadas durante tratamento com esquemas terapêuticos anteriores ao esquema no momento da execução da genotipagem e foram mantidas pela população viral circulante nos tratamentos subseqüentes (SVEDHEM *et al.*, 2002). Esta hipótese não pode ser aplicada no caso do paciente 2, o qual apresentou várias mutações de resistência aos IPs (L10R/V, K20m, L33F, M36I, D30N, G48V, V82F, N88T), classe de drogas a qual este paciente nunca foi exposto (paciente comprovadamente virgem de tratamento com IPs). Neste caso, uma explicação mais plausível poderia ser a da resistência primária, ou seja, cepas resistentes transmitidas verticalmente de mãe para filho (COLGROVE *et al.*, 1998, FRENKEL *et al.*, 1995, JOHNSON *et al.*, 2001).

Alguns casos de resistência a múltiplas drogas foram observados neste estudo. O paciente 18, com resistência às três classes de drogas, possui uma mutação de inserção no códon 69, este fenômeno pode ser decorrente da seleção imposta por qualquer ITRN, e leva a uma resistência de amplo espectro

atingindo a todos os ITRN e ao TDF (WINTERS *et al.*, 1998). Um outro exemplo de MDR (resistência a múltiplas drogas) é o caso do paciente 17, o qual apresentou a mutação Q151M associada a um grupo de mutações acessórias (no caso do paciente em questão: V75I, F77L, F116Y), o que leva a uma resistência a múltiplas drogas (SCHMIT *et al.*, 1998). A mutação K65R (atualmente considerada uma MDR), encontrada também no paciente 17, selecionada pelo DDI, ABC ou TDF, leva a uma resistência 2,5 a 10 vezes maior a todos os ITRN, exceção feita ao AZT (PARIKH *et al.*, 2004).

Dos sete pacientes do Grupo B (pacientes 1, 2, 4, 5, 17, 27 e 30) fazendo uso, no momento da realização da genotipagem, de esquema terapêutico contendo ITRNN, com exceção do paciente 27, todos os demais apresentavam mutações relacionadas aos ITRNNs, sendo a K103N a mutação mais freqüentemente encontrada. A resistência aos múltiplos ITRNNs tem sido associada a presença das mutações K103N ou Y188L, as quais podem individualmente reduzir significativamente a utilidade clínica de todas as drogas desta classe (SCHMIT *et al.*, 1996). Estas duas mutações foram encontradas simultaneamente em apenas um paciente, paciente 25, o qual já havia feito uso de ITRNN.

Um outro caso interessante é o do paciente 4, o qual se encontra há 3 anos em tratamento utilizando seu primeiro esquema terapêutico, contendo Nevirapina, e que não apresentou a K103N, mas sim a G109A, não tão freqüentemente encontrada, mas que está associada a um alto nível de resistência a Nevirapina (HUANG *et al.*, 2000). Ainda outro caso interessante é o do paciente 17, também em seu primeiro esquema de ARV a mais de vinte e dois meses, fazendo uso de Efavirenz. Este paciente apresentou a mutação no códon Y181C além das outras duas mutações importantes para resistência aos ITRNNs (K103N e G190A). Sabe-se que a Y181C está associada a uma perda da susceptibilidade do vírus a Nevirapina superior a 30 vezes e ao Efavirenz em até 3 vezes (PETROPOULOS *et al.*, 2000). As demais mutações como a A98G e a K101E apareceram com menos freqüência e sabe-se que estão associadas a um nível menor de resistência aos ITRNNs (HIRSCH *et al.*, 2000). Em resumo, foi observado a presença de uma ampla resistência cruzada proporcionada pelas mutações relacionadas aos ITRNNs no grupo de pacientes.

Mutações de resistência na região codificadora da protease foram detectadas em 20 crianças do **grupo B**. dezenove dentre estas 20 crianças faziam uso

corrente de IP ou já haviam utilizado algum esquema terapêutico contendo IP (com exceção do paciente 2 já citado anteriormente). Por outro lado, cinco pacientes do Grupo B em uso de IP e não apresentaram mutações de resistência. Dentre os 19 pacientes do Grupo B recebendo IP, as principais mutações associadas à resistência aos IPs encontradas em maior frequência foram: V82A (10/19), L90M (10/19), D30N (4/19) e a M46I (5/19). As demais mutações encontradas que contribuem para causar resistência foram: I54V (11/19), M46L (3/19), N88D (2/19), N88T (1/19), I84V (1/19) e I50V (1/19). Mutações nos códons 10, 20, 36, 63, 71 e 77 observadas neste grupo estudado, podem contribuir para resistência a essa classe de drogas quando presente concomitantemente com outras mutações no gene da protease e ainda promovem melhora no fitness viral (NIJHUIS *et al.*, 1999).

A seleção das mutações D30N e L90M pelo Nelfinavir, são exemplo de “vias mutacionais” distintas, ou seja, a partir da pressão seletiva do NFV, o vírus pode vir a desenvolver uma destas duas mutações. Estas duas vias mutacionais têm relevância clínica, devido ao fato de uma delas levar ao aparecimento de resistência cruzada (L90M) e outra não (D30N). Quando a mutação D30N é a selecionada torna-se possível resgate da suscetibilidade com o uso de um outro IP. Por outro lado, caso a mutação L90M seja a selecionada, o resgate torna-se difícil, uma vez que este códon de resistência é comum a todos os inibidores de protease. A mutação L90M encontrada em dez crianças neste estudo foi relatada anteriormente em isolados de pacientes recebendo SQV, NFV, IDV e RTV, agindo como mutação primária para o SQV e NFV e como mutação secundária para o IDV, RTV, LPV e APV (DRONDA *et al.*, 2001). Já a mutação D30N selecionada pelo uso do NFV e não confere resistência cruzada aos demais IPs (ZOLOPA *et al.*, 1999). Resistência cruzada provocada pela presença da mutação D30N para IDV, RTV e SQV tem sido descrita em isolados apresentando esta mutação associada a mutações nos códons 88 e 90 (PARKIN *et al.*, 2001). Novamente, com exceção do paciente 2, todos os demais pacientes que apresentaram a mutação D30N estavam em uso ou já haviam usado o NFV. Alguns autores sugerem uma possível associação entre subtipos do HIV e seleção da via mutacional, quando o vírus submetido à pressão seletiva do NFV não for do subtipo B, a via mutacional preferencialmente utilizada é a do códon 90, conseqüentemente a mais problemática para o resgate (CLOTET *et al.*, 2002; GROSSMAN *et al.*, 2004; SUGIURA *et al.*, 2002).

A presença de mutação no códon 46 do gene da protease, observada em oito crianças neste estudo e comumente relatada em pacientes tratados com IDV, RTV, APV e NFV (CONDRA *et al.*, 2000) tem sido associada com resistência a praticamente todos os IPs, com uma possível exceção para ao SQV. A mutação V82A observada em 10 dos 31 pacientes do Grupo B tem sido descrita predominantemente em pacientes recebendo tratamento com IDV ou RTV (CONDRA *et al.*, 1996; MOLLA *et al.*, 1996). Mutações no códon 82 da protease estão associadas a uma redução na susceptibilidade ao IDV, RTV e LPV, mas não ao NFV, SQV ou APV (KEMPF *et al.*, 2001). Entretanto, quando acompanhada por outras mutações no gene da protease, ela contribui significativamente para uma resistência clínica aos demais IPs. A I54V foi a mutação encontrada em maior frequência (11 de 31 pacientes) no gene da protease durante este estudo que sabidamente contribui para resistência aos IPs. Essa mutação tem sido comumente observada em pacientes recebendo terapia anti-retroviral contendo IDV, RTV, APV, SQV e LPV (CONDRA *et al.*, 2000). Duas crianças apresentaram a mutação N88D, comumente encontrada em pacientes recebendo terapia com NFV e ocasionalmente com IDV (PATICK *et al.*, 1998), ambas já haviam feito uso de NFV, e atualmente faziam uso de LPV. A maioria das mutações secundárias para os IPs tendem a persistir após a nova terapia, uma notável exceção ocorre com a N88D (BIRK *et al.*, 2001), provavelmente por isso ela foi tão pouco freqüente em nosso estudo.

Resistência ao Lopinavir foi encontrada em 7 dos 19 pacientes recebendo IPs (36,84%), os quais apresentaram mais de oito mutações associadas à resistência a esta droga. Este fato demonstra a limitação de uma droga com grande potencial terapêutico e relativamente nova em nosso meio frente às mutações no genoma do HIV.

Cinco das 31 crianças se encontravam em seu primeiro esquema de tratamento com ARVs, sendo estes esquemas composto por apenas 2 ITRNs, ou seja terapia dupla, mesmo assim os isolados destas crianças apresentaram as mutações M36I, L63P, A71V e V77I nos códons da protease, apesar de nenhuma delas estar associada a resistência aos IPs. Paralelamente, foi encontrada duas crianças em uso de esquema triplo (incluindo LPV) com falha virológica (pacientes 20 e 26) e falha imunológica (paciente 20), nas quais não foram detectadas nenhuma mutação que conferisse resistência a quaisquer das

três classes de droga. Neste caso uma das suspeitas que deve sempre ser considerada é a de má adesão do paciente ao esquema ARV utilizado naquele momento. A suspensão do tratamento, mesmo que por curtos períodos de tempo, poderia propiciar uma perda da sensibilidade na detecção dos mutantes com resistência, fenômeno conhecido como falsa reversão. A ausência da droga possibilita a reemergência do vírus do tipo selvagem, o qual replica mais eficazmente nessas condições por apresentar um “fitness” viral mais favorável do que os vírus com mutações (HANCE *et al.*, 2001). Entretanto, a emergência do vírus do tipo selvagem raramente elimina o vírus mutante dos reservatórios celulares. No momento da reintrodução da droga, vírus mutantes resistentes podem ser selecionados rapidamente levando a uma nova falha terapêutica (CONDRA and EMINI, 1997). Uma adesão muito baixa ao tratamento também pode fazer com que ocorram seleção de mutações de resistência na população viral do paciente. A maior chance de seleção de mutações de resistência ocorre quando o paciente utiliza um esquema ARV parcialmente eficaz, uma vez que o uso de esquemas terapêuticos altamente eficazes ou sem eficácia, ambos exercem uma baixa pressão seletiva para mutações de resistência (KEMPF *et al.*, 2001). É importante recordar que a não detecção de mutações relacionadas à resistência a determinada classe de drogas nem sempre se correlaciona a uma boa resposta terapêutica a classe de droga em questão, uma vez que de acordo com SCHUURMAN (1999) a genotipagem possui um valor preditivo negativo baixo. Resumindo, nos casos dos dois pacientes (20 e 26), apesar de menos freqüente, a presença de resistência celular deve ser considerada após excluir a possibilidade da não-adesão do paciente ao esquema terapêutico (KIM *et al.*, 1998; LEE *et al.*, 1998).

Neste estudo apenas nove crianças estavam em seu primeiro esquema de tratamento com ARVs, quando da realização do teste de genotipagem, 15 se encontravam em uso de seu 3º ou mais esquemas de drogas. Conseqüentemente, o esquema utilizado nestas 15(48,3%) crianças incluía dois ou mais ITRN já usados anteriormente. Muitas destas crianças já haviam feito uso de monoterapia com AZT (pacientes 1, 12 e 25) e esquemas duplos (pacientes: 7, 9, 10, 11, 14, 16, 19, 22, 24, 27, 28 e 29). Estes fatos podem explicar o porquê da dificuldade de supressão da replicação viral e a conseqüente falha no tratamento desta população. Observamos neste estudo, a conseqüência de regimes seqüenciais não-potentes, levando a uma resposta

aquém da desejada quando esquemas mais potentes passaram a ser adotados subseqüentemente.

Estes resultados confirmam a relação entre falha terapêutica e resistência genotípica em crianças, como observada anteriormente em outros estudos (BRINDEIRO *et al.*, 2002; MACHADO *et al.*, 2005, SIMONETTI *et al.*, 2003; ESHLEMAN *et al.*, 2001; MULLEN *et al.*, 2002), e também em adultos (BACHELER *et al.*, 2000; STASZEWSKI *et al.*, 1999; TANURI *et al.*, 2002; COUTO-FERNANDEZ *et al.*, 2005). Os dados aqui apresentados contribuem para enfatizar a importância de se considerar o momento apropriado para o início da terapia com ARVs, bem como a escolha mais adequada da combinação de ARVs que leve à supressão da replicação viral de forma efetiva, sem deixar de considerar a importância da adesão ao esquema terapêutico por parte dos responsáveis legais por estas crianças. Isto é especialmente importante em pacientes pediátricos, pois crianças exibem freqüentemente carga viral mais elevada quando comparada com adultos (DICKOVER *et al.*, 1994; SHEARER *et al.*, 1997). A supressão da replicação viral quando feita através da utilização de esquema terapêutico de baixa potência além de não ser efetiva normalmente leva a uma diminuição na eficácia dos ARVs utilizados subseqüentemente. Crianças mantidas em regime de ARVs não-supressivo apresentam uma maior probabilidade do desenvolvimento de mutações secundárias, e conseqüentemente um maior risco do aparecimento de resistência cruzada e de falência terapêutica (SORIANO, 2001). GÜNTARD (1998) mostrou em seu trabalho que em pacientes em uso de ARVs com carga viral abaixo de 50 cópias/ml por ano, nenhuma mutação de resistência foi identificada, mesmo quando a replicação persistia nos reservatórios.

Neste estudo foi observado que, embora algumas crianças apresentassem carga viral elevada e mutantes virais resistentes à terapia usada no momento da genotipagem, o número de linfócitos T CD4<sup>+</sup> estava dentro dos limites normais para alguns pacientes pediátricos da mesma faixa etária. Estes dados coincidem com observações de outros autores, os quais relataram um benefício imunológico contínuo do tratamento com anti-retrovirais apesar da presença de mutantes resistentes e/ou falha virológica (JANKELEVICK *et al.*, 2001; CHIAPPINI *et al.*, 2003; MACHADO *et al.*, 2005). Esta observação poderia ser explicada por uma diminuição na capacidade replicativa do vírus devido à aquisição de mutações. Tal prejuízo na capacidade replicativa do vírus tem sido

correlacionado com a persistência de uma resposta imune celular em pacientes com discordância viral-imunológica (carga viral elevada na presença de um número de células T CD4 dentro dos limites normais) (SARMATI *et al.*, 2004). A frequência desta restauração imunológica continua não compreendida totalmente, de acordo com BELEC (2000) falhas virológicas são três vezes mais frequentes em crianças do que em adultos. Segundo KAUFMANN (2002) este alto potencial de restauração imune, na presença de falha virológica, pode ser devido a uma maior atividade do timo na tentativa de suprir o “deficit” de linfócitos T “naïve” e aumentar o número de linfócitos T CD4+ circulantes, apesar de mantida a replicação HIV-1.

A distribuição dos subtipos encontradas neste estudo foi do subtipo B predominante (40,9%), seguido do subtipo F (22,7%). Esta prevalência foi similar à população de adultos no estado do Rio de Janeiro (PIRES *et al.*, 2004; BRINDEIRO *et al.*, 2003; DUMANS *et al.*, 2002), com predomínio do subtipo B acompanhado pelo subtipo F. As formas recombinantes de subtipo B em uma região (B/F e F/B) apareceram em 31,7% dos pacientes. Diferenças na evolução da doença ou na resposta à terapia ARV entre os diferentes subtipos de HIV-1 ainda não estão bem compreendidos. Alguns estudos direcionados em diferentes subtipos têm falhado em mostrar diferença na resposta virológica após tratamento ou prevalência de mutações de resistência em pacientes falhados (PILLAY *et al.*, 2002; KANTOR e KATZENSTEIN, 2004). Também, a mutação L90M ocorre mais frequente em subtipos não-B em adultos, mas neste estudo esta diferença não foi notada e em alguns estudos em crianças infectadas pelo HIV-1 (PILLAY *et al.*, 2002). O subtipo B e F foi o mais prevalente nos dois grupos de crianças, sendo que o subtipo C foi encontrado em apenas duas crianças do grupo B.





## 6. CONCLUSÕES

Os dados aqui apresentados descrevem pela primeira vez a prevalência de mutações no genoma do HIV em amostras de isolados virais provenientes de grupos de crianças portadoras de infecção pelo HIV-1 em uso ou não de terapia anti-retroviral oriundos do estado do Espírito Santo. Como esperado, a prevalência e o nível de mutações de resistência às drogas foram mais significativas no grupo recebendo terapia com ARVs, corroborando com o conceito de ação da pressão seletiva mediada pelos ARVs na emergência de cepas virais resistentes.

Foi observado no grupo das crianças não-tratadas (**Grupo A**), a quase total ausência de mutações de resistência primária para os ARVs. A maioria destas crianças foi o caso-índice de suas famílias, isto sugere que a transmissão vertical ocorreu de mães que não tinham consciência do seu status sorológico e conseqüentemente não faziam uso de anti-retrovirais (com exceção de uma). Justificando, portanto, o maior número de polimorfismos virais, alterações genéticas presentes nos vírus na ausência de pressão seletiva dos anti-

retrovirais e não relacionadas à resistência encontrada em pacientes deste Grupo. O reduzido número de pacientes neste grupo, associado a uma baixa frequência de mutações e ao fato de quase todas as mães serem virgem de tratamento com ARVs levou a limitações significantes na avaliação de transmissão de cepas de resistentes mãe para filho. Mesmo assim, vigilância constante acerca de transmissão vertical de cepas resistentes aos ARVs devem ser asseguradas.

No **Grupo B** foi observado que o acúmulo de mutações de resistência foi diretamente proporcional à carga viral (quanto maior a carga viral, maior o número de mutações). A impossibilidade de suprimir a replicação viral conduz quase que invariavelmente à seleção de variantes resistentes às drogas. Esta impossibilidade pode ocorrer por vários motivos: 1) má aderência das crianças à terapêutica (com terapêutica irregular ou auto-suspensões); 2) toxicidade das drogas que obrigam à suspensão; 3) potência limitada do regime terapêutico escolhido; 4) má absorção entérica; 5) interações medicamentosas conduzindo à redução dos níveis plasmáticos das drogas; 6) déficit da fosforilação intracelular necessária para transformar alguns fármacos como o AZT e D4T em sua forma ativa; 7) mecanismos da membrana celular que retiram os fármacos da célula, impedindo o seu acesso ao vírus, como o mecanismo da glicoproteína P ou das MRPs (Multidrug Resistant Proteins), particularmente importantes no caso de alguns IPs.

Neste estudo, o Grupo B abrigou um grande número de crianças em tratamento com ARVs por mais de 7 anos, sendo que algumas estavam sendo acompanhadas desde a fase da monoterapia com AZT, passando pela terapia dupla e se encontrando atualmente em seu 2º, 3º ou até mesmo 4º esquema de HAART. Estes fatos podem explicar a dificuldade para se atingir uma supressão da replicação viral observada para os pacientes do grupo B, levando conseqüentemente a uma falha no tratamento desta população. Foi observado ainda a conseqüência de regimes seqüenciais não-potentes, levando a uma resposta aquém da desejada e a seleção de mutantes virais resistentes aos ARVs. Impactando diretamente no sucesso dos esquemas terapêuticas subseqüentes.

Os dados aqui apresentados contribuem para enfatizar a importância da definição do momento ideal para o início da terapia com ARVs, bem como a

escolha da combinação de ARVs mais adequada e que leve à supressão da replicação viral de forma efetiva, sem menosprezar a importância da adesão ao esquema terapêutico por parte dos responsáveis legais por estas crianças.

## **7. REFERÊNCIAS**

ACCETTURI, C.A.; PARDINI, R.; PINTO, G.H.N.; TURCANO, G.; LEWI, D.S. DIAZ, R.S. –Effects of CCR5 genetic polymorphism and HIV-1 subtype in antiretroviral response in Brazilian HIV-1 infected patients. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology**, **24(4)**: 399-400, 2000.

ALAEUS, A. -Significance of HIV-1 genetic subtypes. **Scand. J. Infect. Dis.**, **32(5)**: 455-463, 2000.

ALDOVINI, A.; YOUNG, R.A. -Mutations of RNA and proteins sequences involved in human immunodeficiency virus type 1 packing results in production of noninfectious virus. **J. Virol.**, **64**: 1920-1926, 1990.

AMADORI, A. and CHIECO-BIANCHI, L. –B-cell activation and HIV-1 infection: deeds and misdeeds. **Immunol. Today**, **11**: 374-379, 1990.

ASKEW, I. and BERER, M. –The contribution of sexual and reproductive health services to the fight against HIV/AIDS: a review. **Report Health Matters**, **11(22)**: 51-73, 2003.

BACHELER, L.T.; ANTON, E.D.; KUDISH, P. *et al.* – Human immunodeficiency virus type 1 mutations selected in patients failing efavirenz combination therapy. **Antimicrob. Agentes Chemother.**, **44**: 2475-2484, 2000.

BAZMI, H.Z.; HAMMOND, J.L.; CAVALCANTI, S.C.; CHU, C.K.; SCHINAZI, R.F.; MELLORS, J.W. - In vitro selection of mutations in the human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase that decrease susceptibility to (-)-beta-D-dioxolane-guanosine and suppress resistance to 3'-azido-3'-deoxythymidine. **Antimicrob Agents Chemother**, **44(7)**: 1783-1788, 2000.

BARBOUR, J.D.; HECHT, F.M.; WRIN, T.; LIEGLER, T.J.; RAMSTEAD, C.A.; BUSCH, M.P.; SEGALI, M.R.; PETROPOULOS, C.J.; GRANT, R.M. -Persistence of primary drug resistance among recently HIV-1 infected adults. **AIDS**, **18(12)**:1683-1689, 2004.

- BARRÉ-SINOUSI, F.; CHERMANN, J.C.; REY, F. *et al.* Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). **Science**, **220**: 868-871, 1983.
- BARRETO, C.C.; NISHYIA, A.; ARAÚJO, L.V.; FERREIRA, J.E.; BUSCH, M.P. and SABINO, E.C. –Trends in Antiretroviral Drug Resistance and Clade Distributions Among HIV-Infected Blood Donors in São Paulo, Brasil. **J. Acquir. Immune. Defic Syndr.** **41(3)**: 338-340, 2006.
- BAXTER, J.D.; MAYERS, D.L. WENTWORTH, D.N.; NEATON, J.D.; HOOVER, M.L.; WINTERS, M.A.; MANNHEIMER, S.B.; THOMPSON, M.A.; ABRAMS, D.I.; BRIZZ, B.J.; IOANNIDIS, J.P.; MERIGAN, T.C. – A randomized study of antiretroviral resistance testing in patients failing therapy. CPCRA 046 Study Team for the Terry Bein Community Programs for Clinical Research on AIDS. **AIDS**, **14(9)**: 83-93, 2000.
- BEAN, P.; PATNAIK, M.; GRAZIANO, F.M.; Aziz, D. -Therapeutic drug monitoring of antiretroviral agents. **Am. Clin. Lab.**, **19**: 20-22, 2000.
- BELEC, L.; PIKETTY, C.; SI-MOHAMED, A.; GOUJON, C.; HALLOIN, M.C. COTIGNY, S.; WEISS, L.; KAZATCHKINE, M.D. – High levels of drug-resistant human immunodeficiency virus variants in patients exhibiting increasing CD4+ T cell counts despite virological failure of protease inhibitor-containing antiretroviral combination therapy. **J. Infect Dis**, **181**: 1808-1812, 2000.
- BERTOLI, J. *et al.* –Estimating the timing of mother-to-child transmission of human immunodeficiency virus in a breastfeeding cohort in Kinshasa, Zaire. **J. Infect. Dis.**, **174**:722-726, 1996.
- BIRK, M.; SVEDHEM, V.; SONNERBORG, A. –Kinetics of HIV-1 RNA and resistance-associated mutations after cessation of antiretroviral combination therapy. **AIDS**, **15**: 1359-1368, 2001.

- BLOOR, S.; HERTOGS, K.; LARDER, B.; PAUWELS, R.; LARDER, B.A. –  
Virological basis for HIV-1 resistance to stavudine investigated by analysis of  
clinical samples (abstract 15). **Antivir. Ther.**, **3(1)**: 15-16, 1998.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Guia de tratamento clínico da infecção pelo HIV em  
crianças 2004. 2. ed. Brasília: Ed. MS, 2004.
- BOBAT, R. et al. Breastfeeding by HIV-1 infected women and outcome in their infants:  
a cohort study from Durban, South Africa. **AIDS**, **11(13)**: 1627-1633, 1997.
- BOSSI, P.; MOUROUX, M.; YVON, A.; BRICAIRE, F.; AGUT, H.; HURAUX, J.M.;  
KATLAMA, C.; CALVEZ, V. –Polymorphism of the Human Immunodeficiency Virus  
Type-1-Infected Patients to a Protease Inhibitor. **J. Clin. Microbiol.**, **37(9)**: 2910-  
2912, 1999.
- Brazilian Network for the HIV-1 Isolation and Characterization (BONGERTZ, V.; BOU-  
HABIB, D.C.; BRÍGIDO, L.F.M.; CASEIRO, M.; CHEQUER, P.J.N.; COUTO-  
FERNANDEZ, J.C.; FERREIRA, P.C.; GALVÃO-CASTRO, B.; GRECO, D.;  
GUIMARÃES, M.L.; LINHARES DE CARVALHO, M.I.; MORGADO, M.G.;  
OLIVEIRA, C.A.F.; OSMANOV, S.; RAMOS, C.A.; ROSSINI, M.; SABINO, E.;  
TANURI, A.; UEDA, M.) : HIV-1 diversity in Brazil: genetic, biologic and immunologic  
characterization of HIV-1 strains in three potential HIV vaccine evaluation sites. **J.  
Acquir. Immune Defic. Syndr.**, **23**: 184-193, 2000.
- BRENNER, B.G.; ROUTY, J.P.; PETRELLA, M.; MOISI, D.; OLIVEIRA, M.; DETORIO,  
M.; SPIRA, B.; ESSABAG, V.; CONWAY, B.; LALONDE, R.; SEKALY, R.P.;  
WAINBER, M.A. -Persistence and fitness of multidrug-resistant human  
immunodeficiency virus type 1 acquired in primary infection. **J. Virol.**, **76**: 1753-  
1761, 2002.
- BRENNER, B.; ROUTY J.P.; QUAN, Y. et al. –Persistence of multidrug-resistant HIV-1  
in primary infection leading to superinfection. **AIDS**, **18**: 1653-1660, 2004.
- BRINDEIRO, P.A.; BRINDEIRO, R.M.; MORTENSN, C.; HERTOGS, K.; DE VROEY,  
V.; RUBINI, N.P.M.; SION, F.S.; DE SÁ, C.A.M.; MACHADO, D.M.; SUCCI, R.C.M.



- and TANURI, A. –Testing Genotypic and Phenotypic Resistance in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Isolates of Clade B and Other Clades from Children Failing Antiretroviral Therapy. **J. of Clinical Microbiology**, **40(12)**: 4512-4519, 2002.
- BRINDEIRO, R.; VANDERBORGHT, B.; CARIDE, E.; CORREA, L.; ORAVEC, R.M.; BERRO, O.; STUYVER, L.; TANURI, A. -Sequence diversity of the reverse transcriptase of human immunodeficiency virus type 1 from untreated Brazilian individuals. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** **43(7)**: 1674-1680, 1999.
- BRINDEIRO, R.M.; DIAZ, R.S.; SABINO, E.C.; MORGADO, M.G.; PIRES, I.L.; BRIGIDO, L.; DANTAS, M.C.; BARREIRA, D.; TEIXEIRA, P.R.; TANURI, A., and the Brazilian network for Drug Resistance Surveillance. –Brazilian Network for HIV Drug Resistance Surveillance (HIV-BresNet): results from the first national survey. **AIDS**, **17(7)**: 1063-1069, 2003.
- BRODINE, S.K., MADCOLA, J.R.; WEISS, P.J., ITO, S.I., PORTER, K.R.; ARTENSTEIN, A.W.; GARLAND, F.C.; McCUTCHAN, F.E.; BURKE, D.S.- Detection of diverse HIV-1 genetic subtypes in the USA. **Lancet**, **346(8984)**: 1198-1199, 1995.
- BURTON, G.J. et al. –Physical breaks in the placental trophoblastic surface: significance in vertical transmission of HIV. **AIDS**, **10(11)**: 1294-1295, 1996.
- BUSCH, M.P. –Testing blood donors for HIV: current controversies. **Immunol. Invest.**, **24(1-2)**: 147-154, 1995.
- CARIDE, E.; BRINDEIRO, R.; HERTOOGS, K.; LARDER, B.; DEHERTOGH, P.; MACHADO, E.; DE SA, C.A.; EYER-SILVA, W.A.; SION, F.S.; PASSIONI, L.F.; MENEZES, J.A.; CALAZANS, A.R.; TANURI, A. -Drug-resistant reverse transcriptase genotyping and phenotyping of B and non-B subtypes (F and A) of human immunodeficiency virus type I found in Brazilian patients failing HAART. **Virology**. **275(1)**:107-115, 2000.

CASTRO, K.G.; WARD, J.W.; SLUTSKER, L. ET AL. –Revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for Aids among adolescents and adults. **Morbid Mortal Weekly Rep**, **41**: 1-19, 1992.

Centers for Disease Control and Prevention. - *Pneumocystis pneumonia* – Los Angeles. **MMWR**, **30**: 250-252, 1981a.

Centers for Disease Control and Prevention. - Kaposi's sarcoma and *Pneumocystis pneumonia* among homosexual men New York City and California. **MMWR**, **30**: 305-308, 1981b.

CHEN Z. *et al.* –Human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) seroprevalence and characterization of a distinct HIV-2 genetic subtype from the natural range of SIV infected sooty mangabeys. **J. Virol.**, **71**: 3953-3960, 1997.

CHIAPPINI, E.; GALLI, L.; ZAZZI, M. and DE MARTINO, M. -Immunological recovery despite virological failure is independent of human immunodeficiency virus-type 1 resistance mutants in children receiving highly active antiretroviral therapy. **J. Med. Virol.**, **70**: 506-512, 2003.

CLAVEL, F.; GUETARD, D.; BRUN-VEZINET, F.B. et al. –Isolation of a new human retrovirus from west african patients with Aids. **Science**, **233**: 343-347, 1986.

CLOTET, B.; RUIZ, L.; MARTINEZ-PICADO, J.; NEGREDO, E.; HILL, A.; POPESCU, M. – Prevalence of HIV protease mutations on failure of nelfinavir-containing HAART: a retrospective analysis of four clinical studies and two observational cohorts. **HIV Clin. Trials.**, **3(4)**: 316-323, 2002.

COFFIN, J.; HAASE, A., LEVY, J.A.; MONTAGNIER, L.; OROSZZLAN, S.; TEICH, N.; TEMIN, H.; TOYOSHIMA, K.; VARMUS, H.; VOGT, P.; WEISS, R.; -What to call the AIDS virus? **Nature** **321(6065)** : 10, 1986.

COLGROVE, R.C.; PITT, J.; CHUNG, P.H.; WELLES, S.L.; JAPOUR, A.J. -Selective vertical transmission of HIV-1 antiretroviral resistance mutations. **Aids**. **12**: 2281-2288, 1998.

- COLL, O. et al. Vertical HIV-1 transmission correlated with a high maternal viral load at delivery. **J. Acquir. Immune Defic. Hum. Retrovirol.**, **14**: 26-30, 1997.
- COLONNO, R.J.; THIRY, A.; LIMOLI, K.; PARKIN, N. - Activities of atazanavir (BMS-232632) against a large panel of human immunodeficiency virus type 1 clinical isolates resistant to one or more approved protease inhibitors. **Antimicrob Agents Chemother**, **47(4)**: 1324-1333, 2003.
- CONDRA, J.H. and EMINI, E.A. -Preventing HIV Drug Resistance. **Sci Med.**, **4**: 14-23, 1997.
- CONDRA, J.H.; PETROPOULOS, C.J.; ZIERMANN, R.; SCHLEIF, W.A.; SHIVAPRAKASH, M.; EMINI, E.A. -Drug resistance and predicted virologic responses to human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitor therapy. **J. Infect. Dis.**, **182**: 758-765, 2000.
- CONDRA, J.H.; HOLDER, D.J.; SCHLEIF, W.A.; BLAHY, O.M.; DANOVICH, R.M.; GABRYELSKI, L.J.; GRAHAM, D.J.; LAIRD, D.; QUINTERO, J.C.; RHODES, A.; ROBBINS, H.L.; ROTH, E.; SCHIVAPRAKASH, M.; YANG, T.; CHODAKEWITZ, J.A.; DEUTSCH, P.J.; LEAVITT, R.Y.; MASSARI, F.E.; MELLORS, J.W.; SQUIRES, K.E.; STEIGBIGEL, R.T.; TEPPLER, H.; EMINI, E.A. -Genetic correlates of in vivo viral resistance to indinavir, a human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitor. **J. Virol.**, **70(12)**: 8270-8276, 1996.
- CONNOR, E.M.; SPERLING, R.S.; GELDER, R. ET AL. -Reduction of maternal-infant transmission of HIV-1 with zidovudine treatment. **Obstet Gynecol Surv** **50(4)**: 253, 1995.
- CORNELISSEN, M.; KEMPINGA, G.; ZORGDRAGER, F. and GOUDSMIT, J. -Human Immunodeficiency virus type 1 subtypes defined by env show high frequency of recombinant gag genes. The UNAIDS Network for HIV Isolation and Characterization. **J. Virol.**, **70**: 8209-8212, 1996.

- COUTO-FERANDEZ, J.C.; MORGADO, M.G.; BONGERTZ, V.; TANURI, A.; ANDRADE, T.; BRITES, C.; GALVÃO-CASTRO, B. -HIV-1 subtyping in Salvador, Bahia, Brazil: a city with African sociodemographic characteristics. **J. Acquir. Immune. Defic. Syndr.** **22**: 288-293, 1999.
- COUTO-FERNANDEZ, J.C.; SILVA-DE-JESUS, C.; VELOSO, V.G.; RACHID, M.; GRACIE, R.S.; CHEQUER-FERNANDEZ, S.L.; OLIVEIRA, S.M.; ARAKAKI-SANCHEZ, D.; CHEQUER P.J.; MORGADO, M.G. -Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) genotyping in Rio de Janeiro, Brazil: assessing subtype and drug-resistance associated mutations in HIV-1 infected individuals failing highly active antiretroviral therapy. **Mem Inst Oswaldo Cruz** **100**: 73-78, 2005.
- CUNNINGHAM, S.; ANK, B.; LEWIS, D.; LU, W.; WANTMAN, M.; DILEANIS, J.; JACKSON, J.B.; PALUMBO, P.; KROGSTAD, P.; ESHLEMAN, S.H. -Performance of the Applied Biosystems ViroSeq Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) Genotyping System for Sequence-Based Analysis of HIV-1 in Pediatric Plasma Samples. **J. Clin. Microbiol.**, **39(4)**: 1254-1257, 2001.
- D'ARMINIO, M.A.; LEPRI, A.C.; REZZA, G.; PEZZOTTI, P.; ANTINORI, A.; PHILLIPS, A.N.; ANGARANO, G.; COLANGELI, V.; DE LUCA, A.; IPPOLITO, G.; CAGGESE, L.; SOSCIA, F.; FILICE, G.; GRITTI, F.; NARCISO,P.; TIRELLI, U.; MORONI, M. – Insights into the reasons for discontinuation of the first highly active antiretroviral therapy (HAART) regimen in a cohort of antiretroviral naive patients. I. CO. N.A. Study group Italian Cohort of Antiretroviral-Naïve Patients. **AIDS**, **14(5)**: 499-507, 2000.
- DELAUGERRE, C.; MORAND-JOUBERT, L.; CHAIX, M.L.; PICARD, O.; MARCELIN, A.G.; SCHNEIDER, V.; KRIVINE, A.; COMPAGNUCCI, A.; KATLAMA, C.; GIRARD, P.M.; CALVEZ, V. -Persistence of multidrug-resistant HIV-1 without antiretroviral treatment 2 years after sexual transmission. **Antivir Ther**, **(3)**: 415-421, 2004.
- DESAI, N. and MATHUR, M. – Selective transmission of multidrug resistant HIV to a newborn related to poor maternal adherence. **Sex. Transm. Inf.**, **79**: 419-421, 2003.

- DESCAMPS, D.; COLLIN, G.; LETOURNEUR, F.; APETREI, C.; DAMOND, F.; LOUSSERT-AJAKA, I.; SIMON, F.; SARAGOSTI, S.; and BRUN-VEZINET, F. – Susceptibility of human immunodeficiency virus type 1 group O isolates to antiretroviral agents: in vitro phenotypic and genotypic analyses. **J. Virol.**, **71**: 8893-8898, 1997.
- DETTIN, M.; FERRANTI, P.; SCARINCI, C.; PICARIELLO, G.; DI BELLO, C. – Is the V3 loop involved in HIV binding to CD4? **Biochemistry**, **5;42(30)**: 9007-9012, 2003.
- DICKOVER, R.E.; DILLON, M.; GILLETTE, S.G. et al. – Rapid increases in load of human immunodeficiency virus correlate with early disease progression and loss of CD4 cells in vertically infected infants. **J. Infect. Dis.**, **170**: 1279-1284, 1994.
- DRONDA, F.; CASADO, J.L.; MORENO, S.; HERTOGS, K.; GARCIA-ARATA, I.; ANTELA, A.; PEREZ-ELIAS, M.J.; RUIZ, L.; LARDER, B., the NELSANE Study. – Phenotypic cross-resistance to nelfinavir: the role of prior antiretroviral therapy and the number of mutations in the protease gene. **AIDS Res. Hum. Retroviruses**, **17**: 211-215, 2001.
- DURANT, J.; CLEVENBERGH, P.; HALFON, P.; DELGIUDICE, P.; PORSIN, S.; SIMONET, P.; MONTAGNE, N.; BOUCHER, C.A.; SCHAPIRO, J.M.; DELLAMONICA, P.; -Drug-resistance genotyping in HIV-1 therapy: the VIRADAPT randomized controlled trial. **The Lancet** **353**: 2195-2199, 1999.
- DUMANS, A.T.; SOARES, M.A.; PIENIAZEK, D.; KALISH, M.L.; DE VROEY, V.; HERTOGS, K. and TANURI, A. –Prevalence of protease and reverse transcriptase drug resistance mutations over time in drug-naïve human immunodeficiency virus type 1-positive individuals in Rio de Janeiro, Brazil. **Antimicrob. Agents Chemother.**, **46**: 3075-3079, 2002.
- DUMANS, A.T.; SOARES, M.A.; MACHADO, E.S.; HUÉ, S.; BRINDEIRO, R.M.; PILLAY, D. and TANURI, A. –Synonymous genetic polymorphisms within Brazilian HIV-1 subtypes may influence mutational routes to drug resistance. **J. Infec. Dis.**, **189**: 1232-1238, 2004.

- DUNN, D.T. et al. –Risk of human immunodeficiency virus type 1 transmission trough breastfeeding. **Lancet**, **340**: 585-588, 1992.
- EASTMAN, P.S.; SHAPIRO, D.E.; COOMBS, R.W. et al. – Maternal viral genotypic Zidovudine resistance and infrequent failure of Zidovudine therapy to prevent perinatal transmission of human immunodeficiency virus type 1 in pediatric AIDS Clinical Trials Group protocol 076. **J Infect Dis**, **177**: 557-564, 1998.
- ESHLEMAN, S.H.; KROGSTD, P.; JACKSON, J.B. *et al.* – Analysis of human immunodeficiency virus type 1 drug resistance in children receiving nucleoside analogue reverse-transcriptase inhibitors plus nevirapine, nelfinavir, or ritonavir (Pediatric AIDS Clinical Trials Goup 377). **J. Infect. Dis.**, **183**: 1732-1738, 2001.
- ESPÍRITO SANTO. Secretaria de Estado da Saúde. **Boletim epidemiológico DST/Aids - Espírito Santo. nº 10**, semana epidemiológica até 34, ago./2005.
- FITZGIBBON, J.E.; HOWELL, R.M.; HABERZETTL, C.A.; SPERBER, S.J.; GROCKE, D.J.; DUBIN, D.T. –Human Immunodeficiency vírus type 1 *pol* gene mutations which cause decreased susceptibility to 2', 3'-dideoxycytidine . **Antimicrob. Agents Chemother.**, **36**: 153-157, 1992.
- FRANKEL, A.D.; YOUNG, J.Á. -HIV-1: fitteen proteins and an RNA. **Annu. Ver. Biochem.**, **67** : 1-25, 1998.
- FURMAN, P.A.; FYFE, J.A.; CLAIR, S.T.; WEINHOL, K.; REIDEOUT, J.L.; FREEMAN, G.A.; LEHRMAN, S.N.; BOLOGNESI, D.P.; BRODER, S.; MITSUYA, H.; BARRY, D.W. –Phosphorylation of 3'azido-3'-deoxythimidine and selective interation of the 5'-triphosphate with human immunodeficiency vírus reverse transcriptase. **Proc. Natl. Acad. SCI USA**, **83**: 8333-8337, 1986.
- FRENKEL, L.M.; WAGNER, L.E.; DEMETER, L.M.; DEWHURST. S.; COOMBS, R.W.; MURANTE, B.L.; REICHMAN, R.C. –Effects of zidovudine use during pregnancy on resistance an vertical transmission of human immunodeficiency virus type 1. **Clin. Infect. Dis.**, **20**: 1321-1326, 1995.

- GADELHA, S.R.; SHINDO, N.; CRUZ, J.N.M.; MORGADO, M.G.; GALVÃO-CASTRO, B. -Molecular epidemiology of human immunodeficiency virus-1 in the state of Ceará, Northeast, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, **98(4)**: 461-464, 2003.
- GAO, F.; ROBERTSON, D.L.; CARRUTHERS, C.D.; LI, Y.; BAILES, E.; KOSTRIKIS, L.G.; SALMINEN, M.O.; BIBOLLET-RUCHE, F.; PETERS, M.; HO, D.D.; SHAW, G.M.; SHARP, P.M.; HAHAN, B.H. -An isolate of Human Immunodeficiency Virus Type 1 originally classified as subtype I represents a complex mosaic comprising three different group M subtypes (A, G and I). **J. Virol.**, **72(12)** : 10234-10241, 1998.
- GAO, F.; BAILES, E.; ROBERTSON, D.L.; CHEN, Y.; RODENBURG, C.M.; MICHAEL, S.F.; CUMMINNS, L.B.; ARTHUR, L.O.; PETERS, M.; SHAW, G.M. SHARP, P.M.; HAHN, B.H. -Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes troglodytes*. **Nature**, **397 (6718)**: 436-441, 1999.
- GALLEGO, O.; RUIZ, L.; VALLEJO, A. *et al.* Rate of virological treatment failure and frequencies of drug resistance genotypes among human immunodeficiency virus positive subjects on antiretroviral therapy in Spain. **J. clin. Microbiol.**, **40**: 3865-3866, 2002.
- GÄTTE, M.; ARION, D.; PARNIAK, M.A.; WAINBERG, M.A.; -The M184V Mutation in the Reverse Transcriptase of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Impairs Rescue of Chain-Terminated DNA Synthesis. **J. Virol.**, **74(8)**: 3579-3585, 2000.
- GEA-BANALOCHE, J.C.; WEISKOPF, E.E.; HALLAHAN, C. ET AL. - Progression of human immunodeficiency virus disease is associated with increasing disruptions within the CD4 T cell receptor repertoire. **J. Infect. Dis.**, **177**: 579-585, 1998.
- GOMEZ-CANO, M.; RUBIO, A.; PUIG, T. *et al.* -Prevalence of genotypic resistance to nucleoside analogues in antiretroviral-naive and antiretroviral-experienced HIV-infected patients in Spain. **AIDS**, **12**: 1015-1020, 1998.
- GONG, Y.F.; ROBINSON, B.S.; ROSE, R.E.; DEMINIE, C.; SPICER, T.P.; STOCK, D.; COLONNO, R.J.; LIN, P.F. -In vitro resistance profile of the human

- immunodeficiency virus type 1 protease inhibitor BMS-232632. **Antimicrob Agents Chemother**, **44(9)**: 2319-2326, 2000.
- GONZALEZ, L.M.; BRINDEIRO, R.M.; TARIN, M.; CALAZANS, A.; SOARES, M.A.; CASSOL, S. and TANURI, A. -In vitro hypersusceptibility of human immunodeficiency virus type 1 subtype C protease to lopinavir. **Antimicrob Agents Chemother**, **47**: 2817-2822, 2003.
- GORTMAKER, S.L.; HUGHES, M.; CERVIA, J. *et al.* -Effect of combination therapy including protease inhibitors on mortality among children and adolescents infected with HIV-1. **New Engl. J. Med.**, **345**: 1522-1528, 2001.
- GOTTLINGER, H.G.; SODROSKI, J.G.; HASELTINI, W.A. -Role of capsid precursor processing and myristylation in morphogenesis and infectivity of human immunodeficiency virus type 1. **Proc. Natl. Acad Sci USA**, **86**: 5781-5785, 1989.
- GRANDGENETT, D.P.; MUMM, S.R. -Unravelling retrovirus integration. **Cell** **60**: 3-3, 1990.
- GROSSMAN, Z.; PAXINOS, E.E.; AVERBUCH, D.; MAAYAN, S.; PARKIN, N.T.; ENGELHARD, D.; LORBER, M.; ISTOMIN, V.; SHAKED, Y.; MENDELSON, E.; RAM, D.; PETROPOULOS C.J.; SCHAPIRO, J.M. -Mutation D30N Is Not Preferentially Selected by Human Immunodeficiency Virus Type 1 Subtype C in the Development of resistance to Nelfinavir. **Antimicrob. Agents Chemother.**, **48(6)**: 2159-2165, 2004.
- GÜNTHARD, H.F.; WONG, J.K.; IGNACIO, C.C.; GUATELLI, J.C.; RIGGS, N.L.; HAVLIR, D.V.; RICHMAN, D.D. -Human Immunodeficiency Virus Replication and Genotypic Resistance in Blood and Lymph Nodes after a Year of potent Antiretroviral Therapy. **J. Virol.**, **72(3)**: 2422-2428, 1998.
- HAHN, B.H.; SHAW, G.M.; DE COCK, K.M.; SHARP, P.M. -AIDS as a zoonosis: scientific and public health implications. *Science*, **287**: 607-614, 2000.



- HANSEN, J.; SCHULZE, T.; MELLERT, W.; MOELLING, K. –Identification and characterization of HIV-specific Rnase H by monoclonal antibody. **EMBO J.**, **7**: 239-243, 1988.
- HANCE, A.J.; LEMIALE, V.; IZOPET, J.; LECOSSIER, D.; JOLY, V.; MASSIP, P.; MAMMANO, F.; DESCAMPS, D.; BRUN-VÉZINET, F. and CLAVEL, F. –Changes in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Populations after Treatment Interruption in Patients Failing Antiretroviral Therapy. **J. Virol.**, **75(14)**: 6410-6417, 2001.
- HAVLIR, D.V. and RICHMAN, D.D. -Viral Dynamics of HIV: implication for drug development and therapeutic strategies. **Ann Intern Med.**, **124**: 984-994, 1996.
- HERNANDEZ, L.D.; HOFFMAN, L.R.; WOLFSBERG, T.G.; WHITE, J.M. – Virus-cell and cel-fusion. **Annu. Ver. Cell. Dev. Biol.**, **12**: 627-661, 1996.
- HECHT, F.M., GRANT, R.M.; PETROPOULOS, C.J.; DILLON, B.; CHESNEY, M.A.; HELLMANN, N.S.; BANDRAPALLI, N.I.; DIGILIO, L.; BRANSON, B.; KAHN, J.O. -Sexual transmission of an HIV-1 variant resistant to multiple reverse transcriptase and protease. **N.Engl.J.Med.****399**: 307-311, 1998.
- HIRSCH, M.S.; OLMSTED, R.A.; MURPHEY-Corb, M.; PURCELL, R.H.; JOHNSON, P.R. -An African primate lentivirus (SIVsm) closely related to HIV-2. **Nature.** **339**: 389-392, 1989.
- HIRSCH, M.S.; D'ÁQUILA, R.T. 1993. -Therapy for human immunodeficiency virus infection. **N. Engl. J. Med.**, **328**: 1686-1695, 1993.
- HIRSCH, M.S.; BRUN-VEZINET, F.; D'AQUILA, R.T.; *et al* –Antiretroviral drug resistance testing in adult HIV-1 infection: recommendations of an International Aids Society-USA Panel. **J. Amer. med. Ass.**, **283**: 2417-2426, 2000.
- HOLGUIN, A.; DIETRICH, U.; IMMELMANN, A. And SORIANO, V. –Genotypic and phenotypic resistance to stavudine after long-term monotherapy. BMS-020 Spanish Study Group. **Antivir. Ther.**, **3**: 183-186, 1998.

- HUANG, W.; GAMARNIK, A.; WRIM, T. – NNRTI-resistance profiles, replicative capacity and protease processing defects in HIV-1 that contain RT mutations at amino acid 190 (abstract 29). **Antivir Ther**, **5(3)**: 23, 2000.
- IMAMICHI, T.; SINHA, T.; IMAMICHI, H.; ZHANG, Y.M.; METCLAF, J.A.; FALLON, J.; LANE, H.C. -High-level resistance to 3'-azido-3'-deoxythymidine due to a deletion in the reverse transcriptase gene of human immunodeficiency virus type 1. **J Virol**, **74(2)**:1023-1028, 2000.
- IRWIN, K.L.; PAU, C.P.; LUPO, D.; PIENAZEK, D.; LUO, C.C.; OLIVO, N.; RAYFIELD, M.; HU, D.J.; WEBER, J.T.; RESPESS, R.A.; JANSSEN, R.; MINOR, P.; ERNST, J. -Presence of human immunodeficiency virus (HIV) type 1 subtype A infection in a New York community with high HIV prevalence: a sentinel site for monitoring HIV genetic diversity in North America. Centers for Disease Control and Prevention-Bronx Lebanon HIV Serosurvey Team. **J. Infect. Dis.**, **176(6)**: 1629-33, 1997.
- ISAKSSON, B.; ALBERT, J.; CHIODI, F. *et al.* -AIDS two months after primary human immunodeficiency virus infection. **J. Infec. Dis.**, **158** : 866-867, 1988.
- JANKELEVICH, S.; MUELLER, B.U.; MACKALL, C.L.; SMITH, S.; ZWERSKI, S.; WOOD, L.V.; ZEICHNER, S.L.; SERCHUCK, L.; STEINBER, S.M.; NELSON, R.P.; SLEASMAN, J.W.; NGUYEN, B.; PIZZO, P.A. and YARCHOAN, R. –Long-term virologic and immunologic responses in human Immunodeficiency virus type 1-infected children treated with indinavir, zidovudine and lamivudine. **J. Infect. Dis.**, **183**: 1116-1120, 2001.
- JOHNSON, V. A.; PETROPOULOS, C.J.; WOODS, C.R.; HAZELWOOD, J.D.; PARKIN, N.T.; HAMILTON, C.D.; FISCUS, S.A. -Vertical transmission of multidrug-resistant human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) and continued evolution of drug resistance in an HIV-1 infected infant. **J. Infect. Dis.**, **183**: 1688-1693, 2001.
- KAHN, J.O. and WALKER, B.D. –Acute Human Immunodeficiency Virus type 1 infection. **N. Engl. J. Med.** **331**: 33-39, 1998.

- KALISH, L.A. et al. -Defining the time of fetal or perinatal acquisition of human immunodeficiency virus type 1 on the basis of age at first positive culture. **J. Infect. Dis.**, **175**:712-715, 1997.
- KANNANGAI, R.; RAMALINGAM, S.; RAKASH, K.J.; ABRAHAM, O.C.; GEORGE, R.; CASTILLO, R.C.; SCHWARTZ, D.H.; JERUDASON, M.V.; SRIDHARAN, G. – Molecular confirmation of human immunodeficiency virus (HIV) type 2 in HIV – seropositive subjects in south India. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, **7(6)**: 987-999, 2000.
- KANNANGAI, R.; SHAJI, R.V.; RAMALINGAM, S. JESUDASON, M.V.; ABRAHAM, O.C.; GEORGE, R.; SHANMUGAM, A.P.; SCHWARTZ, D.H.; SRIDHARAN, G. – HIV-2 subtype circulating in India (south). **J. Acquir. Immune Defic. Syndr.**, **33(2)**: 219-222, 2003.
- KANTOR, R.; AND KATZENSTEIN, D. – Drug resistance in non-subtype B HIV-1. **J. Clin. Virol.**, **29**: 152-159, 2004.
- KAUFMANN, G.R.; BLOCH, M.; FINLAYSON, R.; ZAUNDERS, J.; SMITH, D.; COOPER, D.A. – The extent of HIV-1-related immunodeficiency and age predict the long term CD4 T lymphocyte response to potent antiretroviral therapy. **AIDS**, **16**: 359-367, 2002.
- KEMPF, D.J.; ISSAACSON, J.D.; KING, M.S.; BRUN, S.C.; XU, Y.; REAL, K.; BERNSTEIN, B.M.; JAPOUR, A.J.; SUN, E.; RODE, R.A. –Identification of genotypic changes in human immunodeficiency virus protease that correlate with reduced susceptibillith to the protease inhibitor lopinavir among viral isolates from protease inhibitor-experienced patients. **J. Virol.**, **75**: 7462-7469, 2001.
- KILBY, J.M.; HOPKINS, S.; VENETTA, T.M.; DIMASSIMO, B.; CLOUD, G.A.; LEE, L.A.; HUNTER, E.; LAMBERT, D.; BOLOGNESI, D.; MATTHEWS, T.; JOHNSON, M.R.; NOWAK, M.A.; SHAW, G.M. and SAAG, M.S. –Potent suppression of HIV-1 replication in humans by T-20, a peptide inhibitor of gp41 –mediated virus entry. **Nature Medicine**, **4(11)**: 1302-1307, 1998.

- KIM, R.B.; FROMM, M.F.; WANDELL, D.S.; LEAKE, B.; WOOD, A.J.; RODEN, D.M.; WILKINSON, G.R. – The drug transporter p-glycoprotein limits oral absorption and brain entry of HIV-1 protease inhibitors. **J. Clin. Invest.**, **101(2)**: 289-294, 1998.
- KIND, C. et al. –Prevention of vertical HIV transmission: additive protective effect of elective Cesarean section and zidovudine prophylaxis. Swiss Neonatal HIV Study Group. **AIDS**, **12(2)**: 205-210, 1998.
- KOZAL, M.J.; SHAH, N.; SHEN, N.; YAANG, R.; FUCINI, R.; MERIGAN, T.C.; RICHMAN, D.D.; MORRIS, D.; HUBBEL, E.; CHEE, M.; GINGERAS, T.R. –Extensive polymorphisms observed in HIV-1 clade B protease gene using high-density oligonucleotide arrays. **Nat. Med.** **2**: 753-759, 1996.
- KOHL, N.E.; EMINI, E.A.; SCHLEIF, W.A. et al. –Active human immunodeficiency virus protease is required for viral infectivity. **Proc. Natl. Acad. SCI USA**, **85**: 4686-4690. 1998.
- KRIVINE, A.; FIRTION, G.; CAO, L.; FRANCOUAL, C.; HENRION, R.; LEBON, P. –HIV replication during the first weeks of life. **Lancet**, **339**: 1187-1189, 1992.
- KULLY, C.; YERLY, S.; ERB, P. et al. –Codon 215 mutations in human immunodeficiency virus infected pregnant women. Swiss Collaborative HIV and Pregnancy Study. **J. Infect Dis**, **179**: 705-708, 1999.
- LARDER, B.A. and KEMP, S.D. –Multiple mutations in HIV-1 reverse transcriptase confer high-level resistance to Zidovudine. **Science**, **246**:1155-1158, 1989.
- LARDER, B.A.; HERTOGS, K.; BLOOR, S.; VAN DEN EYNDE, C.H.; DECIAN, W.; WANG, Y.; FREIMUTH, W.W.; TARPLEY, G. –Tipranavir inhibits broadly protease inhibitor-resistant HIV-1 clinical samples. **AIDS**, **14(13)**:1943-1948, 2000.
- LAWN, S.D.; BUTERA, S.T.; FOLKS, T.M. –Contribution of Immune Activation to the Pathogenesis and Transmission of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection. **Clin. Microbiol. Rev.**, **14(4)**: 753-777, 2001.

LEE, C.G.; GOTTESMAN, M.M.; CARDARELLI, C.O.; RAMACHANDRA, M.; JEANG, K.T.; AMBUDKAR, S.V.; PASTAN, I.; DEY, S. -HIV-1 protease inhibitors are substrates for the MDR1 multidrug transporter. **Biochemistry**, **37(11)**: 3594-3601, 1998.

LEVY, J.A. -HIV pathogenesis and long-term survival. **AIDS**, **7**: 1401-1410, 1993.

LIFSON, A.R.; RUTHERFORD, G.W.; JAFFE, H.W., -The natural history of human immunodeficiency virus infection. **J. Infect. Dis.**, **158**: 1360-1367, 1988.

LITTLE, S.J.; HOLTE, S.; ROUTY, J.P.; DAAR, E.S.; MARKOWITZ, M.; COLLIER, A.C.; KOUP, R.A.; MELLORS, J.W.; CONNICK, E.; CONWAY, B.; KILBY, M.; WANG, L.; WHITCOMB, J.M.; HELLMANN, N.S.; RICHMAN, D.D. - Antiretroviral-drug resistance among patients recently infected with HIV. **N Engl J Med**, **347(6)**: 385-394, 2002a.

LITTLE, S.J.; HOLTE, S.; ROUTY, J.P.; CONNICK, E.; DAAR, E.S.; CONWAY, B.; WANG, L.; MARKOWITZ, M.; COLLIER, A.C.; DAWSON, K.; HELLMAN, N.S. and RICHMAN, D.D. -Longitudinal analysis of transmitted drug resistance among recently HIV-infected subjects in North America. **Antivir Ther**, **7(Suppl 1)**:S144, 2002b.

LITTLE, S.J.; KOELSCH, K.K.; IGNACIO, C.C.; WONG, J.K.; LIE, Y.; FROST, S.D.W.; and RICHMAN, D.D.; - Persistence of Transmitted Drug-resistant Virus among Subjects with Primary HIV Infection Deferring Antiretroviral Therapy. In: **11th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, San Francisco, CA** EUA, Abstract n° 36LB, 2004.

LOUSSERT-AJAKA, I., MENU, E.; APETREI, C.; PEETERS, M.; DAMOND, F.; MAUCLÉRE, P.; EBERLE, J.; BRENGUES, C.; SARAGOSTI, S.; BARRÉ-SINOUSI, F.; BRUN-VÉXINET, F.; SIMON, F. -HIV type 1 diversity and the reliability of the heteroduplex mobility assay. **AIDS Res Hum Retrov**, **14(10)** : 877-883, 1998.

- LOUWAGIE, J.; DELWART, E.L.; MULLINS, J.I.; McCUTCHAN, F.E.; ESSY, G.; BURK, D.S. –Genetic analysis of HIV-1 isolates from Brazil reveals presence of two distinct genetic subtypes. **AIDS Res. Hum. Retrovirus**, **10(5)**: 561-567, 1994.
- LU, M.; BLACKOW, S.C.; KIM, P.S. –A trimeric structural domain of the HIV-1 transmembrane glycoprotein. **Nat. Struct. Biol.**, **2(12)**: 1075-1082, 1995.
- LUZURIAGA, K.; WU, H.; McMANUS, M.; BRITTO, P.; BORKOWSKY, W.; BURCHETT, S.; SMITH, B.; MOFENSON, L.; SULLIVAN, J.L. and the PACTG 356 INVESTIGATORS. –Dynamics of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Replication in Vertically Infected Infants. **J. Virol.**, **73(1)**: 362-367, 1999.
- MACHADO, D.M.; FERNADES, S.C.; SUCCI, R.C.M.; FREIRE, W.S.; PANNUTI, C.S.; GOUVEIA, A.B.; LEVI, J.E. and DIAZ, R.S. –Analysis of HIV-Type 1 Protease and Reverse Transcriptase in Brazilian Children Failing Highly Active Antiretroviral Therapy (HAART). **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, **47(1)**: 1-5, 2005.
- MACHADO, E.S.; LAMBERT, J.S.; AFONSO, A.O.; CUNHA, S.M.; OLIVEIRA, R.H.; TANURI, A.; SILL, A.M. and SOARES, M.A. –Overview of genotypic and clinical profiles of human immunodeficiency virus type 1-infected children in Rio de Janeiro, Brazil. **Annals of the Brazilian Academy of Sciences**, **76(4)**: 727-741, 2004.
- MANDELBROT, L. et al. –Obstetric factors and mother-to-child transmission of human immunodeficiency virus type 1: the French perinatal cohorts. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, **175**: 661-667, 1996.
- MANDELBROT, L. et al. Perinatal HIV-1 transmission: interaction between zidovudine prophylaxis and mode of delivery in the French Perinatal Cohort. **JAMA**, **280(1)**: 55-60, 1998.
- MARLINK, R.; KANKI, P.; THIOR, I.; TRAVERS, K.; EISEN, G.; SIBY, T.; TRAORE, I.; HSIEH, C.C.; DIA, M.C.; GUEYE, E.H.; HELLINGER, J.; GUEYE-NDIAYE, A.; SANKALÉ, J.L.; NDOYE, I.; MBOUP, S.; ESSEX, M. – Reduced rate of disease development after HIV-2 infection as compared to HIV-1. **Science**, **165**: 1587-1590, 1994.

- MAYAUX, M.J. et al. –Maternal viral load during pregnancy and mother-to-child transmission of human immunodeficiency virus type 1: the French Perinatal cohort studies. **J. Infect Dis.**, **175**: 172-175, 1997.
- MAXEINER, H.G.; KEULEN, W.; SCHUURMAN, R.; BIJEN, M.; DE GRAAF, L.; VAN WIJK, A.; BACK, N.; KLINE, M.W.; BOUCHER, C.A. and NIJHUIS, M. –Selection of zidovudine resistance mutations and escape of human immunodeficiency virus type 1 from antiretroviral pressure in stavudine-treated pediatric patients. **J. Infect. Dis.**, **185**: 1070-1076, 2002.
- MELLORS, J.W.; RINALDO Jr, C.R.; GUPTA, P.; WHITE, R.M.; TODD, J.A.; KINGSLEY, L.A. –Prognosis in HIV-1 infection predicted by the quantity of virus in plasma. **Science**, **272**: 1167-1170, 1996.
- MILLER, V.; STÜRMAN, M.; STASZEWSKI, S.; GRÖSCHEL B.; HERTOGS, K.; DE BÉTHUNE, M.; PAUWELS, R.; HARRIGAN, P.R.; BLOOR, S.; KEMP, S.D.; LARDER, B.A. –The M184V mutation in HIV-1 reverse transcriptase (RT) conferring lamivudine resistance does not result in broad cross-resistance to nucleoside analogue RT inhibitors. **AIDS**, **12**: 705-712, 1998.
- MILLER, V.; AIT-KHALED, M.; STONE, C.; GRIFFIN, P.; MESOGITI, D.; CUTRELL, A.; HARRIGAN, R.; STASZEWSKI, S.; KATLAMA, C.; PEARCE, G.; TISDALE, M. – HIV-1 reverse transcriptase (RT) genotype and susceptibility to RT inhibitors during abacavir monotherapy and combination therapy. **AIDS**, **14**: 163-171, 2000.
- MITSUYA, D.; YARCHOAN, R.; BRODER, S. –Molecular targets for AIDS therapy. **Science**, **249**: 1533-1544, 1990.
- MOLLA, A.; KORNEYEVA, M.; GAO, Q.; VASAVANONDA, S.; SCHIPPER, P.J.; MO, H-M.; MARKOWITZ, M.; CHERNYAVSKIY, T.; NIU, P.; LYONS, N.; HSU, A.; GRANNEMAN, G.R.; HO, D.D.; BOUCHER, C.A.B.; LEONARD, J.M.; NORBECK, D.W.; KEMPF, D.J. –Ordered accumulation of mutations in HIV protease confers resistance to ritonavir. **Nat. Med.**, **2**: 760-766, 1996.

- MOFENSON, L.; LAMBERT, J.; STIEHM, E.R. et al. –Association of Zidovudine (ZDV) genotypic resistance with perinatal HIV transmission in women receiving ZDV in Pediatric AIDS Trials Group (PACTG) protocol 185 [abstract TuPpB 1229]. In: **Program and abstracts of the XIII International AIDS Conference** (Durban, South Africa). Stockholm: International AIDS Society, 92, 2000.
- MORROW, C.D.; PARK, J.; WAKEFIEL, J.K. –Viral gene products and replication of the Human Immunodeficiency Type 1 Virus. **Am. J. Physiol.**, **266(5 pt 1)**: 1135-1156, 1994.
- MOREIRA, J.E.D. *et al.* -Characteristics of the acquired immunodeficiency syndrome in Brasil. **Am. J. Trop. Med. Hyg**, **48(5)**: 687-92, 1993.
- MORGADO, M.G.; GUIMARÃES, M.L.; GRIPP, C.B.G.; COSTA, C.I.; NEVES, JUNIOR I.; VELOSE, V.G.; LINHARES-CARVALHO, M.I.; CASTELLO-BRANCO, L.R.; BASTOS, F.I.; KUIKEN, C.; CASTILHO, E.A.; GALVÃO-CASTRO, B.; BONGERTZ, V.; and the Hospital Evandro Chagas AIDS Clinical Research Group. -Molecular epidemiology of HIV-1 in Brazil: high prevalence of HIV-1 subtype B and identification of an HIV-1 subtype D infection in the city of Rio de Janeiro, Brazil. **J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol**, **18** : 488-494, 1998.
- MOUROUX, M.; DESCAMPS, D.; IZOPET, J.; YVON, A.; DELAUGERRE, C.; MATHERIN, S.; COUTELLIER, A.; VALANTIN, M.A.; BONMARCHAND, M.; AGUT, H.; MASSIP, P.; COSTAGLIOLA, D.; KATLAMA, C.; BRUN-VEZINET, F. and CALVEZ, V. –Low-rate emergence of thymidine analogue mutations and multi-drug resistance mutations in the HIV-1 reverse transcriptase gene in therapy-naïve patients receiving stavudine plus lamivudine combination therapy. **Antivir. Ther.**, **6**: 179-183, 2001.
- MYERS, G.; KORBER, B.; FOLEY, B. *et al.* -Human retrovirus and AIDS 1997: a compilation and analysis of nucleic acid and amino acid sequences. Los Alamos, NM: **Theoretical Biology and Biophysics Group**, Los Alamos National Laboratory, 1997.



- MULLEN, J.; LEECH, S.; O'SHEA, S.; CHRYSTIE, I.L.; DU MONT, G.; BALL, C.; SHARLAND, M.; COTTAM, F.; ZUCKERMAN, M.; RICE, P. and EASTERBROOK, P. –Antiretroviral drug resistance among HIV-1 infected children failing treatment. **J. Med. Virol.**, **68**: 299-304, 2002.
- MUÑOZ, A.; KIRBY, A.J.; HE, Y.D. et al. –Long-term survivors with HIV-1 infection: incubation period and longitudinal patterns of CD4+ lymphocytes. **J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.** **8**: 496-505, 1995.
- NÁJERA, I.; HOLGUÍN, A.; QUIÑONES-MATEU, M.E.; MUNOZ-FERNANDEZ, M.A.; NÁJERA, R.; LÓPEZ-GALINDEZ, C.; DOMINGO, E. –Pol gene quasispecies of human immunodeficiency virus: mutations associated with drug resistance in virus from patients undergoing no drug therapy. **J. Virol.**, **69**: 23-31, 1995.
- NEHETE, P.N.; VELA, E.M.; HOSSAIN, M.M.; SARKAR, A.K.; YAHY, N.; FANTINI, J.; SASTRY, K.J. –A post-CD4-binding step involving interaction of the V3 region of viral gp120 with host cell surface glycosphingolipids is common to entry and infection by diverse HIV-1 strains. **Antiviral. Res.**, **56(3)**: 233-251, 2002.
- NIJHUIS, M.; SCHUURMAN, R.; DE JONG, D.; ERICKSON, J.; GUSTCHINA, E.; ALBERT, J.; SCHIPPER, P.; GULNIK, S.; BOUCHER, C.A. –Increased fitness of drug resistant HIV-1 protease as a result of acquisition of compensatory mutations during suboptimal therapy. **AIDS**, **13**: 2349-2359, 1999.
- NIJHUIS, M.; SCHUURMAN, R.; DE JONG, D. *et al.* – Lamivudine-resistant human immunodeficiency virus type 1 variants (184V) require multiple amino acid changes to become co-resistant to Zidovudine in vivo. **J. Infect Dis.**, **176**: 398-405, 1997.
- ORLOFF, S.L.; SIMONDS, R.J.; STEKETEE, R.W.; St LOUIS, M.E. –Determinants of perinatal HIV-1 transmission. **Clin. Obstet. Gynecol.** **39(2)**: 386-395, 1996.
- O'SHEA, S. et al. –Maternal viral load, CD4 cell count and vertical transmission of HIV-1. **J. Med. Virol.**, **54(2)**: 113-117, 1998.

- PALUMBO, P.; HOLLAND, B.; DOBBS, T.; PAU, C.; LUO, C.; ABRAMS, E.J.; NESHEIM, S.; VINK, P.; RESPESS, R. and BULTERYYS, M. for the Perinatal AIDS Collaborative Transmission Study. –Antiretroviral Resistance Mutations among Pregnant Human Immunodeficiency Virus Type 1-Infected woman and Their Newborns in the United States: vertical Transmission and Clades. **The Journal of Infectious Diseases**, **184**: 1120-1126, 2001.
- PANLILIO, A.L.; ORELIEN, J.G.; SRIVASTAVA, P.U.; JAGGER, J.; COHN, R.D.; CARDO, D.M.; NaSH Surveillance Group; EPINet Data Sharing Network. - Estimate of the annual number of percutaneous injuries among hospital-based healthcare workers in the United States, 1997-1998. **Infect Control Hosp Epidemiol.**, 25(7): 556-562, 2004.
- PANTALEO, G.; GRAZIOSI, C.; FAUCI, A.S. –The immunopathogenesis of human immunodeficiency virus infection. **N.Engl. J. Med.**, **328**: 327-336, 1993.
- PARIKH, U.; KOONTZ, D.; SLUIS-CREMER, N.; HAMMOND. J.; BACHELER, L.; SCHINAZI, R.; MELLORS, J. - A Multinucleoside Resistance Mutation of Increasing Prevalence Exhibits Bi-directional Phenotypic Antagonism with TAM. In **11th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, San Francisco, CA, EUA**, Abstract n° K65R, 2004.
- PARKIN, N.T.; CHAPPEY, C.; MARANTA, M.; WHITEHURST, N.; PETROPOULOS, C. –Genotypic and phenotypic analysis of a large database of patient samples reveals distinct patterns of cross-resistance. **Antivir. Ther.**, **6**: 49, 2001.
- PATICK, A.K.; DURAN, M.; CAO, Y.; SHUGARTS, D.; KELLER, M.R.; MAZABEL, E.; KNOWLES, M.; CHAPMAN, S.; KURITZKES, D.R.; MARKOWITZ, M. –Genotypic and Phenotypic Characterization of human Immunodeficiency Virus Type 1 Variants Isolated from Patients Treated with the Protease Inhibitor Nelfinavir. **Antimicrob. Agents Chemother.**, **42(10)**: 2637-2644, 1998.
- PEETERS, M.; GUEYE, A.; MBOUP, S.; BIBOLLET-RUCHE, F.; EKAZA, E.; MULANGA, C.; OUEDRAGO, R.; GANDJI, T.; MPELE, P.; DIBANGA, G.; KOUMARE, B.; SAIDOU, M.; SEU-WILLIAMS, E.; LOMBART, J.; BADOMBENA,

- W.; NKANDU, L.; VAN DEN HAESEVELDE, M.; DELAPORTE, E. -Geographic distribution of HIV-1 group O viruses in Africa. **AIDS**, **11(4)**: 493-498, 1997.
- PERELSON, A.S.; ESSUNGER, P.; CAO, Y.; VESANEN, M.; HURLEY, A.; SAKSELA, K.; MARKOWITZ, M.; HO, D.D. -Decay characteristics of HIV-1 infected compartments during combination therapy. **Nature**, **387(6629)**: 188-191, 1997.
- PERELSON, A.S.; MARKOWITZ, M.; HO, D.D. - HIV-1 Dynamics in vivo: Virion Clearance Rate, Infected Cell Life-span, and Viral Generation Time. **Science**, **271**: 1582-1586, 1996.
- PETROPOULUS, C.J.; PARKIN, N.T.; LIMOLI, K.L.; LIE, Y.S.; WRIN, T.; HUANG, W.; TIAN, H.; SMITH, D.; WINSLOW, G.A.; CAPON, D.J.; WHITCOMB, J.M. -A novel phenotypic drug susceptibility assay for human immunodeficiency virus type 1. **Antimicrob Agents Chemother**, **44**: 920-928, 2000.
- PIATAK, M.; Jr, SAAG, M.S.; YANG, L.C.; CLARK, S.J.; KAPPES, J.C.; LUK, K.C.; HAHN, B.H.; SHAW, G.M. AND LIFSON, J.D. -High levels of HIV-1 in plasma during all stages of infection determined by competitive PCR. **Science**, **259**: 1749-1754, 1993.
- PIENIAZEK, D.; RAYFIELD, M.; HU, D.J.; NKENGASONG, J.; WIKTOR, S.Z.; DOWNING, R.; BIRYAHWAHO, B.; MASTRO, T.; TANURI, A.; SORIANO, V.; LAL, R.; DONDERO, T. -Protease sequences from HIV-1 group M subtypes A-H reveal distinct amino acid mutation patterns associated with protease resistance in protease inhibitor-naïve individuals worldwide. **AIDS**, **14**: 1489-1495, 2000.
- PILLAY, D.; WALKER, A.S.; GIBB, D.M.; DE ROSSI, A.; KAYE, S.; AIT-KHALED, M.; MUNOZ-FERNANDEZ, M. AND BABIKR, A. -Impact of human immunodeficiency virus type 1 subtypes on virologic response and emergence of drug resistance among children in the Paediatric European Network for Treatment of AIDS (PENTA) 5 trial. **J. Infect. Dis.**, **186**: 617-625, 2002.
- PIRES, I.L.; SOARES, M.A.; SPERANZA, F.A.; ISHII, S.K.; VIEIRA, M.C.; GOUVEA, M.I.; GUIMARAES, M.A.; DE OLIVEIRA, F.E.; MAGNANINI, M.M.; BRINDEIRO,

- R.M. and TANURI, A. –Prevalence of human immunodeficiency virus drug resistance mutations and subtypes in drug-naïve, infected individuals in army health service of Rio de Janeiro, Brazil. **J. Clin. Microbiol.**, **42**: 426-430, 2004.
- POPOVIC, M.; SARNGADHARAN, M.G.; READ, E. and GALLO, R.C. –Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retrovirus (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. **Science**, **224**: 496-500, 1984.
- RAYFIELD, M.A.; SULLIVAN, P.; BANDERA, C.I.; BRITVAN, L.; OTTEN, R.A.; PAU, C.P.; PIENIAZEK, D., SUBBARAO, S.; SIMON, P.; SCHABLE, C.A.; WRIGHT, A.C.; WARD, J.; SCHOCHETMAN, G. - HIV-1 group O virus identified for the first time in the United States. **Emerg. Infect. Dis.**, **2(3)** : 20-212, 1996.
- REEVES, J.D. and DOMS, R.W. –Human immunodeficiency virus type 2. **J. Gen. Virol.** **83**: 1253-1265, 2002.
- ROSENBERG, Z.F. and FAUCI, A.S. – Immunopathology and pathogenesis of HIV infection. In: Pizzo Wilfert (eds). Pediatric Aids: a challenge. **Baltimore**, 115-127, 1994.
- ROUZIOUX, C. et al and the HIV infection newborns French Collaborative Study Group. Estimated timing of mother-to-child human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) transmission by use of a Markov model. **Am. J. Epidemiol.**, **142(12)**:1330-1337, 1995.
- SAAG, M.S.; HAHN, B.H.; GIBBONS, J.; LI, Y.; PARKS, E.S.; PARKS, W.P.; SHAW, G.M. -Extensive variation of human immunodeficiency virus type 1 *in vivo*. **Nature**, **334(6181)**: 440-444, 1988.
- SABINO, E.C.; SHAPER, E.G.; MORGADO, M.G.; KORBER, B.T.M.; DIAZ, R.S.; BONGERTZ, V.; CAVALCANTE, S.; GALVÃO-CASTRO, B.; MULLINS, J.I.; MAYER, A. -Identification of human immunodeficiency virus type 1 envelope genes recombinant between subtypes B and F in two epidemiologically linked individuals from Brazil. **J. Virol.**, **68(10)**: 6340-6346, 1994.

- SAKAI, K.; MA, X.; GORDIENKO, I.; VOLSKI, D.J. -Recombinational analysis of natural noncytopathic human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) isolate: Role of vif gene in HIV-1 infection kinetics and cytopathogenicity. **J.Virol.**, **65**: 5765-5773, 1991.
- SAKAI, K.; DEWHURST, S.; MA, X.Y.; VOLSKY, D.J. -Differences in cytopathogenicity and host cell range among infectious molecular clones of human immunodeficiency virus type 1 simultaneously isolated from an individual. **J. Virol.**, **62(11)**: 4078-4085, 1988.
- SALOMON, H.; MONTNER, J.S.; BELMONTE, A. and WAINBERG M.A. -Diminished HIV-1 sensitivity to stavudine in patients on prolonged therapy occurs only at low levels and cannot be attributed to any single amino acid substitution in reverse transcriptase. **Antivir. Ther.**, **3**: 177-182, 1998.
- SANDERS, R.W.; VESANEN, M.; SCHUELKE, N.; MASTER, A.; SCHIFFNER, L.; KALYANARAMAN, R.; PALUCH, M.; BERKHOUT, B.; MADDON, P.J.; OLSON, W.C.; LU, M.; MOORE, J.P. -Stabilization of the soluble, cleaved, trimeric form of the envelope glycoprotein complex of human immunodeficiency virus type 1. **J. Virol.**, **76(17)**: 8875-8889, 2002.
- SARMATI, L.; NICASTRI, E.; MONTANO, M.; DORI, L.; BUONOMINI, A.R.; D'ETTORRE, G.; GATTI, F.; PARISI, S.G.; VULLO, V. and ANDREONI, M. -Decrease of replicative capacity of HIV isolates after genotypic guided change of therapy. **J. Med. Virol.**, **72**: 511-516, 2004.
- SCHMIT, J-C.; COGNIAUX, J.; HERMANS, P.; VAECK, C.V.; SPRECHER, S.; REMOORTEL, B.V.; WITVROUW, M.; BALZARINI, J.; DESMYTER, J.; DE CLERCQ, E.; VANDAMME, A-M. -Multiple drug resistance to nucleoside analogues and nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors in an efficiently replicating human immunodeficiency virus type 1 patient strain. **J. Infect. Dis.**, **174**: 962-968, 1996.
- SCHMIT, J-C.; VAN LAETHEM, K.; RUIZ, L.; HERMANS, P.; SPRECHER, S.; SONNERBORG, A.; LEAL, M.; DESMYTER, J.; DE CLERCO, E.; VANDAMME,

- A.M. – Multiple Dideoxynucleoside Analogue-resistance (MddNR) HIV-1 strains isolated from patients from different European countries. **AIDS**. **12**: 2005-2015, 1998.
- SHEARER, W.T.; QUINN, T.C.; LA RUSSA, P. et al -Viral load and progression in infants infected with human immunodeficiency virus type 1. Women and Infants Transmission Study Group. **New Engl. J. Med.**, **336**: 1337-1342, 1997.
- SHIRASAKA, T.; KAVLICK, M.F.; UENO, T.; GAO, W.Y.; KOJIMA, E.; ALCAIDE, M.L.; CHOKEKIJCHAI, S.; ROY, B.M.; ARNOLD, E.; YARCHOAN, R. –Emergence of human immunodeficiency virus type 1 variants with resistance to multiple dideoxynucleosides in patients receiving therapy with dideoxynucleosides. **Proc Natl Acad Sci USA**., **92(6)**: 2398-2402, 1995.
- SCHUURMAN, R.; DEMETER, L.; REICHELDERFER, P. et al. –Worldwide evaluation of DNA sequencing approaches for identification of drug resistance mutations in the human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. **J. Clin Microbiol.**, **37**: 2291-2296, 1999.
- SIEGRIST, C.A.; YERLY, S.; KAISER, L.; WYLER, C.A.; PERRIN, L. -Mother to child transmission of zidovudine-resistant HIV-1. **Lancet**, **344**: 1771-1772, 1994.
- SIMON, F.; MAUCLÈRE, P.; ROQUES, P. et al. -Identification of a new human immunodeficiency virus type 1 distinct from group M and group O. **Nat. Med.**, **4**: 1032-1037, 1998.
- SIMON, V.; PADTE, N.; MURRAY, D.; VANDERHOEVEN, J.; WRIN, T.; PARKIN, N.; DI MASCIO, M. and MARKOWITZ, M. –Infectivity and replication capacity of drug-resistant human immunodeficiency virus type 1 variants isolated during primary infection. **J. Virol.**, **77**: 7736-7745, 2003.
- SIMONETTI, S.R.R.; SCHATZMAYR, H.G.; SIMONETTI, J.P. –Human Immunodeficiency Virus Type 1> Drug Resistance in Treated and Untreated Brazilian Children, **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **98(6)**: 831-837, 2003.

SORIANO, V. -Sequencing antiretroviral drugs. **AIDS**, **15**: 547-551, 2001.

SOARES, E.A.; SANTOS, R.P.; PELLEGRINI, J.A.; SPRINZ, E.; TANURI, A.; SOARES, M.A. -Epidemiologic and molecular characterization of human immunodeficiency virus type 1 in southern Brazil. **J. Acquir. Immune Defic. Syndr.**, **15;34(5)**: 520-526, 2003.

STASZEWSKI, S.J.; MORALES-RAMIREZ, K.T. and TASHIMA, A. -Efavirenz plus Zidovudine and lamivudine, Efavirenz plus indinavir, and indinavir plus Zidovudine and lamivudine in the treatment of HIV-1 infection in adults. **New Engl. J. Med.**, **341**: 1865-1873, 1999.

STEIN, S.S.; GOWDA, S.D.; LIFSON, J.D.; PENHALLOW, R.C.; BENSCH, K.G.; ENGLEMAN, E.G. -pH-independent HIV entry into CD4-positive T cells via virus envelope fusion to the plasma membrane. **Cell**, **40(5)**: 659-668, 1987.

STEWART, G.T. -The epidemiology and transmission of AIDS: a hypothesis linking behavioural and biological determinants to time, person and place. **Genetica**, **95(1-3)**: 173-193, 1995.

SUCUPIRA, M.C.A.; TESCAROLLO, G.; JANINI, M.; CASEIRO, M.M.; ALVES, K.; SABINO, E.C.; CASTELO-FILHO, A.; PAGE-SHAFFER, K.; and DIAZ, R.S. -High Levels of Primary Antiretroviral Genotypic Resistance and B/F Recombinants in Santos SP, Brazil. In **11th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, San Francisco, CA, EUA, Abstracts n° 676**, 2004.

SUGIURA, W.; MATSUDA, Z.; YOKOMAKE, Y.; HERTOGS, K.; LARDER, B.; OISHI, T.; OKANO, A.; SHIINO, T.; TATSUMI, M.; MATSUDA, M.; ABUMI, H.; TAKATA, N.; SHIRAHATA, S.; YAMADA, K.; YOSHIKURA, H.; NAGAI, Y. -Interference between D30N and L90M in Selection and Development of Protease Inhibitor-Resistant Human Immunodeficiency Virus Type 1. **Antimicrob. Agents Chemother.**, **46(3)**: 708-715, 2002.

- SULLIVAN, A.D.; WIGGINTON, J. and KIRSCHNER, D. – The coreceptor mutation CCR5 delta 32 influences the dynamics of HIV epidemics and is selected for by HIV. **PNAS**, **98(18)**: 10214-10219, 2001.
- SVEDHEM, V.; LINDKVIST, A.; LINDMAN, K. & SONNERBORG, A. –Persistence of earlier HIV-1 drug resistance mutations at new treatment failure. **J. med. Virol.**, **68**: 473-478, 2002.
- SZWARCWALD, C.L.; BRITO, A.M.; CASTILHO, E.A. –AIDS e infecção pelo HIV no Brasil: uma epidemia multifacetada. **Rev. Da Sociedade Bras. De Medicina Tropical**, **34(2)**: 207-217, 2000.
- TANTILO, C.; DING, J.; JACOBO-MOLINA, A.; NANNI, R.G.; BOYER, P.L.; HUGHES, S.H.; PAUWELS, R.; ANDRIES, K.; JANSSEN, P.A.; ARNOLD, E. -Locations of anti-AIDS drug binding sites and resistance mutations in the three-dimensional structure of HIV-1 reverse transcriptase. Implications for mechanisms of drug inhibition and resistance. **J. Mol. Biol.**, **243**: 369-387, 1994.
- TANURI, A.; CARIDE, E.; DANTAS, M.C.; MORGADO, M.G.; MELLO, D.L., BORGES, S.; TAVARES, M.; FERREIRA, S.B., SANTORO-LOPES, G.; MARTINS, C.R.; ESTEVES, A.L.; DIAZ, R.S.; ANDREO, S.M.; FERREIRA, L.A.; RODRIGUES, R.; REUTER, T.; CAVALCANTI, A.M.; DE OLIVEIRA, S.M.; DE BARBOSA, H.B.; TEIXEIRA, P.R.; CHEQUER, P.N. -Prevalence of mutations related to HIV-1 antiretroviral resistance in Brazilian patients failing HAART. **J Clin Virol** **25**: 39-46, 2002.
- TESS, B.H. et al. –Breastfeeding, genetic, obstetric and other risk factors associated with mother-to-child transmission of HIV-1 in São Paulo State, Brasil. **AIDS**, **12(5)**: 513-520, 1998.
- THEA, D.M. et al and the New York City Perinatal HIV Transmission Collaborative Group. –The effect of maternal viral load on the risk of perinatal transmission of HIV-1. **AIDS**, **11**: 437-444, 1997.



- TINDALL, B.; COOPER, D.A. –Primary HIV infection: host responses and intervention strategies. **AIDS 5(1)**: 1-14, 1991.
- TISDALE, M.; KEMP, S.D.; PARRY, N.R. et al. -Rapid in Vitro Selection of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Resistant to 3'-Thiacytidine-inhibitors due to a mutation in the YMDD Region of Reverse Transcriptase. **Proc Natl Acad Sci USA, 90** : 5653-6, 1993.
- UNAIDS. AIDS EPIDEMIC UPDATE, published jointly by UNAIDS and the World Health Organization. April 2005. Home page: <http://www.unaids.org>.
- YERLY, S.L.; KAISER, E.R.; BRU, F.C.; PERRIN, L. -Transmission of antiretroviral-drug-resistant HIV-1 variants. **J. Lancet., 354**: 729-733, 1999.
- YERLY, S.; VORA, S.; RIZZARDI, P.; CHAVE, J.P.; VERNAZZA, P.L.; FLEPP, M.; TELENTI, A.; BATTEGAY, M.; VEUTHEY, A.L.; BRU, J.P.; RICKENBACH, M.; HIRSCHL, B.; PERRIN, L.; SWISS HIV Cohort Study . -Acute HIV infection: impact on the spread of HIV and transmission of drug resistance. **AIDS, 15(17)**: 2287-2292, 2001.
- WAINBERG, M.A.; SALOMON, H.; GU, Z.; MONTANER, J.S.; COOLEY, T.P.; McCAFFREY, R.; RUEDY, J.; HIRST, H.M.; CAMMACK, N.; CAMERON, J. – Developments of HIV-1 resistance to (-)2'-deoxy-3'-thiacytidine in patients with AIDS or advanced AIDS-related complex. **AIDS, 9**: 351-357, 1995.
- WAINBERG, M.A. and WHITE, A.J. –Current insights into reverse transcriptase inhibitor-associated resistance. **Antivir Ther, 6**: 11-19, 2001.
- WAINBERG, M.A.; BRENNER, B.; ROUTY, J.P.; SPIRA, B.; PETRELLA, M.; ESSEBAG, V.; CONWAY, B.; SEKALY, R.P. - Effect of the M184V mutation in HIV Reverse Transcriptase (RT) on viral fitness in primary infection. **In XIV International AIDS Conference**, Barcelona - Spain, Abstract TuPeB4590, 2002.
- WAIN-HOBSON, S.; SONIGO, P.; DANOS, O.; COLE, S.; ALIZON, M. –Nucleotide sequence of the AIDS virus, LAV. **Cell, 40**: 9-17, 1985.

- WAIN-HOBSON, S. -The HIV -quasispecies: a necessary description. In: Programs and Abstracts of the V International Conference on AIDS; Paris. **Abstract WCO4**, 1989.
- WEISER, S.; WOLFE, W.; BABGSBERG, D.; THIOR, I.; GILBERT, P.; MAKHEMA, J.; KEBABETSWE, P.; DICKENSON, D.; MOMPATI, K.; ESSEX, M.; MARLINK, R. – Barriers to antiretroviral adherence for patients living HIV infection and AIDS in Botswana. **J. Acquir. Immune Defic. Syndr.**, **34(3)**: 281-288, 2003.
- WELLES, S.L.; PITT, J.; COLGROVE, R. et al. –HIV-1 genotypic Zidovudine drug resistance and the risk of maternal-infant transmission in the women and infants transmission study. The women and Infants Transmission Study Group. **AIDS**, **14**: 263-271, 2000.
- WHITCOMB, J.M.; PAXINOS, E.; HUANG, W.; MARANTA, M.; LIMOLI, K.; CHAPPEY, C.; PARKIN, N.T.; HELLMANN, N.S.; and PETROPOULOS, C.J. - The Presence of Nucleoside Analogue Mutations (NAMs) ils Highly Correlated with Reduced Susceptibility to all NRTIs. **9th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections**, Seattle, WA, Abstracts n° 569-T, 2002.
- WILFERT, C.M. –Invasive bacterial infections in children with HIV infection. In: Pizzo PA, eds. Pediatric AIDS – The challenge of HIV infection in infants, children, and adolescents. **Baltimore**: Williams & Wilkins, 117-125, 1998.
- WILSON, J.W. and BEAN, P. -A Physician's Primer to Antiretroviral Drug Resistance Testing. **The AIDS Reader**, **10(8)**: 469-478, 2000.
- WINTERS, M.A.; COOLEY, K.I.; GIRARD, Y.A.; LEVEE, D.J.; HAMDAN, H.; SHAFER, R.W.; KATZENSTEIN, D.A.; MERIGAN, T.C. –A 6-basepair insert in the reverse transcriptase gene of human immunodeficiency virus type 1 confers resistance to multiple nucleoside inhibitors. **J. Clin. Invest.**, **102**: 1769-1775, 1998.
- WINTERS, M.A.; SHAFER, R.W.; JELLINGER, R.; MMTORA, G.; GENGERSAS, T.; MERIGAN, T.C. –Human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase genotype and drug susceptibility changes in infected individuals receiving

dideoxyinosine monotherapy for 1 to 2 years. **Antimicrob. Agents Chemother.**, **41**: 757-762, 1997.

WINTERS, M.A.; HUGHES, M.; LUSTGARTEN, S.; KATZENSTEIN, D.A. –Effect of treatment history and reverse transcriptase gene mutations on response of nucleoside reverse transcriptase inhibitor-experienced patients to combination therapy with zidovudine plus didanosine plus lamivudine [abstract 131]. **Antivir Ther.**, **6(1)**: 96-97, 2001.

WIZNIA, A.A.; CRANE, M.; LAMBERT, G.; SANSARY, J.; HARRIS, A.; SOLOMON, L. –Zidovudine use to reduce perinatal HIV type 1 transmission in an urban medical center. **JAMA**, **275(19)**: 1504-1506, 1996.

WU, Y.; MARSH, J.W. –Gene transcription in HIV infection. **Microbes. Infect.** **5(11)**: 1023-1027. Review, 2003.

VAISHNAV, Y. & WONG-STAAAL, F. –The Biochemistry of AIDS. **Annu. Rev. Biochem.**, **60**: 578-630, 1991.

VIDAL, N.; PEETERS, M.; MULANGA-KABEYA, C.; NZILAMBI, N.; ROBERTSON, D.; ILUNGA, W.; SEMA, H.; TSHIMANGA, K.; BONGO, B.; DELAPORTE, E. –Unprecedented degree of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) group M genetic diversity in the Democratic Republic of Congo suggests that the HIV-1 pandemic originated in Central Africa. **J. Virol.**, **74(22)**: 10498-10507, 2000.

VIDAL, C.; ARNEDO, M.; GARCIA, F.; MESTRE, G.; PLANA, M.; CRUCETA, A.; CAPON, A.; GALLART, T.; MIRO, J.M.; PUMAROLA, T. and GATELL, J.M. – Genotypic and phenotypic resistance patterns in early-stage HIV-1-infected patients failing initial therapy with stavudine, didanosine, and nevirapine. **Antivir. Ther.**, **7**: 283-287, 2002.

ZOLOPA, A.R.; SHAFER, R.W.; WARFORD, A.; MONTAYA, J.G.; HSU, P.; KATZENSTEIN, D.; MERIGAN, T.C.; EFRON, B. –HIV-1 genotypic resistance patterns predict response to saquinavir-ritonavir therapy in patients in whom

previous protease inhibitor therapy had failed. **Ann. Intern. Med.**, **131**: 813-821, 1999.

**ANEXO A****PROTOCOLO: PERFIL GENOTÍPICO DO HIV-1 EM CRIANÇAS INFECTADAS TRATADAS E NÃO TRATADAS COM ANTI-RETROVIRAIS /HINSG/2005/Vitória – ES**

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

Data de Nascimento: \_\_\_\_\_ Sexo: \_\_\_\_\_ Procedência \_\_\_\_\_

Primeiro nome da mãe: \_\_\_\_\_ Profilaxia pré-natal: Sim Não

Via contaminação: \_\_\_\_\_ Exposição da mãe: \_\_\_\_\_

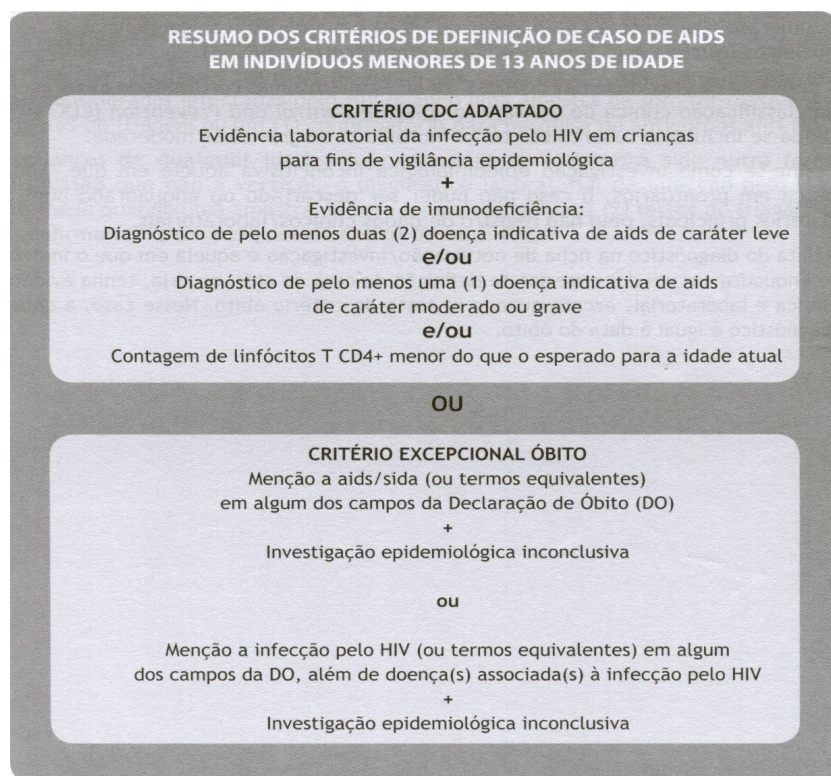
Amamentação: Sim ( ) Não( ) Ano do Diagnóstico: \_\_\_\_\_

<b>DATA</b>	
Carga Viral cp/ml	
Log carga viral	
CD4 absoluto	
CD4 percentual	
CD8 absoluto	
Classificação	
Tempo de diagnóstico	
Tempo de tratamento total	
Tempo Trat. ARV atual	
Mutações códons ITRN	
Mutações códons ITRNN	
Mutações códons protease	
Esquema de ARV atual	
Esquemas de ARV anteriores:	

**ANEXO B**

– 1

**Crítérios  
de  
definição  
de caso de  
Aids em  
crianças  
(menores  
de 13 anos  
de idade)**



Quadro 1 – Critérios de definição de caso de aids em crianças (menores de 13 anos de idade)

Fonte: Ministério da Saúde, Brasil, 2004

### Notas Explicativas

São testes de triagem para a detecção de anticorpos anti-HIV: várias gerações de ensaio por imunoabsorbância ligado à enzima (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*, ELISA), ensaio imunoenzimático (*Enzyme Immuno Assay*, EIA), ensaio imunoenzimático com micropartículas (*Microparticle Enzyme Immuno Assay*, MEIA) e ensaio imunoenzimático com quimioluminiscência.

São testes confirmatórios: imunofluorescência indireta, imunoblot, *Western Blot*, teste de amplificação de ácidos nucléicos como, por exemplo, a reação em cadeia de polimerase (*Polierase Chain Reaction*, PCR) e a amplificação seqüencial de ácidos nucléicos (*Nucleic Acid Sequence Base Amplification*, NASBA).

## ANEXO B – 2

Evidência laboratorial da infecção pelo HIV em crianças para fins de vigilância epidemiológica

Para os **menores de 18 meses de idade**, expostos ao HIV por transmissão vertical, considera-se infectada quando houver a presença de RNA ou DNA viral detectável acima de 1.000 cópias / ml em 2 amostras (testes de carga viral) obtidas em momentos diferentes, preferencialmente coletadas após o segundo mês de vida, em virtude do aumento da sensibilidade observado a partir dessa idade, podendo, entretanto ser realizado após duas semanas de vida.

Crianças com **18 meses ou mais de idade**, expostas ao HIV por transmissão vertical, serão consideradas infectadas quando uma amostra de soro for reativa em dois (2) testes de triagem ou um (1) confirmatório para pesquisa de anticorpos anti-HIV.

Em crianças **de qualquer idade**, cuja exposição ao HIV tenha sido **outra forma de transmissão que não a transmissão vertical**, o diagnóstico laboratorial de infecção pelo HIV será confirmado quando uma amostra de soro for reativa em dois (2) testes de triagem ou um (1) confirmatório para pesquisa de anticorpos anti-HIV.

#### Evidência laboratorial de imunodeficiência:

#### Contagem de linfócitos T CD4+ de acordo com a idade da criança

CONTAGEM DE LINFÓCITOS T CD4+ DEFINIDORA DE IMUNODEFICIÊNCIA DE ACORDO COM A IDADE	
FAIXA ETÁRIA	CONTAGEM TOTAL E PERCENTUAL
Inferior a 12 meses	<1.500 células por mm <sup>3</sup> (< 25%)
1 a 5 anos	<1.000 células por mm <sup>3</sup> (< 25%)
6 a 12 anos	<500 células por mm <sup>3</sup> (< 25%)

Quadro 2 – Contagem de linfócitos T CD4+ definidora de imunodeficiência de acordo com a idade  
Fonte: Ministério da Saúde, Brasil, 2004

## ANEXO C

**INDICAÇÕES PARA INÍCIO DE TERAPIA ANTI-RETROVIRAL EM CRIANÇAS INFECTADAS PELO HIV, DE ACORDO COM A CLASSIFICAÇÃO DO GUIA DE**

TRATAMENTO CLÍNICO DA INFECÇÃO PELO HIV EM CRIANÇAS -2004, MINISTÉRIO DA SAÚDE				
Alteração Imunológica	N	A	B	C
Ausente (1)	*N1	*A1	**B1	***C1
Moderada (2)	**N2	***A2	***B2	***C2
Grave (3)	***N3	***A3	***B3	***C3

\*Não tratar, observar.  
 \*\*Considerar tratamento.  
 \*\*\*Tratar.

### ANEXO C

CATEGORIA IMUNOLÓGICA DA CLASSIFICAÇÃO DA INFECÇÃO PELO HIV NA CRIANÇA (MENORES DE 13 ANOS) - GUIA DE TRTAMENTO CLÍNICO DA INFECÇÃO PELO HIV EM CRIANÇAS –2004, MINISTÉRIO DA SAÚDE.			
Alteração Imunológica	Idade	Contagem de células TCD4+ nº absoluto (%)	
	< 12 meses	1 a 5 anos	6 a 12 anos
Ausente (1)	$\geq 1500$ ( $>25\%$ )	$\geq 1000$ ( $>25\%$ )	$\geq 500$ ( $>25\%$ )
Moderada (2)	750-1499	500-999	200-499



	(15-24%)	(15-24%)	(15-24%)
<b>Severa (3)</b>	<750 (<15%)	<500 (<15%)	<200 (<15%)

<b>CLASSIFICAÇÃO DA INFECÇÃO PELO HIV EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES MENORES DE 13 ANOS - GUIA DE TRATAMENTO CLÍNICO DA INFECÇÃO PELO HIV EM CRIANÇAS –2004, MINISTÉRIO DA SAÚDE.</b>				
<b>Alteração Imunológica</b>	<b>N= Ausência de sinais e/ou sintomas clínicos</b>	<b>A= Sinais e/ou sintomas clínicos leves</b>	<b>B= Sinais e/ou sintomas clínicos moderados</b>	<b>C= Sinais e/ou sintomas clínicos graves</b>
<b>Ausente (1)</b>	N1	A1	B1	C1
<b>Moderado (2)</b>	N2	A2	B2	C2
<b>Severa (3)</b>	N3	A3	B3	C3

**N:** Assintomática

Ausência de sinais e/ou sintomas; ou com apenas uma das condições da categoria A.

**Categoria A:** Sinais e/ou sintomas leves:

- Linfadenopatia (>0,5 cm em mais de 2 cadeias diferentes);
- Hepatomegalia;
- Esplenomegalia;
- Parotidite; e
- Infecções persistentes ou recorrentes de vias aéreas superiores (otite média ou sinusite).

Presença de 2 ou mais das condições acima, porém sem nenhuma das condições das categorias B e C.

**Categoria B:** Sinais e/ou sintomas moderados:

- Anemia (Hb < 8g/dl), neutropenia (<1.000/mm<sup>3</sup>) ou trombocitopenia (<1000.000/mm<sup>3</sup>), por mais de 30 dias;
- Meningite bacteriana, pneumonia ou sepse;
- Candidíase oral persistindo por mais de 2 meses;
- Miocardiopatia;
- Infecção por Citomegalovírus (CMV), antes de 1 ano de vida;
- Diarréia recorrente ou crônica;
- Hepatite;
- Estomatite pelo vírus *Herpes simplex* (HSV) recorrente (mais do que 2 episódios/ano);
- Pneumonite ou esofagite por HSV, com início antes de 1 mês de vida;
- Herpes zoster, com 2 episódios ou mais de um dermatomo;
- Pneumonia intersticial linfocítica (PIL);
- Nefropatia;
- Nocardiose;
- Febre persistente(> 1 mês);
- Toxoplasmose antes de 1 mês de vida; e
- Varicela disseminada ou complicada.

**Categoria C:** Sinais e/ou sintomas graves. Crianças com quaisquer das categorias listadas abaixo:

- Infecções bacterianas graves, múltiplas ou recorrentes(confirmadas por cultura, 2 episódios em intervalo de 1 ano): septicemia, pneumonia, meningite, infecções osteo-articulares, abscessos de órgãos internos;
- Candidíase esofágica ou pulmonar;
- Coccidioidomicose disseminada;
- Criptococose extrapulmonar;
- Criptosporidíase ou isosporíase com diarréia (>1mês);
- CMV em locais além do fígado, baço ou linfonodos, a partir de 1 mês de vida;
- Encefalopatia pelo HIV (achados que persistem por mais de 2 meses);

- Infecção por HSV, úlceras mucocutâneas com duração >1mês ou pneumonite ou esofagite(crianças >1mês de vida);
- Histoplasmoze disseminada;
- *Mycobacterium tuberculosis* disseminada;
- *Mycobacterium* ou outras espécies disseminadas;
- *Mycobacterium avium* ou *M. kansasii* disseminados;
- Pneumonia por *Pneumocystis carinii*;
- Salmonelose disseminada recorrente;
- Toxoplasmose cerebral com início após o primeiro mês de vida;
- Síndrome da caquexia;
- Leucoencefalopatia multifocal progressiva;
- Sarcoma de Kaposi; e Linfoma primário do cérebro e outros linfomas.

## ANEXO D

### Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

#### **PESQUISA: PERFIL GENOTÍPICO DO HIV-1 EM CRIANÇAS INFECTADAS TRATADAS E NÃO TRATADAS COM ANTI-RETROVIRAIS**

O objetivo desse estudo consiste em avaliar a frequência e o nível de resistência à drogas do HIV-1 em crianças infectadas, tratadas e não tratadas, que surgem decorrentes de mutações no genoma viral, através do exame de Genotipagem, relacionando com a classificação clínico-imunológica, com a Carga Viral, Contagem de Linfócitos T CD4+ e com o regime de antiretroviral em uso naquelas em tratamento. Os resultados serão analisados e avaliados no final, produzindo informações úteis para os

médicos e para os pacientes. O estudo não envolve nenhum tratamento diferente do que seria feito caso o paciente não participasse da pesquisa.

O pesquisador principal garante que haverá sigilo em relação aos dados obtidos, pois os mesmos serão analisados em conjunto com dados de vários pacientes-participantes, não sendo divulgada a identidade de nenhum.

A participação no estudo não causará nenhuma despesa para o paciente-participante, nem para o responsável pelo mesmo.

Durante a pesquisa, o paciente-participante ou qualquer responsável pelo mesmo poderá ter acesso ao pesquisador principal, Dr<sup>a</sup> Elizabete Pires Yamaguti, no Hospital Infantil Nossa Senhora da Glória, Alameda Mary Ubirajara, 205, Santa Lúcia, Vitória-ES, ou pelo telefone (027)3324-1566.

Acredito ter informações suficientes a respeito da pesquisa que será realizada e concordo que os dados obtidos do (a) menor \_\_\_\_\_, pelo qual sou responsável, sejam utilizados no estudo.

\_\_\_\_\_ (responsável legal)

Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

\_\_\_\_\_ (testemunha)

Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o consentimento livre e esclarecido do responsável legal pelo paciente acima identificado, para que o mesmo participe do estudo.

\_\_\_\_\_ (médico especialista)

Data \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)