



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Faculdade de Ciências Médicas

Sandra Regina Rodrigues Simonetti

**HIV-1: avaliação da resistência às drogas antiretrovirais em pacientes
pediátricos**

Rio de Janeiro
2009

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Sandra Regina Rodrigues Simonetti

**HIV-1: avaliação da resistência às drogas antiretrovirais em
pacientes pediátricos**

Tese apresentada, como requisito para a obtenção do título de Doutora em Ciências Médicas, ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Fisiopatologia Clínica.

Orientadores: Prof^a. Dra. Dirce Bonfim de Lima
Prof. Dr. José Pascoal Simonetti
Prof. Dr. Hermann Gonçalves Schatzmayr

Rio de Janeiro
2009

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

S598 Simonetti, Sandra Regina Rodrigues.

HIV-1: avaliação da resistência às drogas antiretrovirais em pacientes pediátricos / Sandra Regina Rodrigues Simonetti. – 2009.
xiv, 125 f. il.

Orientadores: Dirce Bonfim de Lima, José Pascoal Simonetti, Hermann Gonçalves Schatzmayr.

Tese (Doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Pós Graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental.
Bibliografia: f. 112-125.

1. HIV (vírus) – Efeitos de drogas. 2. Anti-retrovirais – Efeitos adversos.
3. HIV-1 – Efeitos de drogas – Teses. 4. Crianças – Doenças – Teses. I. Lima, Dirce Bonfim de. II. Simonetti, José Pascoal. III. Schatzmayr, Hermann Gonçalves. IV. Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. V. Título.

CDU 614.253.5

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese.

Assinatura

Data

Sandra Regina Rodrigues Simonetti

**HIV-1: avaliação da resistência às drogas antiretrovirais em
pacientes pediátricos**

Tese apresentada, como requisito para a obtenção do título de Doutora em Ciências Médicas, ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Fisiopatologia Clínica.

Aprovada em 19 de Fevereiro de 2009.

Banca Examinadora:

Prof^a. Dra. Dirce Bonfim de Lima (orientadora)
Faculdade de Ciências Médicas da UERJ

Prof^a. Dra. Eliane Pedra Dias
Centro de Ciências Médicas da UFF

Prof. Dr. Antonio Felipe Sanjuliani
Faculdade de Ciências Médicas da UERJ

Prof. Dr. José Hermógenes Rocco Suassuna
Faculdade de Ciências Médicas da UERJ

Prof. Dr. José Mauro Peralta
Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes da UFRJ

Rio de Janeiro
2009

DEDICATÓRIA

Este trabalho é dedicado às crianças atendidas no Departamento Materno Infantil do Hospital Universitário Pedro Ernesto, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Brasil, que fazem parte de um universo composto por 2,5 milhões de casos de crianças, abaixo de 15 anos de idade, infectadas por HIV.

AGRADECIMENTOS

À Dra. Dirce Bonfim de Lima, Faculdade de Ciências Médicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, como orientadora deste trabalho, pela grande amizade e constante apoio, sugestões e correções.

Ao Dr. Hermann Gonçalves Schatzmayr, Grupo de Poxvirus do Laboratório de Ultraestrutura e Morfologia Viral do Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, coorientador, pelo apoio, incentivo e colaboração.

Ao Dr. José Pascoal Simonetti, Plataforma NB3 do Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, coorientador, pelo apoio pessoal e científico, incentivo e grande colaboração na execução dos testes e interpretação dos resultados.

À Dra. Izabel Christina Nunes de Palmer Paixão, Departamento de Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal Fluminense, revisora, pela criteriosa análise e pertinentes críticas e sugestões.

Aos Dra. Denise Cardoso Neves Sztajnbok, Dr. Marcos Junqueira do Lago e equipe, do Departamento Materno Infantil do Hospital Universitário Pedro Ernesto, responsáveis pelo acompanhamento clínico das crianças incluídas neste estudo, por sua incansável luta contra a AIDS e maravilhoso trabalho desenvolvido.

Ao Bruno Rodrigues Simonetti, Grupo de Poxvirus do Laboratório de Ultraestrutura e Morfologia Viral do Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, pela enorme colaboração na coleta de dados dos pacientes analisados.

Ao meu pai, à memória de minha mãe e aos meus irmãos que sempre me apoiaram e incentivaram para que eu alcançasse meus objetivos.

Aos meus filhos Bruno e André e ao Zé pelo carinho, compreensão, apoio e grande amor que nos une que, com certeza, contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

RESUMO

SIMONETTI, Sandra Regina Rodrigues. *HIV-1: avaliação da resistência às drogas antiretrovirais em pacientes pediátricos*. 2009. 125f. Tese (Doutorado em Fisiopatologia Clínica e Experimental). Faculdade de Ciências Médicas. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro. 2009.

A utilização da terapia antiretroviral, atualmente mais amplamente acessível, implica na permanência da identificação da resistência viral e monitoramento da doença como itens importantes em adultos e pacientes pediátricos infectados pelo vírus da imunodeficiência humana tipo 1. Os principais marcadores da infecção por HIV-1, utilizados no monitoramento da infecção e curso da doença, são as contagens de células T CD4+ e a carga viral. Ambos são úteis como parâmetros indicadores para o início da terapia e na avaliação de sua eficácia. Além disto, a sua associação a testes de genotipagem para a identificação de mutações de resistência viral, pode auxiliar na indicação da conduta clínica mais adequada. No presente estudo, analisamos os valores da carga viral e taxas de linfócitos T CD4+ e CD8+ na avaliação do status imunológico de 25 crianças com indicação para a terapia antiretroviral, condicionando o regime terapêutico aos resultados do teste de genotipagem. A identificação dos subtipos virais foi feita por análise filogenética e a genotipagem incluiu a análise dos genes protease e transcriptase reversa do HIV-1. Dezoito amostras foram agrupadas no subtipo viral B e três no subtipo F1; cepas recombinantes também foram observadas, sendo uma BF, duas BD e uma DF. Dezoito crianças apresentaram mutações conferindo resistência viral aos inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeo e sete crianças apresentaram resistência aos inibidores não-análogos, com seis relatando resistência a nevirapina, delavirdina e efavirenz. Além disto, duas crianças, nas quais a terapia havia sido descontinuada dois a três anos antes da avaliação do teste de genotipagem, apresentaram as mutações K101E, K103N e G190A, conferindo resistência às três drogas. As mutações mais frequentes para o gene da transcriptase reversa foram observadas nos codons M41L, M184V e T215FY. Entretanto, dez crianças apresentaram relevante número de mutações de resistência viral, variando entre cinco a dez, que conferiram resistência a no mínimo quatro e até onze drogas antiretrovirais. Para o gene da protease, as mutações de resistência mais comuns foram observadas nos codons M46I, D30N e I54LV. Treze crianças apresentaram resistência viral a, no mínimo, duas e até 12 drogas. A adequação da terapia antiretroviral altamente potente (HAART), de acordo com o padrão de resistência viral, permitiu observar aumento dos valores de células T CD4+ em 12 dos 25 pacientes pediátricos, demonstrando melhoria na sua condição de imunodeficiência associada ao HIV. Decréscimos importantes da carga viral foram observados em 17 crianças, com níveis indetectáveis de RNA HIV alcançados em 13 delas, sendo 11 com linhagens virais resistentes a múltiplas drogas. O desenvolvimento de linhagens virais resistentes é uma das principais razões da falha terapêutica. Mesmo considerando outros fatores causais, tais como aderência, metabolismo e níveis adequados das drogas, a identificação do perfil de resistência viral é um importante fator na conduta para a adequação de esquemas terapêuticos, dando suporte ao uso racional das drogas antiretrovirais em programas de tratamento.

Palavras-chave: Genotipagem do HIV-1. Resistência viral. Linfócitos T. População pediátrica.

ABSTRACT

With antiretroviral therapy becoming more widely available nowadays, Human Immunodeficiency Virus type 1 resistance identification and monitoring of disease remains of great importance in adults and infected children. The major HIV-1 infection markers usually used for monitoring viral infection and disease course are CD4+ T cell counts or percentages and HIV viral load. Both of them are helpful indicating when to start therapy and evaluating its efficacy. Also, their association with genotyping tests to identify viral resistant mutations may help clinicians for the most adequate clinical conduct. In the present study, we assessed HIV-1 viral load and CD4+ and CD8+ T lymphocyte rates for the immunological status evaluation of 25 antiretroviral-treated children managing therapeutic regimens according to genotyping test results. Drug resistance evaluation was done using genotyping covering protease and reverse transcriptase genes. Additionally, all of the 25 vertically HIV-1 infected children were assessed for viral subtyping throughout phylogenetic analysis. Eighteen samples clustered at B subtype and three clustered at F1 subtype; one BF, two BD and one DF recombinant strains were also observed. Eighteen children presented, at least, one mutation conferring resistance to the nucleoside reverse transcriptase inhibitors, and seven children presented resistance to the non-nucleoside inhibitors, with six resistant to all three drugs, nevirapine, delavirdine, and efavirenz. In addition, two children in whom the therapy had been discontinued two to three years before testing presented K101E, K103N, and G190A mutations conferring resistance to the all three drugs. Reverse transcriptase gene mutations were more frequently observed at codons M41L, M184V, and T215FY. However, ten children presented an important number of viral resistance mutations, ranging from five to ten mutations, conferring resistance to at least four to up to eleven antiretroviral drugs. Protease gene mutations were more frequently seen at codons M46I, D30N, and I54LV. Thirteen children presented viral resistance to at least two to up to twelve drugs. The management of the highly active antiretroviral therapy (HAART) according to viral resistance in our group of pediatric patients allowed an increase in CD4+ T cell counts and/or percentage in 12 of the 25 children, showing an improvement in their HIV-associated immunodeficiency status. Important viral burden declines were observed in 17 children, and HIV RNA undetectable levels were reached in 13 of them. Among these 17 children, 11 were multi-drug resistant. The development of resistant viral strains is one of the main reasons for failure of antiretroviral therapy. Even considering other causal factors such as compliance of the patient, metabolism of drugs and drug levels, viral resistance profile identification is an important factor in the management of therapeutic regimens, supporting the rational use of antiretroviral drugs by treatment programs.

Keywords: HIV-1 genotyping. Drug resistance. T lymphocytes. HIV-infected children

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Microscopia eletrônica de partículas HIV purificadas.	17
Figura 2 - Representação esquemática de partículas HIV incompleta e completa.	18
Figura 3 - Representação do genoma do HIV, indicando a disposição de genes virais essenciais e acessórios.	20
Figura 4 - Sítios de clivagem catalisada pela protease do HIV-1.	21
Figura 5 - Etapas do ciclo de replicação viral.	27
Figura 6 - Distribuição geográfica global das predominantes formas genéticas do HIV-1.	39
Figura 7 - Ciclo de replicação do HIV-1 e sítios de ação das drogas antiretrovirais.	42
Figura 8 - Estrutura química de alguns inibidores de transcriptase reversa análogos de nucleosídeo.	43
Figura 9 - Estrutura química dos compostos zidovudina e estavudina, exemplificando o mecanismo de bloqueio da síntese da cadeia de DNA.	44
Figura 10 - Estrutura química de compostos inibidores de transcriptase reversa não análogos de nucleosídeo.	46
Figura 11 - Estrutura química de alguns compostos inibidores de protease.	48
Figura 12 - Representação esquemática da subunidade p66, com sítios de mutações de resistência a vários inibidores de RT.	59
Figura 13 - Sítios de ligação aos NNRTIs estão próximos ao sítio hidrofóbico da subunidade p66.	61
Figura 14 - Modelo estrutural do homodímero - protease do HIV-1, com mutações de resistência aos PIs indicadas em uma das subunidades.	62
Figura 15 - Análise dos eletroferogramas e interpretação dos resultados.	79
Figura 16a - Árvore filogenética construída com base na seqüência de nucleotídeos do gene da protease do HIV-1, indicando os valores de bootstrap, para a identificação do subtipo viral da amostra HUPE 15.	90
Figura 16b - Árvore filogenética construída com base na seqüência de nucleotídeos do gene da transcriptase reversa do HIV-1, indicando os valores de bootstrap, para a identificação do subtipo viral da amostra HUPE 15.	90

Figura 17a - Árvore filogenética construída com base na seqüência de nucleotídeos do gene da protease do HIV-1, indicando os valores de bootstrap, para a identificação do subtipo viral da amostra HUPE 17.	91
Figura 17b - Árvore filogenética construída com base na seqüência de nucleotídeos do gene da transcriptase reversa do HIV-1, indicando os valores de bootstrap, para a identificação do subtipo viral da amostra HUPE 15.	91
Quadro 1 - Classificação da infecção pelo HIV em crianças e adolescentes menores de 13 anos, relacionada a sintomas clínicos e alteração imunológica.	53
Quadro 2 - Categorias imunológicas da classificação da infecção por HIV em crianças e adolescentes abaixo de 13 anos	54
Gráfico 1 - Distribuição da freqüência de mutações de resistência aos NRTIS e NNRTIs em pacientes pediátricos infectados por HIV-1 subtipo B.	92
Gráfico 2 - Distribuição da freqüência de mutações em RT, em pacientes pediátricos infectados por HIV-1 subtipo F1 e recombinantes virais.	93
Gráfico 3 - Distribuição da freqüência de polimorfismos e mutações de resistência aos PIs em pacientes pediátricos infectados por HIV-1 subtipo B.	94
Gráfico 4 - Distribuição da freqüência de mutações e polimorfismos em PR, em pacientes pediátricos infectados por HIV-1 subtipo F1 e recombinantes virais.	95

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dados de HIV/AIDS na América Latina, em 2007.	36
Tabela 2 - Número estimado de indivíduos infectados por HIV, no período compreendido entre os anos de 1990 a 2007, no Brasil.	37
Tabela 3 - Número estimado de mortes por AIDS em indivíduos adultos e crianças, no período compreendido entre os anos de 1990 a 2007, no Brasil.	38
Tabela 4 - Regime terapêutico com NRTIs e NNRTIs em vigência na avaliação do teste de genotipagem, mutações em RT e resistência viral em pacientes pediátricos infectados por HIV-1.	83
Tabela 5 - Distribuição da freqüência das mutações de resistência viral aos NRTIs, de acordo com a lista de mutações do banco de dados da universidade de Stanford (Stanford HIV Drug Resistance Database).	84
Tabela 6 - Regime terapêutico com inibidores de protease em vigência na avaliação do teste de genotipagem, mutações em PR e resistência viral em pacientes pediátricos infectados por HIV-1.	86
Tabela 7 - Distribuição da freqüência de polimorfismos e mutações de resistência viral aos PIs, de acordo com a lista de mutações do banco de dados da universidade de Stanford (Stanford HIV Drug Resistance Database).	87
Tabela 8 - Dados clínicos e laboratoriais referentes às crianças em terapia HAART, apresentando modificações no regime terapêutico.	89
Tabela 9 - Parâmetros clínicos e laboratoriais referentes às crianças em tratamento HAART, sem alteração do esquema terapêutico.	97
Tabela 10 - Dados comparativos para a genotipagem do HIV-1: Stanford HIV Drug Resistance Database e análise filogenética.	99

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABC - abacavir
AIDS - síndrome da imunodeficiência adquirida
APV - amprenavir
ATV - atazanavir
AZT - zidovudina
ddC - zalcitabina
ddl - didanosina
DLV - delavirdina
dNTP's - desoxirribonucleotídeos fosfatados
d4T - estavudina
DRV/TMC 114 - darunavir
EFV - efavirenz
ENF/T-20 - enfuvirtide
FPV - fosamprenavir
FTV - emtricitabina
gp - glicoproteína
HAART - terapia antiretroviral altamente potente
HIV - vírus da imunodeficiência humana
IDV - indinavir
NFV - nelfinavir
NNRTIs - inibidores de transcriptase reversa não análogos de nucleosídeo
NRTIs - inibidores de transcriptase reversa análogos de nucleosídeo
NtRTI - inibidor de transcriptase reversa análogo de nucleotídeo
NVP - nevirapina
PBS – primer binding site
PIs - inibidores de protease
PR - protease
RT - transcriptase reversa
RTV - ritonavir
SQV - saquinavir
TAMs - mutações aos análogos de timidina
TDF - tenofovir disoproxil fumarato

TPV - tipranavir

3TC - lamivudina

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	15
1	CONSIDERAÇÕES GERAIS EM VIROLOGIA E BIOLOGIA MOLECULAR	17
1.1	Morfologia e estrutura viral	17
1.2	Organização do genoma viral	20
1.3	Genes virais acessórios e regulatórios.....	22
1.4	Patogênese da infecção por HIV	25
1.4.1	<u>Replicação viral</u>	26
1.4.2	<u>HIV e sistema imune</u>	30
1.4.3	<u>Imunopatogênese da infecção por HIV em pediatria</u>	32
1.5	Dinâmica viral e <i>quasi-species</i>	34
2	EPIDEMIOLOGIA	35
2.1	Infecção por HIV-1 em pacientes pediátricos	35
2.2	Distribuição geográfica dos subtipos do HIV-1	38
3	DROGAS ANTIRETROVIRAIS	41
3.1	Inibidores da transcriptase reversa	42
3.2	Inibidores de protease	47
3.3	Medicações atuais	49
4	TERAPIA ANTIRETROVIRAL ALTAMENTE POTENTE (HAART)	50
4.1	Terapia antiretroviral em crianças infectadas por HIV	52
4.1.1	<u>Parâmetros imunológicos e virológicos</u>	52
4.1.2	<u>Esquemas terapêuticos</u>	55
5	MUTAÇÕES E RESISTÊNCIA AOS ANTIRETROVIRAIS	56
5.1	Padrões de resistência viral	56
5.2	Mutações de resistência aos NRTIs	57
5.3	Mutações de resistência aos NNRTIs	60
5.4	Mutações de resistência aos PIs	61
5.5	Mutações de resistência aos inibidores de fusão	63
5.6	Mutações de resistência aos inibidores de integrase	64
6	MODELAGEM MOLECULAR	65
7	SUBTIPOS VIRAIS E RESISTÊNCIA AO HIV-1	67
7.1	Subtipos genéticos do HIV-1	67
7.2	Subtipos e resistência viral	68
8	OBJETIVOS	72
8.1	Objetivo primário	72
8.2	Objetivos secundários	72
9	CASUÍSTICA	73
9.1	Pacientes	73
9.2	Critérios de inclusão	73
9.3	Termo de consentimento	73
10	DESENHO DE ESTUDO E PLANO DE TRABALHO	74
11	PROCEDIMENTOS E MÉTODOS LABORATORIAIS	75
11.1	Parâmetros clínicos	75
11.1.1	<u>Categorias clínicas</u>	75
11.1.2	<u>Terapia antiretroviral</u>	75
11.2	Procedimentos laboratoriais	76
11.2.1	<u>Processamento das amostras de sangue</u>	76
11.2.2	<u>Carga viral</u>	76

11.2.3	<u>Citometria de fluxo</u>	76
11.2.4	<u>rt-PCR e genotipagem</u>	77
11.2.5	<u>Análise filogenética</u>	79
12	RESULTADOS	81
12.1	Genotipagem do HIV-1 e resistência viral	81
12.2	Resistência viral aos NRTIs e NNRTIs	81
12.3	Resistência viral aos PIs	84
12.4	Subtipagem do HIV-1	88
12.5	Perfil de mutações em amostras de subtipos B e não-B	92
12.6	Carga viral, avaliações de CD4 e CD8 e terapia	96
12.7	Linfócitos T CD4 + e imunodeficiência associada ao HIV	101
13	DISCUSSÃO	103
14	CONCLUSÕES	111
	REFERÊNCIAS	112

INTRODUÇÃO

O mecanismo de resistência do vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1) às drogas antiretrovirais ocorre, principalmente, através do desenvolvimento de mutações genômicas em regiões que codificam as enzimas envolvidas no processo de replicação viral e sítios específicos do envelope viral, responsáveis pela interação vírus-célula. Em consequência, as funções enzimáticas e estruturais mantêm-se inalteradas na presença de inibidores virais e o processo de replicação viral ocorre normalmente, contribuindo para a falha terapêutica.

A prevenção, controle e caracterização da resistência viral estão suscitando interesse e estudos cada vez mais crescentes em populações pediátricas, uma vez que crianças infectadas por HIV-1 apresentam comportamento peculiar frente à infecção, com cargas virais plasmáticas superiores àquelas observadas em adultos e, na ausência de tratamento, evoluem à doença mais rapidamente, com média de tempo de evolução à AIDS de 4,8 anos, a partir da infecção.

O tratamento da doença inclui os inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeo e nucleotídeo (NRTIs e NtRTI), inibidores da transcriptase reversa não-análogos de nucleosídeo (NNRTIs), inibidores de protease (PIs) e, mais recentemente, foram incluídos os inibidores de fusão, inibidores de entrada, atuando em co-receptores ligados à penetração viral na célula hospedeira, e os inibidores de integrase. Entretanto, a emergência de mutantes HIV, relacionada à falha terapêutica, tem dificultado possibilidades de esquemas de tratamento.

Testes de resistência viral podem ser úteis, esclarecendo aspectos da interação droga-hospedeiro e, quando associados aos valores de carga viral e células T CD4(+), podem auxiliar na determinação de alterações de regimes terapêuticos, objetivando o melhor efeito antiviral, ou na introdução do regime antiviral.

A decisão de início da terapia em pacientes pediátricos é peculiarmente criteriosa, considerando-se riscos e benefícios e o potencial de adesão ao tratamento.

Determinações da resistência genotípica do HIV-1, principalmente em populações pediátricas, que consistem em fundamental contribuição aos dados disponíveis na literatura mundial, são importantes em determinados ensaios clínicos, auxiliando a conduta médica não só em relação à falha terapêutica como

também orientando o início do tratamento, particularmente em áreas onde a resistência primária às drogas é relevante.

O presente trabalho objetiva, fundamentalmente, detectar e identificar mutações que conferem resistência viral às drogas antiretrovirais conhecidas e disponíveis, utilizadas no tratamento de pacientes pediátricos, infectados verticalmente por HIV-1, atendidos no Departamento Materno-Infantil do Hospital Universitário Pedro Ernesto da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, UERJ-RJ, Brasil.

Em adição ao seu principal objetivo, aspectos virais específicos serão analisados na população selecionada, tais como subtipos virais identificados através da análise filogenética, perfil de mutações em amostras de subtipos B e não-B, presença de recombinantes virais e avaliação dos valores de carga viral e taxas de células T CD4(+) relacionados às terapias pregressas e atuais, em função dos resultados do teste de genotipagem.

Temos observado, recentemente, um significativo aumento no número de trabalhos científicos relacionados à genotipagem do HIV-1 em crianças infectadas verticalmente. Entretanto, o valor destes ensaios, na orientação do tratamento antiretroviral, não foi, ainda, estabelecido. Porém, é recomendável que eles sejam executados em casos de falha terapêutica, na vigência de terapia antiretroviral.

1 CONSIDERAÇÕES GERAIS EM VIROLOGIA E BIOLOGIA MOLECULAR

1.1 Morfologia e Estrutura Viral

Os vírus da imunodeficiência humana (HIV), gênero *Lentivirus*, família *Retroviridae*, foram classificados de acordo com propriedades estruturais e genômicas em dois tipos, HIV-1 e HIV-2 (Myers & Pavlakis, 1992). O HIV-1, originalmente descrito por pesquisadores liderados por Luc Montagnier e Robert Gallo (Barré-Sinoussi et al. 1983; Gallo et al., 1984), apresenta três principais grupos de linhagens similares, designados M (*major* ou *main*), O (*outlier*) e N (*new* ou *non-M/non-O*). A maioria das infecções por HIV-1 é causada por linhagens agrupadas em M, geneticamente distintas, reconhecidas como subtipos filogenéticos ou clades. Para o HIV-1 estas linhagens se classificam de “A” a “H”, “J” e “K” e para o HIV-2 de “A” a “E” (Ayoub et al., 2000; Gao et al., 1994; Gutler et al., 1994; Simon et al., 1998; WHO, 1994).

Células suscetíveis, linfócitos ou monócitos, infectadas por HIV-1 e HIV-2 produzem partículas virais bastante similares em sua morfologia e composição (Munn et al., 1985). As partículas virais completas, *virions*, em formato esférico, com aproximadamente 110 nm de diâmetro, apresentam envoltório externo, constituindo uma membrana lipídica de camada dupla (envoltório ou envelope) circundando o capsídeo e o nucleocapsídeo viral, em forma de cone (Figuras 1 e 2).

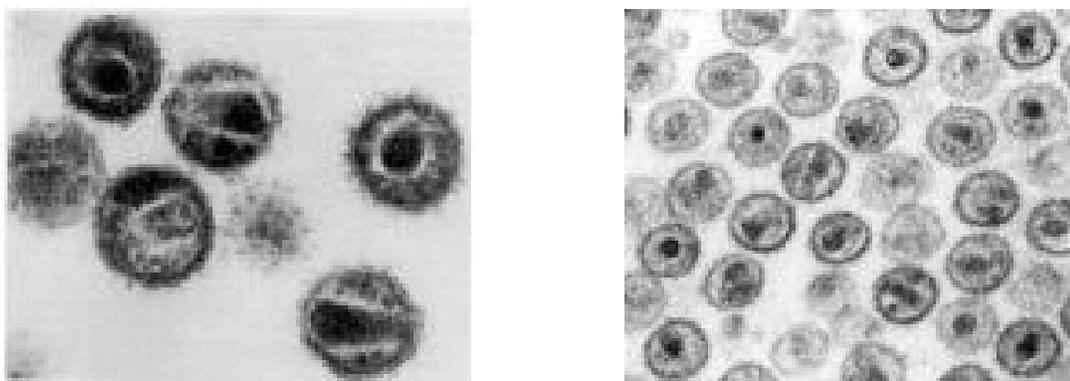


Figura 1: Microscopia eletrônica de partículas HIV purificadas. [acesso em 18/07/2007]. Disponível em: <http://www.ovc.uoguelph.ca/HIVbw.gif> 247 x 203 44.7kB; <http://www.freerepublic.com> 609 x 500 - 101k - jpg.

A membrana lipídica, derivada da célula hospedeira, contém aproximadamente 72 espículas (“*spikes*” ou “*knobs*”) com simetria triangular (Gelderblom, 1991), que se apresentam com 9 a 10 nm de comprimento com terminação distal arredondada, com 14 a 15 nm de diâmetro, contendo quatro heterodímeros da glicoproteína do envelope, compostos por subunidades de superfície que interagem com as subunidades transmembrana. As subunidades de superfície e transmembrana estão associadas, respectivamente, às glicoproteínas virais gp120 e gp41 para HIV-1 e gp130 e gp41 para HIV-2, ligadas não covalentemente. A glicoproteína de superfície (SU) constitui-se no principal antígeno viral e a proteína transmembrana (TM) forma o componente interno do envelope glicoproteico.

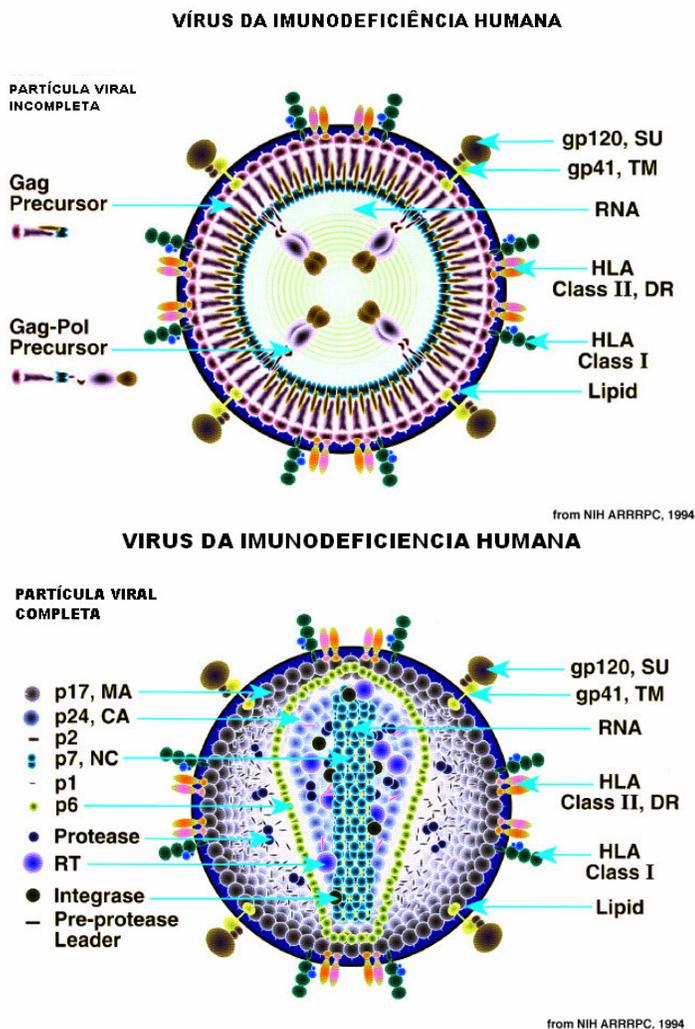


Figura 2 - Representação esquemática de partículas HIV incompleta e completa. [Acesso em 18/07/2007]. Disponível em: <http://www.microbiologybytes.com/virology/Retroviruses.html>.

Durante a etapa de brotamento, no processo de formação da partícula viral, várias proteínas da membrana celular hospedeira podem ser adquiridas e incorporadas à membrana viral lipoprotéica, principalmente β_2 -microglobulina, proteínas HLA classes I e II e ciclofilinas (Arthur et al., 1992; Franke et al., 1994).

Proteínas de adesão, como a molécula de adesão intracelular 1 (ICAM-1), também podem ser incorporadas, facilitando a adesão a outras células-alvo. Além disso, pode ocorrer também a incorporação de lipídeos, havendo a seleção, por proteínas virais, de regiões específicas da membrana plasmática celular para a liberação do nucleocapsídeo (Miller et al., 1992).

A região compreendida entre o envoltório viral e o nucleocapsídeo é denominada região paranucleóide ou corpo lateral (Yu et al., 1994). A porção mais estreita do nucleocapsídeo, com 20 nm de largura, está conectada à membrana lipídica através de uma estrutura proteica, a ligação cápside-envelope (Höglund et al., 1992). Cada nucleocapsídeo contém duas moléculas de RNA genômico de cadeia simples, proteínas de membrana e enzimas virais.

O nucleocapsídeo viral (NC) é composto pela proteína p17, constituindo a matriz (MA) e pelo capsídeo viral (CA), que engloba o genoma RNA, as proteínas p24, p9, p7, a enzima transcriptase reversa (p66/p51), essencial ao processo de replicação viral, a enzima protease (p10), necessária à maturação das partículas virais e a enzima integrase (p31), responsável pela integração do genoma viral ao DNA da célula hospedeira. Catalisada pelo polipeptídeo In (parte do complexo RTase), a integração é uma reação altamente específica em relação ao provirus, mas aleatória em relação ao DNA da célula hospedeira. Moléculas de tRNA usualmente específicas a triptofano, prolina ou lisina, usadas no início do processo de transcrição reversa, também são observadas no capsídeo viral.

O genoma viral, com 9,7 Kb em extensão, apresenta-se com duas fitas simples, positivas, associadas à nucleoproteína p7, formando o complexo ribonucleoproteico.

Em ambas as extremidades, são observadas sequências nucleotídicas repetidas (long terminal repeat - LTR). A estrutura LTR é essencial ao processo de replicação viral, uma vez que a região U3 de LTR contém elementos promotores responsáveis pelo início da transcrição do genoma viral.

1.2 Organização do genoma viral

A replicação viral, na maioria dos retrovirus competentes, depende da participação de genes estruturais (*gag*, *pol*, *env*), genes reguladores ou regulatórios (*tat*, *rev*, *nef*) e genes acessórios (*vpu*, *vpr*, *vif*, para HIV-1; *vpu*, *vpr*, *vpx* para HIV-2). Os polipeptídios precursores de proteínas do vírion são codificados por estas regiões específicas do genoma viral (Figura 3) (Wong-Staal, 1991).

O esquema estrutural clássico do genoma retroviral é indicado através da expressão 5'LTR-*gag-pol-env*-LTR3'. As regiões LTR representam as duas partes delimitantes do genoma viral. São conectadas ao DNA celular da célula hospedeira, após a integração, e não codificam para quaisquer proteínas virais.

O gene *gag* codifica precursores de proteínas do capsídeo viral: a proteína da matriz (MA), formada pela unidade p17; a proteína do capsídeo (CA), formada pela unidade p24 e a proteína do nucleocapsídeo (NC), formada pela unidade p7.

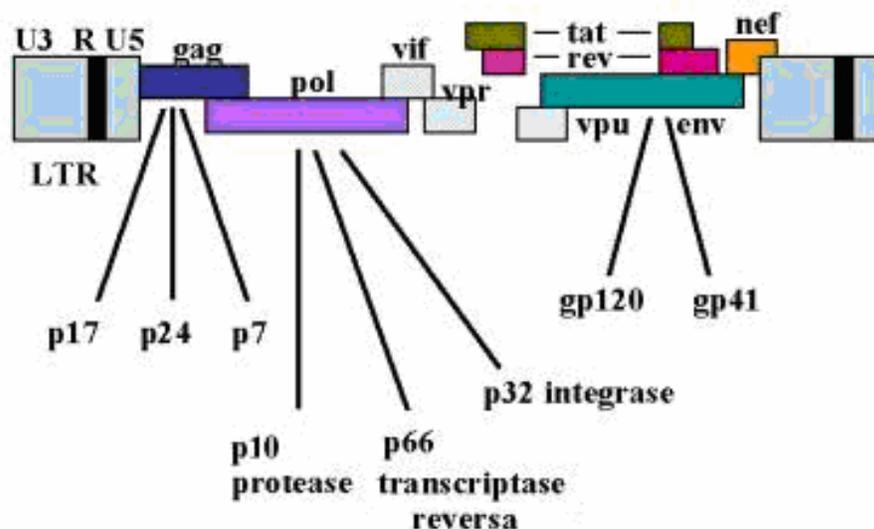


Figura 3 – Representação do genoma do HIV, indicando a disposição de genes virais essenciais e acessórios. [Acesso em 18/07/2007]. Disponível em: <http://hivmedicine.aidsportugal.com/imagens2006/image004.jpg>.

O gene *pol* codifica precursores das enzimas protease, transcriptase reversa e integrase, essenciais ao processo de replicação retroviral.

A enzima protease (PR), composta pela subunidade p10, atua na maturação das partículas virais, no processo de formação das partículas, e em 11 sítios de clivagem de poliproteínas precursoras do HIV-1, gag e gag-pol, sendo que três sítios envolvem as ligações fenilalanina-prolina ou tirosina-prolina, dando origem às proteínas estruturais codificadas pelo gene *gag* e enzimas virais codificadas pelo gene *pol* (Darke et al., 1988) (Figura 4).

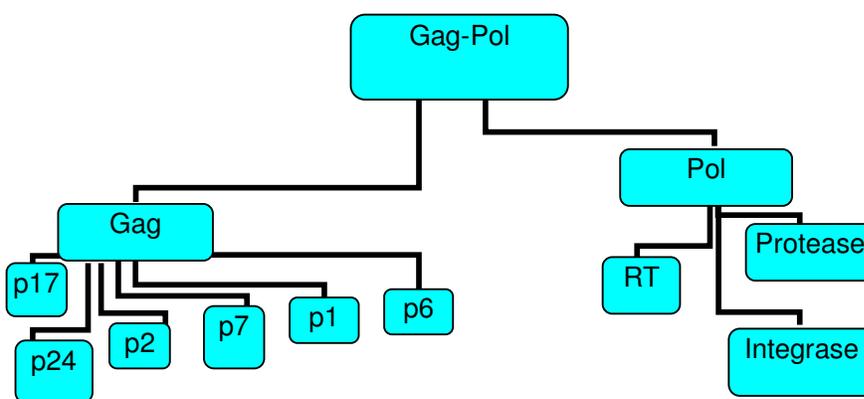


Figura 4 – Sítios de clivagem catalisada pela protease do HIV-1

A transcriptase reversa (RT) transcreve o genoma viral RNA de cadeia simples em DNA proviral de cadeia dupla e é formada por duas subunidades, p51 e p66.

A subunidade p51 não apresenta o domínio RNase H, que é observado somente como parte da subunidade p66 da enzima transcriptase reversa viral.

Este domínio apresenta como função a degradação do RNA viral fita simples nos híbridos RNA-DNA liberando o DNA molde para a síntese do genoma viral (Prasad & Goff, 1989; Telesnitsky & Goff, 1997).

A enzima integrase (In), formada pela unidade p32, atua na ligação covalente do DNA viral linear de cadeia dupla ao genoma da célula hospedeira (Brown, 1997; Goff, 1992).

O gene *env* codifica precursores (gp160) das glicoproteínas de envelope (gp120 ou subunidade SU) com sítios específicos de ligação aos receptores celulares e glicoproteínas transmembrana (gp41 ou subunidade TM) ligadas à

fusão vírus-célula e célula-célula (Lifson et al., 1986), responsáveis pela indução de sincícios em culturas de células.

Variações na sequência do gene *env* têm revelado um padrão de cinco regiões variáveis intercaladas com regiões conservadas para a subunidade gp120. De forma diferente, a subunidade gp41 demonstra menor heterogeneidade e, portanto, é mais conservada (Myers et al., 1994).

Esta variação consiste em alterações em nucleotídeos, que resultam em substituições de aminoácidos, pequenas deleções e inserções (Leigh-Brown, 1991). Até 25% dos aminoácidos codificados por *env* podem variar em linhagens HIV-1 de regiões separadas geograficamente (variação interpaciente).

Análises de sequências de isolados HIV-2 também demonstram cinco regiões variáveis, intercaladas com sequências conservadas na subunidade gp120 (Burns & Desrosiers, 1994). O sequenciamento de isolados HIV-2 revela a existência de, ao menos, cinco distintos subtipos, com pouca relação de equidistância (Gao et al., 1994).

A seleção de variantes *env* produz populações de genomas virais intimamente relacionadas, mas distintas, designadas *quasi-species* (variantes intrapacientes) (Wain-Hobson, 1992).

Variações nas sequências *env* têm importantes implicações não só nas respostas imunes antivirais, mas também na ligação ao CD4, tropismo celular e citopatogenicidade.

A heterogeneidade na sequência genômica pode ocorrer por pressões seletivas: o escape a anticorpos que neutralizariam a atividade viral e a adaptação a diferentes tipos de células (Burns & Desrosiers, 1994).

1.3 Genes virais acessórios e regulatórios

Adicionalmente aos genes *gag*, *pol* e *env*, o genoma do HIV codifica outros genes classificados, anteriormente, como genes acessórios ou auxiliares, uma vez que não eram requeridos nos processos de replicação *in vitro*.

Os genes adicionais codificados por HIV-1 são os genes acessórios *vif*, *vpr*, *vpu* e genes regulatórios *tat*, *rev* e *nef*. Para o HIV-2 são os genes acessórios *vif*, *vpr*, *vpx* e regulatórios *tat*, *rev* e *nef*.

Os genes regulatórios *nef*, *tat* e *rev* são produzidos precocemente durante o ciclo de replicação viral.

As sequências *tat* (transativador de transcrição) e *rev* (regulador da expressão viral) codificam a produção de pequenas proteínas externas ao vírion, essenciais à replicação viral. São proteínas regulatórias que se acumulam no interior do núcleo e se ligam em regiões definidas do RNA viral.

O gene *tat* se liga à região TAR (elementos de resposta transativação), encontrada em LTR; controla a transcrição da expressão genética, aumentando os níveis de RNA viral e elevando a transcrição inicial e/ou alongamento (Peterlin et al., 1993). Atua como potente ativador da transcrição da região promotora de LTR e é essencial para o processo de replicação viral em quase todos os sistemas de cultura *in vitro*.

O gene *rev* se liga à região RRE (elementos de resposta rev), encontrada no gene *env* e controla a replicação viral em nível pós-transcrição, regulando o processamento e transporte do RNA viral do núcleo ao citoplasma (Parslow, 1993).

Assim, ambos, *tat* e *rev* são fundamentais no processo de replicação viral, uma vez que estimulam a transcrição do DNA HIV-1 proviral em RNA, promovem o alongamento da cadeia de RNA, aumentam o transporte do RNA HIV do núcleo para o citoplasma e são essenciais para a tradução.

O gene *rev* é, também, um fator de exportação nuclear, importante para a troca de proteínas reguladoras de expressão precoce por proteínas estruturais que são sintetizadas posteriormente.

Todos os Lentivirus de primatas codificam *nef* (fator negativo), ao qual são atribuídas diversas funções, tais como: aumento da infectividade viral (Bukrinsky et al., 1991), ativação de células T (Baur et al., 1994) e regulação de CD4 (Aiken et al., 1994).

A expressão precoce de Nef, no ciclo de replicação viral, assegura a ativação de células T e o estabelecimento de um estado persistente da infecção. Além disso, promove a sobrevivência de células infectadas, atuando na expressão de várias moléculas de superfície, importantes para a função do sistema imune do hospedeiro. Estas moléculas incluem o complexo principal de histocompatibilidade I e II (MHC I e II), presente em células apresentadoras de antígeno (APCs) e células-alvo (linfócitos T CD4+, CD28+) (Collins et al., 1998).

Numerosos estudos têm sido publicados sobre as funções dos genes acessórios, levando em consideração diversos fatores como: diferenças entre as linhagens virais, multiplicidade da infecção, tipos celulares selecionados para análise e métodos utilizados para avaliar a replicação viral. As atribuições dadas a estes genes acessórios são descritas a seguir.

O fator de infectividade viral (*vif*) participa dos processos de replicação (Strebel et al., 1987) e maturação viral (Höglund et al., 1992). Dados da literatura têm ressaltado um importante papel de *vif* em relação à replicação viral (Mariani et al., 2003).

Isolados HIV-1 deficientes em *vif* não replicam em células T CD4(+), determinadas linhagens de células T não-permissivas ou em macrófagos. Estes isolados são capazes de infectar células-alvo e iniciar a transcrição reversa; entretanto, a síntese do DNA proviral permanece incompleta.

A fusão *in vitro* de células permissivas e não-permissivas leva ao fenótipo não-permissivo, sugerindo que a replicação do HIV depende da presença ou ausência de um inibidor celular. Este fator inibitório endógeno foi identificado como a enzima catalítica apolipoproteína B, semelhante ao polipeptídeo 3G, atuando na edição do mRNA (APOBEC3G) (Sheehy et al., 2002). Esta proteína pertence à família de enzimas intracelulares que, especificamente, deaminam a citosina em uracila no mRNA ou DNA, resultando no acúmulo de mutações G-A, que leva à degradação do DNA viral.

Através da formação de complexos com APOBEC3G, *vif* bloqueia a atividade inibitória desta enzima, prevenindo a sua incorporação às partículas virais recentemente sintetizadas (Freed, 2004). Assim, inibidores específicos, que possam bloquear a interação de *vif* com APOBEC3G, ou que previnam a degradação intracelular desta enzima, poderiam representar promissoras opções de tratamentos futuros, uma vez que, a princípio, o bloqueio de estruturas celulares estaria provavelmente associado ao risco mínimo de desenvolvimento de resistência, que pode comprometer a eficácia de agentes antiretrovirais.

Em relação aos genes *vpr/vpx* está bem definido que o HIV-1 apresenta o gene *vpr* (codificante para proteína viral R), enquanto que o HIV-2 contém *vpx* (codificante para proteína viral X), relacionada à Vpr por homologia de sequências (Myers et al., 1994).

Atribui-se a *vpx* desempenho na adaptação do vírus a espécies primatas (Clements & Wong-Staal, 1992) e, estudos para o gene *vpr*, têm sugerido sua participação na regulação da expressão de genes celulares e virais, alterando o mecanismo da célula hospedeira e facilitando a replicação viral (Levy et al., 1984).

A proteína Vpr desempenha importante papel na regulação da importação, para o núcleo, do complexo de pré-integração do HIV-1 e é requerida para a replicação viral em macrófagos.

Além disso, a Vpr também é capaz de interferir no ciclo de replicação celular, induzindo à apoptose e resultando em disfunção imune. O papel imunossupressor é atribuído à sua capacidade em sequestrar ativadores de transcrição pró-inflamatórios no citoplasma (Bukrinsky & Adzhubei, 1999; Muthumani et al., 2006).

O gene *vpu* (codificante para proteína viral U) está presente em HIV-1 e ausente em HIV-2 e demais lentivirus (Myers et al., 1994). Está envolvido no processo de brotamento das partículas virais e aumento da liberação de virions em células infectadas.

Vírus deficientes em *vpu* replicam em células T CD4⁺ e macrófagos; porém, há um declínio acentuado na eficiência da liberação de virions no meio extracelular (Klimkait et al., 1990).

1.4 Patogênese da infecção por HIV

Infecções por Lentivirus cursam, tipicamente, como doenças crônicas apresentando longos períodos de latência clínica, replicação viral persistente e o envolvimento do sistema nervoso central. Entretanto, o curso da infecção por HIV-1 em determinados pacientes pode variar dramaticamente, mesmo em casos de infecções primárias provenientes de origens comuns (Liu et al., 1997).

Em alguns indivíduos são observadas infecções não-progressivas de longo-termo, que se caracterizam pela ausência do declínio no número de células T CD4(+) ou infecções crônicas que persistem, no mínimo, por sete anos sem o desenvolvimento de AIDS.

Nestes pacientes foram observados isolados virais identificados como virions defectivos (Kirchhoff et al., 1995). Assim, a infecção com vírus defectivos ou que apresentem reduzida capacidade de replicação viral pode prolongar o curso clínico da infecção por HIV-1.

Porém, na maioria dos casos, a infecção por HIV-1 caracteriza-se pela presença de vírus com efetiva capacidade de replicação e elevada taxa diária de reposição de virions.

Fatores do hospedeiro também podem determinar se o curso da infecção evoluirá, rapidamente, para a imunodeficiência clinicamente manifesta ou para o perfil de não-progressores de longo-termo, que representam cerca de 5% de todos os pacientes infectados (Bello et al., 2005, Buchbinder et al., 1994, Lefrère et al., 1997).

A identificação e caracterização de fatores do hospedeiro que contribuem para o curso da infecção por HIV, incluindo mecanismos de defesa imunológicos e fatores genéticos, são cruciais para a compreensão da imunopatogênese da infecção por HIV e para o desenvolvimento de estratégias imunoterapêuticas e profiláticas.

1.4.1 Replicação viral

O ciclo de replicação dos Lentivirus de primatas divide-se em duas fases: inicial e tardia. A primeira inicia-se com a ligação do vírion aos receptores de superfície celular, através da ligação de gp120 aos receptores de superfície celular, CD4, com posteriores processos de internalização e descapsidação do nucleocapsídeo no citoplasma da célula (Figura 5).

O domínio CD4 atua como receptor primário para o HIV no processo da infecção viral. Ele consiste em uma glicoproteína monomérica, com 58 kDa, detectada na superfície celular de cerca de 60% dos linfócitos T, em precursores de células T na medula óssea e timo, monócitos, macrófagos, eosinófilos, células dendríticas e células da microglia do sistema nervoso central.

São observadas três regiões distintas em CD4 de células T: o domínio extracelular, composto de 370 aminoácidos, o domínio hidrofóbico transmembrana, com 25 aminoácidos e a parte citoplasmática, com 38 aminoácidos.

No domínio extracelular, foram caracterizados quatro domínios semelhantes a imunoglobulinas, identificados como regiões D1-D4. Resíduos na região V2, que compreende os aminoácidos 40-55, são importantes para a ligação à gp120 e esta região se sobrepõe à parte de CD4 onde ocorre a inserção de seus ligantes naturais (moléculas HLA classe II).

Ciclo de replicação do HIV

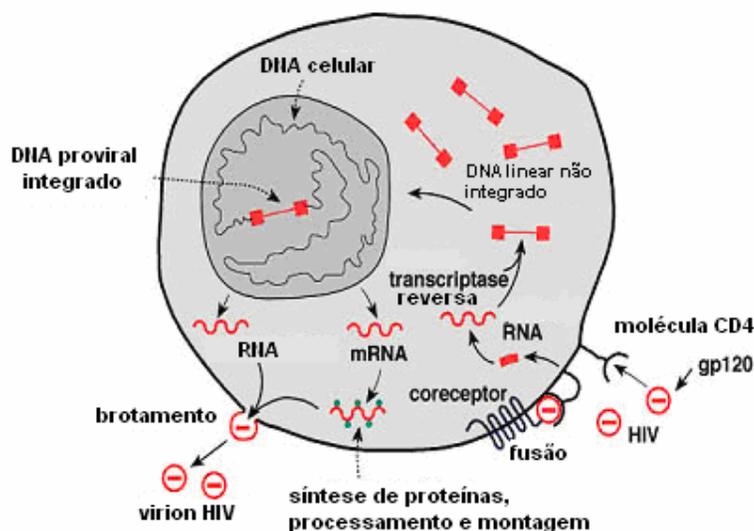


Figura 5 - Etapas do ciclo de replicação viral.
 [acesso em 18/07/2007]. Disponível em: http://www.web-books.com/.../Images/HIV_Cycle.jpg439x361-44k.

A ligação de gp120 ao CD4 não é apenas uma etapa crucial para a penetração do vírus nas células; ela também interfere com a via de transdução de sinal intracelular e promove apoptose em células T CD4(+) (Banda et al., 1992).

Receptores de citocinas quimiotáticas (quimiocinas) atuam como correceptores de CD4 na infecção celular por HIV.

As quimiocinas e seus receptores têm sido caracterizados em relação ao seu papel em promover a migração (quimiotaxia) de leucócitos e sua atividade pró-inflamatória. O CXCR4 (α -quimiocina) foi descrito como o correceptor para isolados HIV com tropismo para células T (T-trópicos) (Feng et al., 1996) e o correceptor CCR5 (β -quimiocina) é necessário para isolados HIV monocitotrópicos (M-trópicos) (Deng, 1996; Doranz, 1996; Dragic, 1996).

A ligação de gp120 ao CD4 e correceptores celulares induz à alteração conformacional em gp120 que promove uma interação mais eficiente da alça V3 de gp120 com o seu respectivo correceptor. A fusão da partícula viral com a membrana da célula hospedeira é dependente desta interação e também de gp41, uma glicoproteína transmembrana, parte do envelope glicoproteico gp160.

Após os processos de adsorção da partícula viral às células suscetíveis e fusão com a membrana da célula hospedeira, ocorre a descapsidação do nucleocapsídeo viral no citoplasma celular sendo que as enzimas virais transcriptase reversa, protease e integrase permanecem associadas ao nucleocapsídeo.

Ocorre, a seguir, a etapa de transcrição reversa: através da ação da transcriptase reversa, catalisando a síntese e polimerização do DNA, e da atividade RNase H da transcriptase reversa, clivando cadeias de RNA, ocorre a conversão do RNA genômico de cadeia simples em DNA de cadeia dupla.

O processo de transcrição reversa ocorre no citoplasma da célula, em uma série de etapas, descritas a seguir (Goff, 2001; Rubbert et al., 2007):

- 1) um tRNA celular específico de lisina atua como iniciador (primer) e acopla-se ao sítio complementar do genoma viral denominado sítio de ligação do primer (*primer binding site*, PBS);

- 2) o DNA complementar liga-se, então, à região U5 (região não-codificante) e região R do RNA viral (uma repetição direta presente em ambas as terminações da molécula de RNA);

- 3) um domínio da enzima transcriptase reversa, denominado RNase H, degrada a terminação 5' do RNA, removendo U5 e R;

- 4) a seguir, o primer desloca-se para a extremidade 3' do genoma viral e a cadeia de DNA recentemente sintetizada acopla-se à região R complementar no RNA;

- 5) a primeira cadeia de DNA complementar (cDNA) é estendida e a maior parte do RNA viral é degradada pela RNase H;

- 6) finalizada esta etapa, inicia-se a síntese da segunda cadeia;

- 7) ocorre uma nova etapa de deslocamento: o PBS da segunda cadeia acopla-se ao PBS complementar na primeira cadeia;

- 8) ambas as cadeias são estendidas, resultando no DNA HIV de cadeia dupla com regiões LTR em ambas as extremidades.

Estas formas são mantidas em um complexo nucleoproteico, que é subseqüentemente transportado ao núcleo e podem ser integradas ao genoma hospedeiro pela enzima viral integrase, produzindo o provirus integrado: a integrase se liga ao DNA viral transcrito e forma o complexo de pré-integração (PIC). Uma vez incorporada ao PIC, a integrase atua no terminal 3' removendo o dinucleotídeo GT de ambas as extremidades do DNA viral. A seguir, o PIC é transportado do

citoplasma ao núcleo da célula infectada e a integrase catalisa a reação de transferência da cadeia, resultando na incorporação do DNA viral ao DNA celular.

A ativação celular, promovida *in vivo* por contato com antígenos ou infecções oportunistas, é necessária para a integração do DNA HIV proviral ao genoma da célula hospedeira após o transporte do complexo de pré-integração ao núcleo.

A segunda fase do ciclo de replicação viral ocorre com a transcrição e processamento do RNA viral a partir do cDNA proviral, contendo nas extremidades 5' e 3', respectivamente, as estruturas *cap* e *poli-A*, finalizando com a liberação de partículas virais pelo processo de brotamento.

A transcrição resulta, inicialmente, na síntese precoce de proteínas reguladoras do HIV-1, como Tat ou Rev (Freed, 2004).

Tat liga-se ao sítio de elemento de resposta transativação (TAR), no início da síntese do RNA HIV-1 no núcleo, e estimula a transcrição e formação de longos transcritos RNA.

Rev ativa a expressão de genes estruturais e enzimáticos e inibe a produção de proteínas reguladoras, promovendo, desta maneira, a formação de partículas virais maduras.

As proteínas codificadas pelos genes *gag* e *pol* formam o núcleo das partículas maduras. As proteínas codificadas pelo gene *gag* derivam de moléculas precursoras maiores, com 53kD, clivadas, pela enzima viral protease, em p24, p17, p9 e p7.

Os produtos codificados por *env* formam as espículas gp120 do envelope viral, a partir de moléculas precursoras maiores, gp160, também clivadas pela protease do HIV-1 em gp120 e gp41.

Assim, a clivagem de moléculas precursoras é necessária à geração de partículas virais infecciosas (virions) e o processo de formação de novas partículas ocorre em etapas, descritas a seguir:

- 1) o core das partículas virais é formado por RNA HIV-1, proteínas codificadas por *gag* e várias enzimas codificadas por *pol*.

- 2) este complexo migra para a superfície da célula, em sítios onde houve a deposição de gp120 e gp41.

- 3) moléculas precursoras maiores são clivadas pela protease, resultando em partículas virais (virions) pelo processo de brotamento através da membrana da célula hospedeira.

Durante este processo, membranas lipídicas virais podem incorporar várias proteínas da célula hospedeira, tornando-se enriquecidas em certos fosfolípidos e colesterol.

Em células T, o brotamento das partículas virais resulta em sua liberação no espaço extracelular e, em monócitos e macrófagos, resulta no acúmulo de virions em vacúolos celulares.

A replicação dos retrovirus é tendenciosa à ocorrência de erros e caracterizada por elevada taxa de mutações espontâneas.

A enzima transcriptase reversa do HIV-1 não possui função de edição e os erros que surgem na formação do DNA de cadeia dupla constituem a fonte da extensa heterogeneidade genética do HIV. Estima-se que a taxa de mutação deste processo seja de 10^{-4} resultando, em média, em um a dez erros por genoma a cada ciclo completo de replicação.

1.4.2 HIV e sistema imune

Após a penetração do HIV-1 em células T CD4(+) quiescentes e a finalização da etapa de transcrição reversa, o genoma viral apresenta-se como DNA proviral não integrado. A ativação de células T CD4(+) é necessária para a integração do DNA HIV no genoma da célula hospedeira, preferencialmente em genes ativos, denominados *hot spots* (Schroder, 2002), e constitui-se pré-requisito para a síntese de novos virions.

Em relação a este aspecto, o micro-ambiente dos tecidos linfóides representa o meio ideal para a replicação de novos virions, propiciando condições especiais tais como o íntimo contato entre as células T CD4(+) e células apresentadoras de antígeno, a presença de virions infecciosos na superfície de células dendríticas foliculares e a abundante produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1, IL-6 e TNF α , que promovem a indução da replicação viral nas células infectadas e aumentam esta replicação em células já produtoras de vírus (Rubbert et al., 2007).

A replicação viral em tecidos linfóides é, realmente, extensa nos estágios iniciais da doença (Embretson, 1993; Pantaleo, 1993). Durante a fase inicial da infecção por HIV-1, observa-se enorme quantidade de partículas virais no plasma, seguindo-se relativo declínio da viremia, na maioria dos pacientes. Uma forte e

intensa resposta de células T citotóxicas específicas para o HIV-1 é gerada, coincidindo com a supressão da viremia plasmática.

Os virions são englobados pela rede de células dendríticas foliculares nos tecidos linfóides e os macrófagos, células T CD4+ ativadas e quiescentes são os principais alvos da infecção. Se uma análise sequencial do tecido linfóide for realizada durante o curso natural da doença causada pelo HIV-1, será observado que a progressão da doença é refletida pela destruição da arquitetura do tecido linfóide com um decréscimo no englobamento de partículas virais (Rubbert et al., 2007).

Vários estudos imunohistológicos indicam que o paracórtex dos linfonodos representa o sítio primário, onde a replicação do HIV-1 é iniciada (Embretson, 1993; Pantaleo, 1993). A infecção de células T CD4(+) circundantes, assim como o início da ativação de células T por células dendríticas, contribuem para a disseminação do HIV-1 no tecido linfóide.

Reservatórios virais permanentes, principalmente em macrófagos e células T CD4+ latentemente infectadas, são estabelecidos na fase precoce da infecção e, provavelmente, representam o principal obstáculo à bem sucedida erradicação do HIV (Rubbert et al., 2007). A frequência de células que contêm o DNA proviral é cerca de cinco a dez vezes maior em tecidos linfóides em relação às células mononucleares do sangue periférico e, a diferença na replicação viral, em tecidos linfóides, excede àquela do sangue periférico em dez a cem vezes.

Linfócitos B e T são considerados as principais células efetoras da resposta imune antígeno-específica. Entretanto, as suas funções estão sob o controle de células dendríticas, capazes de selecionar antígenos no sangue periférico. O reconhecimento de antígenos por células T requer o processamento prévio e apresentação de peptídeos antigênicos pelas células dendríticas (Rubbert et al., 2007).

As células T expressam diferentes receptores os quais podem se ligar a peptídeos MHC classe I na superfície de células dendríticas para permitir a ativação de células T CD8+ ou moléculas MHC classe II para a ativação de células T CD4+. Assim, a geração da resposta imune específica ao HIV é dependente do padrão individual do sistema HLA, que pode afetar a resposta imune adaptativa. Dependendo do padrão de secreção de citocinas, as células T CD4+ podem diferenciar-se em células T helper, T_{H1} e T_{H2}. As células T CD4+ T_{H1} produzem,

primariamente, interleucina 2 (IL-2) e interferon gama (IFN γ), que representam as citocinas que dão suporte às funções efetoras do sistema imune: linfócitos T citotóxicos (CTL), células Natural Killer (NK-cells) e macrófagos. As células T_H2 produzem, predominantemente, IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10, que representam as citocinas que favorecem o desenvolvimento da resposta imune humoral (Rubbert et al., 2007).

A associação entre a resposta imune humoral específica ao HIV e o curso da doença é bem menos caracterizada. Indivíduos não-progressores de longo-termo tendem a apresentar ampla atividade de anticorpos neutralizantes dirigidos a uma variação de isolados primários e mostram persistência de anticorpos neutralizantes contra vírus autólogos. Entretanto, ainda é incerto se estes anticorpos representam parte da proteção ou se meramente refletem a integridade de um sistema imune relativamente intacto. Indivíduos com substancial risco para a infecção por HIV, mas que são considerados expostos e não infectados, representam, por definição, aqueles com ausência de resposta de anticorpos detectáveis contra o HIV-1. Esta definição implica que a resposta humoral sistêmica talvez não represente um mecanismo crucial de proteção (Rubbert et al., 2007).

1.4.3 Imunopatogênese da infecção por HIV em pediatria

Em crianças infectadas por HIV, através da transmissão vertical, o período da infecção aguda é o período neonatal, caracterizado por níveis de carga viral extremamente elevados, que declinam mais lentamente do que em adultos nos próximos dois anos ou mais, até atingirem um valor de set-point (Tiemessen & Kuhn, 2006). Set-points virais são maiores em crianças do que em adultos, consistentes com a progressão mais rápida da doença (Shearer et al., 1997).

Na ausência de terapia efetiva, cerca de um quarto das crianças infectadas progridem à AIDS e 10% a 15% vão a óbito no primeiro ano de vida (Pliner et al., 1998; The European Collaborative Study, 1994).

A via de contaminação mãe-filho envolve, por definição, a transmissão de vírus entre indivíduos geneticamente similares e esta similaridade pode ser maior para alelos mais comuns. Uma vez que a resposta imune materna molda a evolução de vírus autólogos e mãe e filho são geneticamente similares, a criança adquire linhagens virais que já apresentam mutações de escape à resposta imune (Tiemessen & Kuhn, 2006). De forma interessante, crianças que adquirem a

infecção por HIV, através de transfusões sanguíneas, tendem a apresentar melhor prognóstico do que crianças que as contraíram por via vertical (Frederick et al., 1994). Assim, a similaridade genética mãe-filho pode desempenhar papel importante para a explicação das diferenças observadas na história natural da infecção por HIV entre crianças e adultos (Tiemessen & Kuhn, 2006).

O sistema imune de crianças, no início da vida, é imaturo uma vez que a resposta imune específica ou adaptativa, mediada por células T e B, é pequena ou quase inexistente, dependendo da exposição prévia a antígenos e esta capacidade desenvolve-se com o aumento da exposição a diferentes estímulos antigênicos. O sistema imune inato, em contraposição, é designado para constituir uma resposta imediata após exposição a microorganismos, promovida por células dendríticas, células Natural Killer, células fagocíticas (neutrófilos, monócitos e macrófagos), mastócitos e proteínas humorais tais como complemento, citocinas, quimiocinas e proteínas antimicrobianas. Em decorrência da alteração do ambiente imune no início da vida, tipos celulares, ligados à imunidade inata e adquirida, emergem como importantes fatores na patogênese da infecção por HIV em pediatria (Tiemessen & Kuhn, 2006).

Azzoni et al., 2005 têm demonstrado que a porcentagem e função de células NK e plasmacitóides (principal população celular produtora de IFN- α) e células dendríticas mielóides encontram-se deterioradas em crianças infectadas por HIV, independente da carga viral, particularmente naquelas com história clínica de porcentagens decrescentes de células T CD4+. Os seus resultados sugerem, adicionalmente, que podem existir diferenças entre adultos e crianças na reconstituição imune inata, seguida à terapia antiretroviral altamente potente (HAART).

Outras células que emergem, de maneira crítica, na ligação entre a imunidade adaptativa e inata são as células T Natural Killer, que expressam receptores específicos para antígenos glicolipídicos e compartilham com células T e células NK similaridades fenotípicas e funcionais. Estas células têm sido encontradas como alvo para a infecção produtiva por HIV e são seletivamente depletadas durante o curso da infecção, em adultos e crianças (van der Vliet et al., 2002; Sandberg et al., 2002).

Estudos sobre a imunidade específica ao HIV têm demonstrado que apenas a fração de células T CD8 específicas ao HIV tem a capacidade de produzir citocinas e quimiocinas importantes em suas funções antivirais (Scott-Algara et al., 2005).

As células T CD4 desempenham importante papel auxiliando tanto na resposta de anticorpos como na resposta de linfócitos T citotóxicos. A manutenção da integridade destas células é crucial para o controle da progressão da doença causada pelo HIV e, tem sido ressaltado por Chakraborty et al., 2005, que respostas de células T_H CD4(+) específicas ao HIV são prontamente detectadas em crianças não-progressoras que sobrevivem por períodos prolongados.

1.5 Dinâmica viral e *quasi-species*

A infecção pelo HIV-1 é um processo dinâmico em que se observa equilíbrio entre a produção e eliminação de partículas virais, de acordo com estudos de quantificação da carga viral em plasma e células mononucleares do sangue periférico de pacientes nos diferentes estágios de AIDS. Em indivíduos infectados, é estimado o valor médio de 10^9 novas partículas virais sendo produzidas e subsequentemente eliminadas por dia (Ho et al., 1989).

O estado de constante equilíbrio e a elevada taxa de mutação genômica do HIV-1 resultam no desenvolvimento de linhagens virais mutantes, selecionadas de maneira mais eficaz sob condições de pressão seletiva, exercida pelo sistema imunológico ou pela intervenção farmacológica com determinados antiretrovirais.

Estas variantes não são reconhecidas por anticorpos neutralizantes e linfócitos T citotóxicos e podem apresentar mutações nos genes que codificam para as enzimas envolvidas no mecanismo de replicação viral, resultando na substituição de aminoácidos e selecionando as *quasi-species* resistentes aos antiretrovirais (Wang et al., 2002). Em decorrência, estas drogas não exercem sua função de forma adequada e a replicação viral se processa normalmente.

A resistência aos antiretrovirais, assim como outros fatores, tais como potência inadequada da medicação, níveis farmacológicos inadequados, não-adesão e/ou interações medicamentosas contribuem para o decréscimo da eficiência da quimioterapia antiretroviral (Coffin, 1995), dificultando não apenas a conduta clínica em relação à doença viral como também as opções de tratamento.

2 EPIDEMIOLOGIA

2.1 Infecção por HIV-1 em pacientes pediátricos

De acordo com *the Joint United Nations Program on HIV/AIDS* (UNAIDS), até o ano 2007, foram notificados 2,5 milhões de casos de crianças, abaixo de 15 anos de idade, infectadas por HIV, com 500.000 novos casos registrados e o número de óbitos por AIDS estimado em 330.000. A maioria da população infectada é proveniente da África sub-Saariana, onde a soroprevalência para HIV em mulheres grávidas é extremamente elevada, e a principal via de infecção consiste na transmissão mãe-filho.

Acima de 95% das crianças são infectadas por transmissão perinatal (infecção vertical) e outros meios de transmissão viral, como por transfusão de sangue e derivados, transmissão sexual e abuso de drogas são bem menos prevalentes.

Na maioria dos casos (75-90%), a transmissão do HIV ocorre periparto ou intraparto e apenas uma pequena proporção de crianças é infectada *in utero* (10-25%) (Niehues & Lyall, 2007).

Em regiões com poucos recursos, a prevenção da transmissão através do aleitamento materno permanece como o principal foco na pesquisa da transmissão mãe-filho, e esforços para reduzi-la, através deste meio, incluem a terapia antiretroviral materna e a profilaxia neonatal durante o período de aleitamento ou modificações nas práticas de aleitamento. Por outro lado, em países mais desenvolvidos, o advento da terapia antiretroviral altamente potente resultou em redução bastante significativa nas taxas de transmissão mãe-filho, atingindo níveis equivalentes a 1 a 2%. Além disso, nestes países, o aleitamento materno por mães reconhecidamente infectadas, é fortemente desencorajado (Niehues & Lyall, 2007).

Assim, foram estabelecidos dois padrões evidentes de epidemia para a infecção por HIV-1 em pacientes pediátricos. Um deles ocorre em países mais desenvolvidos ou nos quais tenham sido adotadas políticas diferenciadas de prevenção e tratamento, e caracteriza-se por baixas taxas de infecção, sobrevida prolongada, complicações decorrentes da terapia antiretroviral crônica, aderência à medicação e resistência antiretroviral.

O oposto a este padrão é observado em países em desenvolvimento, onde a ausência do diagnóstico precoce, o acesso tardio aos cuidados médicos e a ausência de opções de tratamento resultam em elevada e precoce mortalidade (Mofenson, 2008).

Na América Latina, foram estimadas, em 2007, 1.600.000 pessoas vivendo com HIV/AIDS. Deste total, 510.000 eram mulheres e 39.000 eram crianças, abaixo de 15 anos de idade. Estes dados estão indicados na tabela 1

O Brasil responde pela maioria do número de casos totais, tanto em adultos como na população pediátrica.

Em 2005, foram identificados 700 casos de AIDS em menores de cinco anos de idade, que correspondem a uma taxa de incidência de 3,9 para 100.000 habitantes.

Dados do Sistema de Vigilância Epidemiológica dos Estados e Municípios brasileiros indicam que, de acordo com as regiões de residência, estas taxas de incidência são equivalentes a 6,1 para a Região Sul, 4,4 para a Região Sudeste, 3,1 para a Região Nordeste, 2,7 para a Região Norte e 2,6 para a Região Centro-Oeste.

Tabela 1 - Dados de HIV/AIDS na América Latina, em 2007.

HIV/AIDS na América Latina	
População, 2007	569.000.000
Pessoas vivendo com HIV/AIDS, 2007	1.600.000
Mulheres (>15 anos) com HIV/AIDS, 2005	510.000
Crianças com HIV/AIDS, 2007	39.000
Prevalência de HIV em adultos (%), 2007	0,5
Novas infecções por HIV, 2007	100.000
Mortes por AIDS, 2007	58.000



Fonte: Population Reference Bureau & UNAIDS. [Acesso em 13/12/2008].

Disponível em: <http://www.unaids.org>.

Em 2007, o número de pessoas vivendo com HIV/AIDS no Brasil foi estimado em 730.000, sendo 13.012 crianças abaixo de 12 anos de idade, com 15.000 casos de mortes de adultos e crianças, de acordo com dados da Organização Mundial de Saúde.

Os números referentes a estas duas condições, observados no período de 1990 a 2007, são apresentados nas tabelas 2 e 3.

Tabela 2 - Número estimado de indivíduos infectados por HIV, no período compreendido entre os anos de 1990 a 2007, no Brasil.

Ano	Número estimado de pessoas vivendo com HIV no Brasil, 1990-2007		
	Valor médio	Valor mínimo	Valor máximo
1990	300 000	240 000	380 000
1991	360 000	270 000	460 000
1992	420 000	300 000	530 000
1993	460 000	330 000	580 000
1994	500 000	370 000	630 000
1995	530 000	390 000	680 000
1996	560 000	420 000	700 000
1997	580 000	440 000	730 000
1998	610 000	460 000	760 000
1999	620 000	480 000	780 000
2000	640 000	500 000	790 000
2001	660 000	520 000	810 000
2002	670 000	530 000	820 000
2003	680 000	540 000	840 000
2004	690 000	560 000	840 000
2005	710 000	570 000	870 000
2006	710 000	590 000	880 000
2007	730 000	600 000	890 000

Fonte: UNAIDS/WHO, 2008. [Acesso em 13/12/2008]. Disponível em:

<http://www.unaids.org>.

Tabela 3 - Número estimado de mortes por AIDS em indivíduos adultos e crianças, no período compreendido entre os anos de 1990 a 2007, no Brasil.

Ano	Mortes por AIDS em adultos e crianças no Brasil, 1990-2007		
	Valor médio estimado	Valor mínimo estimado	Valor máximo estimado
1990	8100	5500	13 000
1991	9300	6300	14 000
1992	11 000	7600	16 000
1993	12 000	8500	18 000
1994	14 000	9300	20 000
1995	15 000	9900	21 000
1996	16 000	11 000	23 000
1997	10 000	4000	17 000
1998	11 000	4400	18 000
1999	9400	3100	16 000
2000	11 000	5200	18 000
2001	9400	3500	16 000
2002	11 000	4700	17 000
2003	9600	3700	17 000
2004	8800	3000	16 000
2005	9600	3900	17 000
2006	12 000	6100	19 000
2007	15 000	9700	22 000

Fonte: UNAIDS/WHO, 2008. [Acesso em 13/12/2008]. Disponível em:

<http://www.unaids.org>.

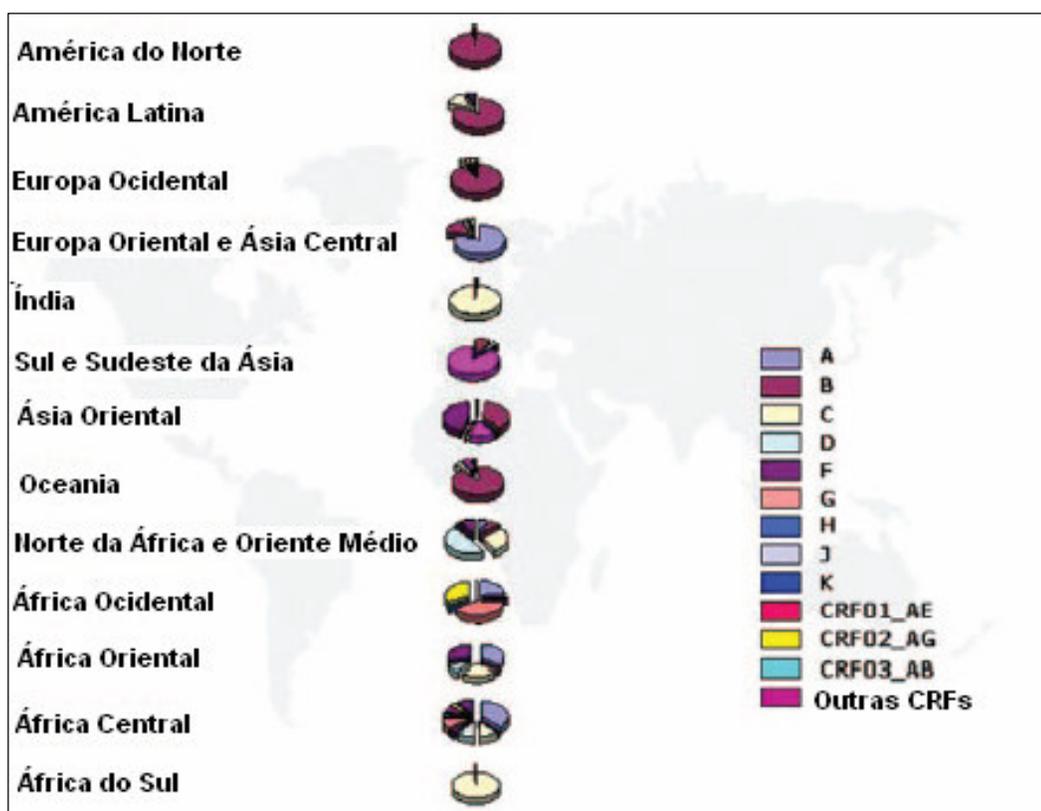
2.2 Distribuição geográfica dos subtipos do HIV-1

Estudos em epidemiologia molecular têm demonstrado que, com exceção da África sub-Saariana, onde quase todos os subtipos virais, formas recombinantes circulantes (CRF) e várias formas recombinantes únicas (URF) têm sido detectados, existe um padrão específico para a distribuição geográfica dos subtipos de HIV-1 (Hemelaar et al., 2006).

Este padrão de distribuição parece ocorrer tanto em consequência da migração viral acidental como da via de transmissão prevalente na região, resultando na predominância de determinado subtipo naquela população.

Em uma escala global, as formas genéticas mais prevalentes de HIV-1 são os subtipos A, B e C, com o subtipo C respondendo por quase 50% das infecções em todo o mundo, conforme indicado na figura 6.

Figura 6 – Distribuição geográfica global das predominantes formas genéticas do HIV-1.



O subtipo A é predominante em áreas da África central e oriental (Quênia, Uganda, Tanzânia e Rwanda) e nos países da Europa oriental que constituíam a União Soviética.

O subtipo B é a principal forma genética na Europa central e ocidental, nas Américas e Austrália e é também comum em vários países do sudeste da Ásia, norte da África e Oriente Médio e entre homossexuais masculinos da África do Sul e da Rússia.

O subtipo C é predominante nos países que apresentam índices superiores a 80% de todas as infecções globais por HIV-1, tais como África do Sul e Índia.

A relevância das CRFs na pandemia da infecção por HIV-1 está bem estabelecida, correspondendo a 18% das infecções (Osmanov et al., 2002).

Estas formas representam as cepas virais predominantes no sudeste da Ásia (CRF01-AE) e oeste e centroeste da África (CRF02-AG) (Motomura et al., 2000; Montavon et al., 2000).

No Brasil, a maioria de isolados HIV-1 agrupa-se nos subtipos B e F (Morgado et al., 1994; Sabino et al., 1994). Entretanto, cepas adicionais, tais como os subtipos A, C e D, e formas recombinantes B/F e CRF_02AG também têm sido reportados (Barreto et al., 2006; Caride et al., 2001; Couto-Fernandez et al., 2005; De Sá Filho et al., 2006; Morgado et al., 1998; Soares et al., 2005).

3 DROGAS ANTIRETROVIRAIS

As classes de drogas mais frequentemente indicadas para o tratamento da infecção por HIV-1 em humanos são os inibidores de transcriptase reversa análogos de nucleosídeo e nucleotídeo (NRTIs e NtRTI), inibidores de transcriptase reversa não análogos de nucleosídeo (NNRTIs) e inibidores de protease (PIs).

Os inibidores de integrase, recentemente introduzidos na terapia antiviral, atuam diretamente sobre esta enzima, responsável pela integração do DNA viral ao genoma da célula hospedeira.

Existem, atualmente, vários inibidores de integrase sob avaliação em ensaios clínicos, e o raltegravir tornou-se o primeiro composto a receber aprovação para uso no tratamento antiretroviral, licenciado pelo Food and Drug Administration (FDA), dos Estados Unidos, em outubro de 2007.

Além destas, que atuam no processo de replicação viral, têm sido descritas drogas que previnem a penetração do vírus na célula, atuando como inibidores de fusão e inibidores de coreceptor.

O enfuvirtide (Fuzeon, T-20), peptídeo que corresponde aos aminoácidos 638 a 673 da gp41 (domínio HR2 C-terminal) do HIV-1 (Kilby et al., 1998), foi aprovado pelo FDA como o primeiro inibidor de fusão vírus-célula para uso na terapia antiretroviral combinada, no tratamento de adultos e crianças a partir dos seis anos de idade, em estágio avançado da doença (Lalezari et al., 2003).

Esta droga se liga, competitivamente, ao domínio HR1 promovendo o bloqueio entre ambos os domínios e a inibição da alteração conformacional em gp41, necessária à fusão virions-célula hospedeira.

Os inibidores de coreceptor previnem a penetração do HIV nas células-alvo. Os antagonistas do coreceptor CCR5 atuam através da ligação específica a esta molécula, impedindo a sua interação à subunidade viral gp120. Assim, as alterações conformacionais que levam à inserção ao peptídeo de fusão gp41 são prevenidas, bloqueando a penetração viral.

Os inibidores de integrase e inibidores de coreceptores não têm sido estudados, ainda, em populações pediátricas.

Na figura 7 estão indicados os sítios de atuação dos antiretrovirais, localizados externa e internamente à célula hospedeira.

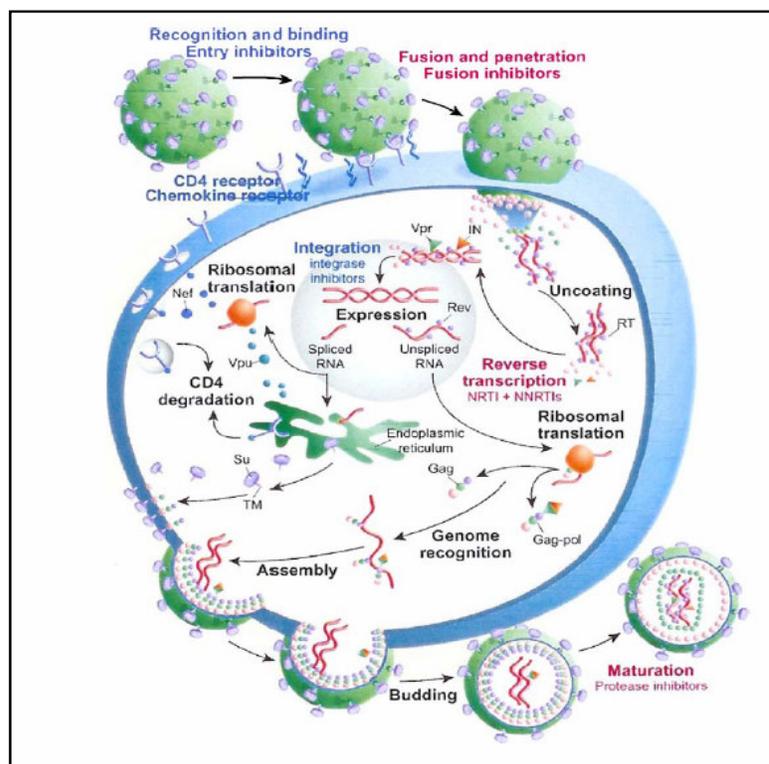


Figura 7 - Ciclo de replicação do HIV-1 e sítios de ação das drogas antiretrovirais (Pomerantz & Horn, 2003).

3.1 Inibidores da transcriptase reversa

As primeiras drogas de uso clínico, desenvolvidas para o tratamento da doença associada ao HIV-1, foram os NRTIs (Furman et al., 1986), que requerem fosforilação à forma trifosfato para inibir a enzima viral.

Na figura 8 está indicada a estrutura química de alguns compostos inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeo.

O mecanismo de ação destes compostos consiste na atuação de formas trifosfato como inibidores ativos da RT HIV-1, desempenhando a função de finalizadores de cadeia do processo de transcrição reversa e, assim, inibindo a síntese do cDNA viral (Schinazi, 1993), conforme ilustrado na figura 9.

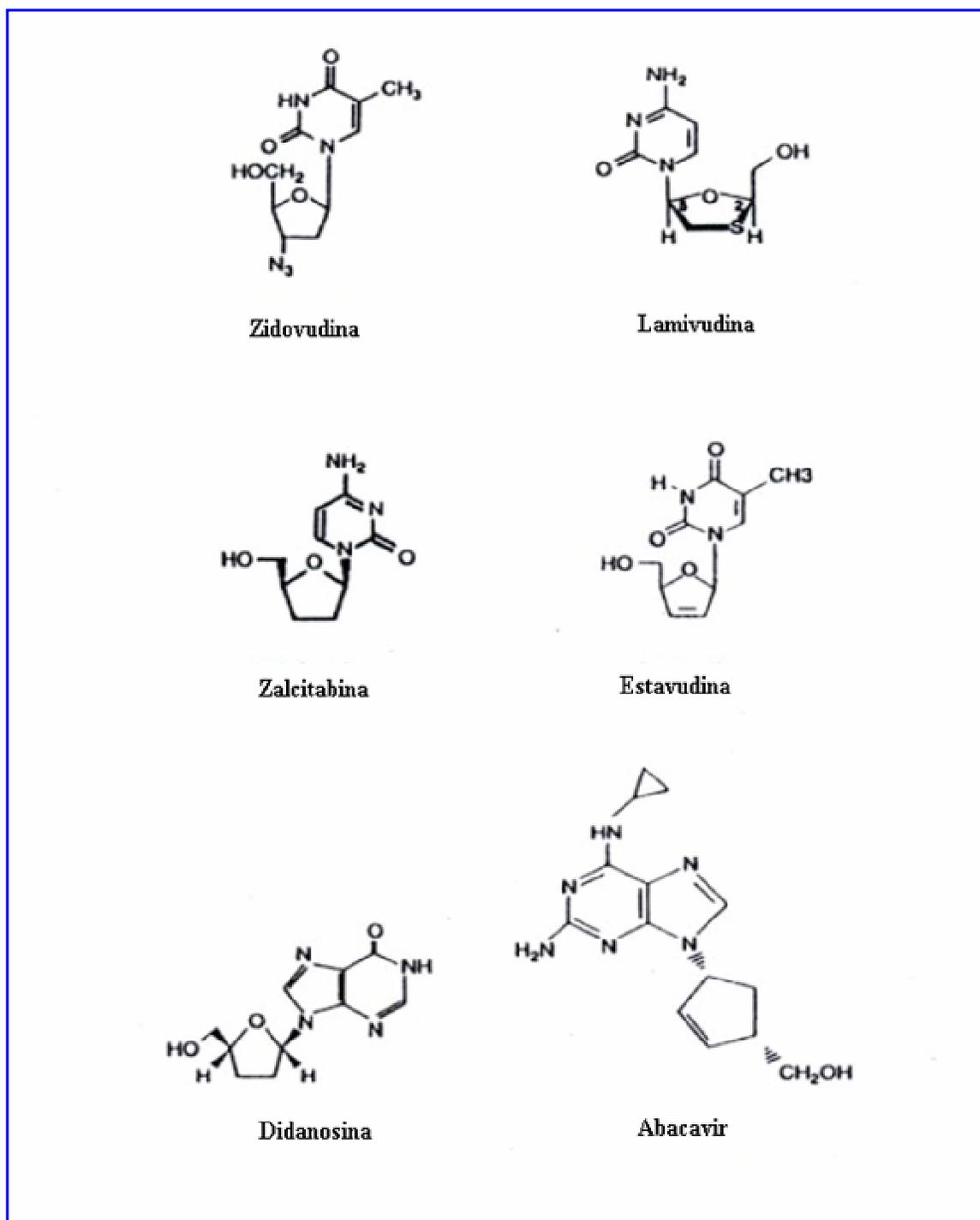


Figura 8 - Estrutura química de alguns inibidores de transcriptase reversa análogos de nucleosídeo: zidovudina (azidotimidina, Retrovir, 3-azido-3-desoximidina ou AZT); lamivudina (3'-tiacitidina, 3TC); zalcitabina (2',3'-didesoxicidina, ddC); estavudina (didehidrodesoxi timidina, d4T); didanosina (2',3'-didesoxinosina, ddl) e abacavir (1592U89 ou Ziagen, ABC).

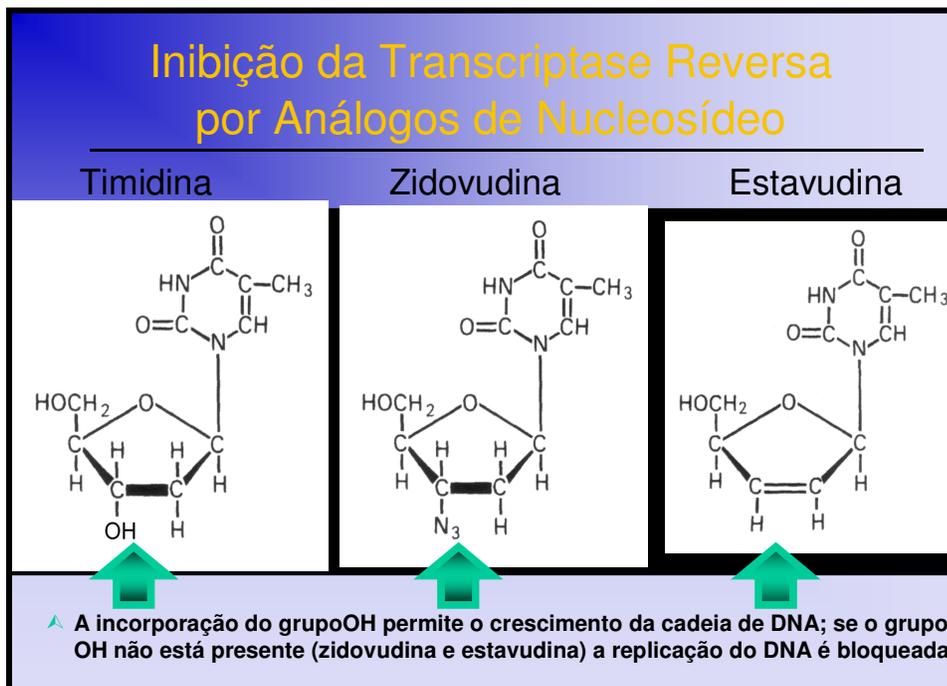


Figura 9 - Estrutura química dos compostos zidovudina e estavudina, exemplificando o mecanismo de bloqueio da síntese da cadeia de DNA.

O mecanismo de ação observado para todos os compostos análogos de nucleosídeo é semelhante ao do AZT. Cada droga trifosfato atua como inibidor competitivo do nucleosídeo trifosfato natural e a terminação de cadeia ocorre após a sua incorporação.

A didanosina (ddI) é um pré-produto da didesoxiadenosina (ddA) e evita a toxicidade observada para ddA administrada oralmente. Na célula, ddl é convertida a ddA e o inibidor ativo da RT HIV é, de fato, a didesoxiadenosina trifosfato (ddA-TP).

Os compostos ddA, didesoxicitidina (ddC), dideidro-desoxitimidina (d4T) e tiacitidina (3TC) são fosforilados por enzimas quinase celulares a trifosfato e competem com dATP, dCTP, dTTP e dCTP, respectivamente, pela ligação à RT HIV. O abacavir é um análogo de guanossina e compete com dGTP pela incorporação (Hanna & Hirsch, 2000).

Os NNRTIs não requerem o processo de ativação metabólica e não competem com o substrato natural para a ligação à RT HIV-1, mas são capazes de inativar diretamente a enzima, por alosteria, ligando-se ao sítio hidrofóbico na subunidade p66 de RT, próximo ao sítio enzimático catalítico (DeClercq, 1997).

Este sítio específico em RT é funcionalmente relacionado ao sítio de ligação do substrato natural (dNTP) e a ligação dos NNRTIs pode, indiretamente, afetar a conformação de resíduos aspartato (Asp-185, Asp-186 e Asp-110), próximos ao sítio ativo da polimerase (Kroeger et al., 1995), levando a um reposicionamento destes resíduos.

Assim, os NNRTIs podem inibir a RT HIV por bloqueio do sítio ativo em uma conformação inativa, remanescente da conformação da subunidade p51 da RT HIV (DeClercq, 1997; Tantillo et al., 1994).

Os NNRTIs não apresentam os riscos de efeitos colaterais tóxicos, decorrentes da interferência com o metabolismo dos nucleotídeos e biossíntese de ácidos nucléicos, que estão associados com os NRTIs, tais como anemia e neutropenia, e podem atuar logo no início da replicação viral, inativando a RT dentro do próprio virion (Zhang et al., 1996).

Acima de 25 subclasses diferentes destes compostos têm sido descritas e mostram grande variedade de estruturas químicas. Alguns exemplos são apresentados na figura 10.

A hidroxietoximetil fenotiotimina (HEPT) foi o primeiro composto NNRTI a ser identificado como inibidor específico de HIV-1 (Baba et al., 1989) e o MKC-442 é o seu derivado clinicamente ativo (Baba et al., 1994). Entretanto, a nevirapina (NVP) foi o primeiro NNRTI aprovado para uso clínico, após ensaios clínicos multicêntricos demonstrarem o benefício de sua adição aos regimes com AZT e ddI (D'Aquila et al., 1996; Montaner et al., 1998), melhorando parâmetros virológicos e imunológicos da doença por HIV.

Outros NNRTIs aprovados para uso clínico são delavirdina (bisheteroarilpiperazina, BHAP, DLV), efavirenz (DMP-266, EFV) e etravirina (TMC125, ETR). Entretanto, a rápida emergência de resistência a DLV e EFV (Saag et al., 1993) e o elevado nível de resistência a ETR, observado em estudos in vitro (Brillant et al., 2004) tem limitado o seu uso como monoterapia: cada composto deve ser usado em conjunto a outras drogas antiretrovirais para que haja um substancial benefício.

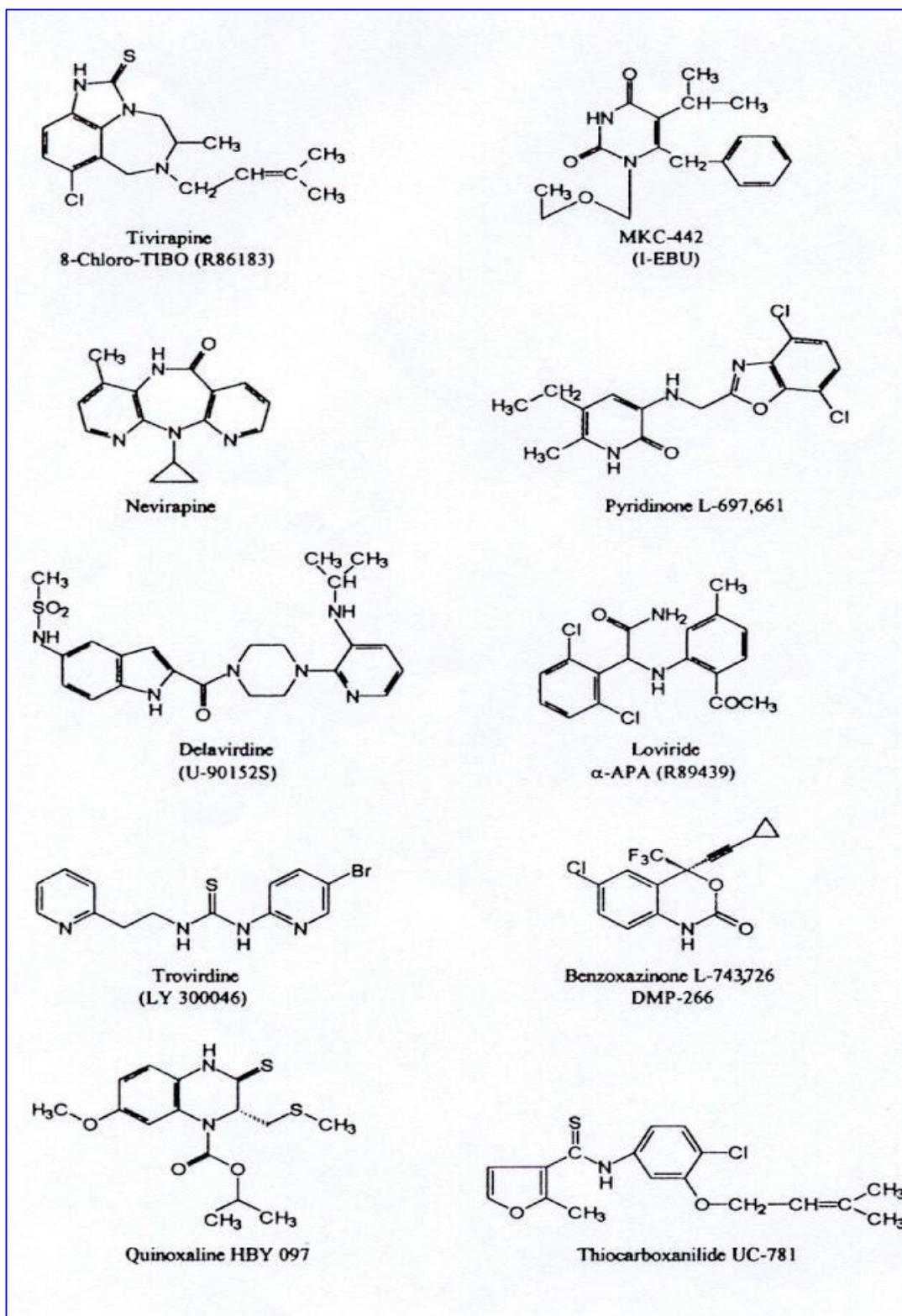


Figura 10 - Estrutura química de compostos inibidores de transcriptase reversa não análogos de nucleosídeo. Aprovados pelo FDA: nevirapina, delavirdina e efavirenz (DMP-266).

3.2 Inibidores de protease

Os PIs são análogos sintéticos, assemelhando-se aos aminoácidos que são reconhecidos e especificamente clivados pela enzima.

A forte ligação destes compostos ao substrato enzimático inibe a atividade da protease, impedindo a maturação de partículas virais infecciosas.

Todos os PIs atuam no centro ativo enzimático, que pode acomodar sete aminoácidos, responsáveis pela definição da sequência de reconhecimento requerida pela protease do HIV-1 para proceder à clivagem no ciclo de replicação viral.

Esta região de ligação consiste em subregiões menores, designadas S1, S2 e S3 e cada inibidor da protease liga-se, preferencialmente, a uma ou mais destas subregiões.

A ligação dos PIs, interagindo com vários aminoácidos desta região específica, é dependente do tamanho de sua molécula e as mutações selecionadas pelos antiretrovirais afetam, diretamente, o sítio catalítico enzimático, causando resistência aos inibidores pelo decréscimo da capacidade de ligação destes quimioterápicos.

Na figura 11 é apresentada a estrutura química de alguns compostos inibidores de protease. O indinavir é o maior deles e interage com o maior número de aminoácidos no dímero protease e o composto que apresenta a menor estrutura molecular conhecida é o amprenavir (Flexner, 1998).

O inibidor de protease indinavir foi obtido através de ensaio para avaliar o processamento de proteínas precursoras, utilizado para selecionar compostos antivirais potentes, os quais poderiam inibir a função da protease do HIV-1 (Flexner, 1998).

O primeiro inibidor de protease aprovado para uso humano foi o saquinavir, em 1995 e, em 1996, foram aprovados ritonavir e indinavir.

Todos os inibidores de protease inibem as enzimas citocromo P450, que metabolizam estas drogas, sendo o ritonavir o inibidor enzimático mais potente (Denissen et al., 1997).

Quando o ritonavir é administrado com outros inibidores de protease, um considerável aumento farmacocinético é observado, elevando, significativamente, o nível plasmático de outros PIs (Kempf et al., 1997).

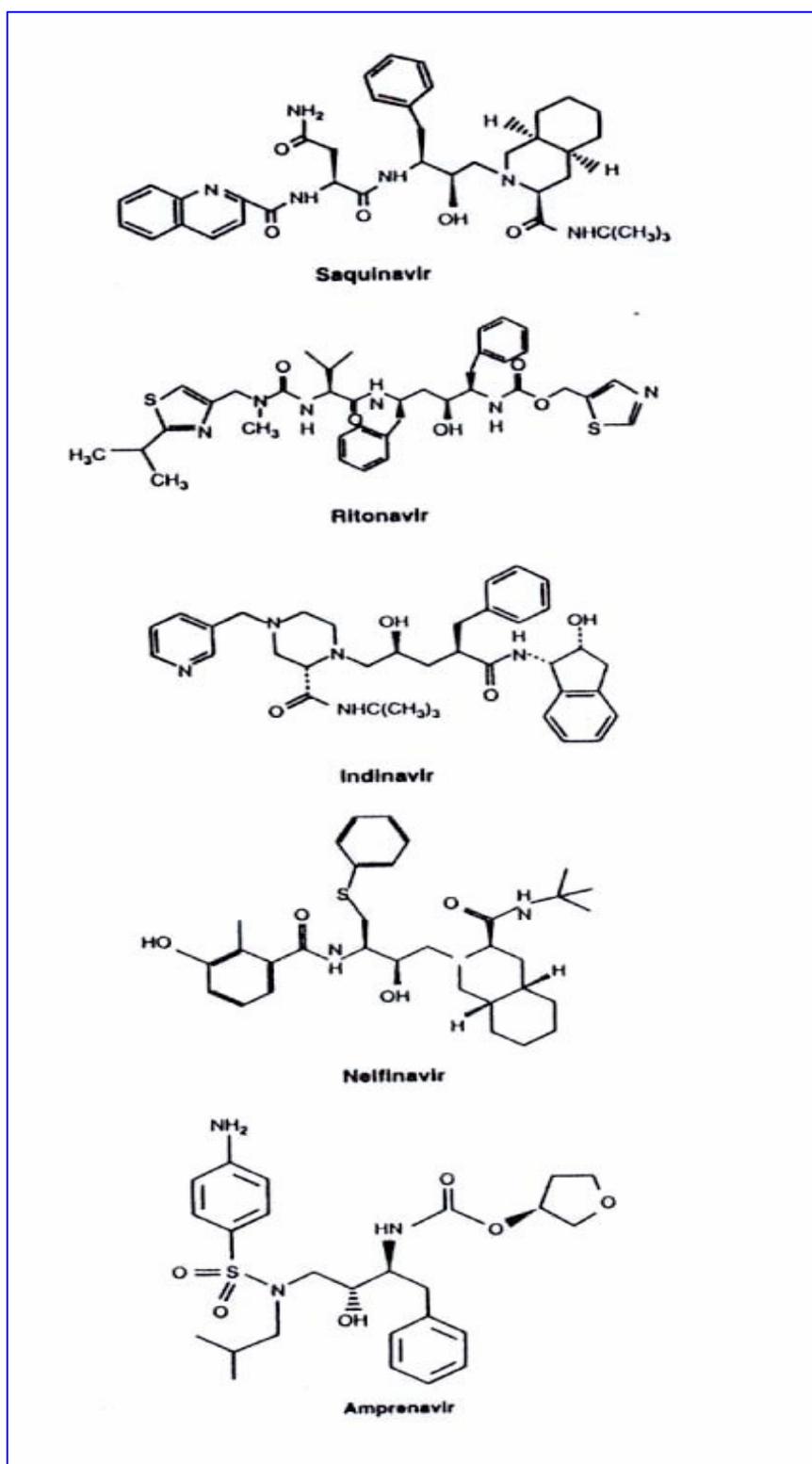


Figura 11 - Estrutura química de alguns compostos inibidores de protease: saquinavir (SQV), ritonavir (RTV), indinavir (IDV), nelfinavir (NFV), amprenavir (APV).

3.3 Medicções atuais

Desde 1987, quando a zidovudina foi aprovada pelo FDA como o primeiro antiretroviral a ser utilizado no tratamento de pacientes soropositivos para HIV, vinte e oito compostos encontram-se, atualmente, licenciados e aprovados, divididos em diferentes categorias:

1) Inibidores de RT análogos de nucleosídeo (NRTIs): abacavir (ABC); abacavir/lamivudina/zidovudina (Trizivir); abacavir/lamivudina (Epzicom); didanosina (ddI); emtricitabina (FTC); emtricitabina/tenofovir disoproxil fumarato (Truvada); lamivudina (3TC); lamivudina/zidovudina (Combivir); estavudina (d4T); zidovudina (AZT, ZDV).

2) Inibidor de RT análogo de nucleotídeo (NtRTI): tenofovir disoproxil fumarato (TDF)

3) Inibidores de RT não análogos de nucleosídeo (NNRTIs): nevirapina (NVP); delavirdina (DLV); efavirenz (EFV); etravirina (TMC125, ETR).

4) Inibidores de Protease (PIs): amprenavir (APV); atazanavir (ATV); darunavir (DRV; TMC 114); fosamprenavir (FPV); indinavir (IDV); lopinavir/ritonavir (Kaletra); nelfinavir (NFV); ritonavir (RTV); saquinavir mesilato (SQV); tipranavir (TPV).

5) Inibidor de Fusão (FI): enfuvirtide (Fuzeon; T-20; ENF).

6) Inibidor de Coreceptor (CRI): maraviroc (Selzentry).

7) Inibidor de Integrase (INI): raltegravir (MK-0518).

Outros compostos que estão aguardando a aprovação para o tratamento incluem: rilpivirina (NNRTI), vicriviroc (CRI) e elvitegravir (GS9137) (INI).

Em 2008, foi aprovado o composto Atripla, que consiste na combinação tripla de drogas antiretrovirais, formulada como pílula única a ser ingerida uma vez ao dia.

O Atripla contém as drogas tenofovir disoproxil fumarato (NtRTI), emtricitabina (NRTI) e efavirenz (NNRTI) e apresenta-se ativo também contra o vírus da hepatite B, devido à similaridade enzimática entre a transcriptase reversa de ambos os vírus, HIV e HBV (De Clercq & Field, 2008).

Em 2009, iniciou-se no Brasil a produção de comprimidos de ATC, medicação que consiste na associação de AZT e 3TC em formulação infantil, aguardando, para sua liberação, a conclusão de registro na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Alencastro, 2009).

4 TERAPIA ANTIRETROVIRAL ALTAMENTE POTENTE (HAART)

O vírus da imunodeficiência humana foi descoberto em 1982, mas as estratégias para a intervenção farmacológica foram introduzidas somente cinco anos após, com a aprovação, pelo Food and Drug Administration nos Estados Unidos, da zidovudina (AZT) para o tratamento da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS).

Os regimes terapêuticos iniciais perduraram como monoterapia com AZT até 1991, com a liberação da didanosina (ddl) para o tratamento. A seguir, novos fármacos inibidores da enzima transcriptase reversa viral foram aprovados e o esquema terapêutico passou a consistir na associação de dois compostos. Entretanto, estes esquemas resultavam, frequentemente, em falha no tratamento.

Em 1995, com a aprovação do primeiro composto inibidor da protease viral, saquinavir, deu-se início à terapia antiretroviral altamente potente (HAART), consistindo na administração de, no mínimo, três agentes antiretrovirais, sendo dois inibidores da transcriptase reversa e um inibidor de protease.

A partir desta modificação, uma considerável melhoria pode ser constatada no estado de saúde de pacientes submetidos à terapia antiretroviral, caracterizada por níveis indetectáveis da carga viral que perduravam por períodos prolongados de tempo (Gulick et al., 1997), elevação nos níveis de células T CD4(+) traduzindo a melhoria do estado imunocompetente e uma melhor expectativa de sobrevida e qualidade de vida dos pacientes (Palella et al., 1998).

Entretanto, a administração inicial da terapia antiretroviral altamente potente geralmente incluía drogas com esquemas de dosagens complexos, requerimentos de restrição alimentar, efeitos adversos relacionados ao tratamento e a necessidade da ingestão diária de 16 a 20 comprimidos.

Estas barreiras resultavam, frequentemente, em fraca adesão dos pacientes ao tratamento, com subsequente falência terapêutica e o desenvolvimento de linhagens virais resistentes aos compostos inibidores da transcriptase reversa e protease.

A indicação para início do tratamento e o fornecimento de informações sobre a resposta à terapia baseiam-se em dois principais marcadores: a contagem de células T CD4(+) e a carga viral (Weller et al., 2008). Normas atuais e informações contidas em manuais específicos sugerem o início da terapia em pacientes que

apresentem sinais e sintomas clínicos definindo a síndrome da imunodeficiência adquirida, independente da contagem de células T CD4(+) ou da carga viral ou em pacientes assintomáticos, com contagem de células T CD4(+) equivalente a 350 células/mm³ ou abaixo deste valor.

Em pacientes que apresentem contagens superiores a 350 células/mm³ e valores de carga viral acima de 100.000 cópias/mL, a decisão de início da terapia fica a critério do médico responsável pelo atendimento ao paciente, sendo que alguns preferem retardar o tratamento e outros consideram o seu início imediato.

O tratamento será postergado em pacientes que apresentem contagens de células T CD4(+) acima de 350 células/mm³ e cargas virais abaixo de 100.000 cópias/mL.

Quando há indicação para o início da terapia, a seleção dos fármacos apropriados é baseada em diferentes fatores como: gravidez; presença de comorbidades (doença hepática, depressão, doenças cardiovasculares); potencial de aderência (regime de dosagens, quantidade de comprimidos, frequência das doses); restrições alimentares (dosagens em relação às refeições); efeitos adversos das drogas; e potencial de interação dos antiretrovirais incluídos no tratamento.

Nos últimos oito anos, novos agentes antivirais foram introduzidos no esquema terapêutico, visando propiciar melhorias na aderência dos pacientes submetidos ao tratamento, tais como: dosagens mais convenientes, objetivando a diminuição do número de comprimidos a ser ingerido; alterações na formulação e farmacocinética, resultando em redução na frequência das dosagens ou na quantidade de pílulas; e dosagens coformuladas, contendo duas ou mais drogas em um único comprimido.

Outros aperfeiçoamentos incluíram o aumento da potência de novos agentes, fármacos eficazes contra linhagens virais altamente resistentes, melhorias no perfil de efeitos adversos (diminuição de efeitos gastrointestinais, melhoria do perfil lipídico) e o reforço dos inibidores de protease com ritonavir, potente inibidor da ação do citocromo p450.

4.1 Terapia antiretroviral em crianças infectadas por HIV

4.1.1 Parâmetros imunológicos e virológicos

Estudos envolvendo crianças infectadas por HIV-1 são de grande interesse, uma vez que elas apresentam comportamento imunológico especial, demonstrando elevadas cargas virais e rápida evolução à AIDS, na ausência de tratamento.

Nas crianças infectadas por transmissão vertical observa-se diferente evolução da dinâmica viral quando comparada ao padrão apresentado por adultos.

A viremia primária ocorre, geralmente, no início da vida, quando o sistema imune não é, ainda, totalmente competente e picos de viremia podem ser registrados aos dois meses de vida, atingindo valores muito elevados, frequentemente superiores a 1.000.000 cópias/mm³.

Além disto, decréscimos da carga viral são mais lentos, com taxas de declínio observadas mesmo na ausência da terapia antiretroviral, estimadas em 0,6 log/ano nos primeiros dois anos de vida e 0,3 log/ano até os quatro a cinco anos de idade.

A decisão de início da terapia antiretroviral em crianças infectadas por HIV-1 é bastante crítica e deverá considerar todos os riscos e benefícios envolvidos, além do potencial de adesão ao tratamento.

A indicação para o início da terapia também considera, além da avaliação clínica, uma cuidadosa avaliação de parâmetros imunológicos, expressos por valores absolutos e percentuais de linfócitos T CD4(+) e parâmetros virológicos, traduzidos por taxas da carga viral.

Os níveis de carga viral devem estar associados à contagem de células TCD4+ e evolução clínica de cada paciente, para melhor definição do prognóstico, principalmente em crianças abaixo dos 30 meses de vida.

Em crianças com idade superior a 30 meses, níveis de carga viral acima de 100.000 cópias por mililitro de plasma e contagem de células T CD4+ abaixo de 15% são preditores independentes de risco aumentado para a progressão clínica ou óbito.

O declínio da carga viral, após testes confirmados em uma segunda determinação, é importante sob os aspectos clínico e biológico, se forem observadas alterações superiores a cinco vezes (0,7 log) em crianças abaixo de

dois anos de idade e de ao menos três vezes (0,5 log) naquelas acima de dois anos.

No Brasil, a classificação da infecção por HIV, em crianças, segue parâmetros clínicos e imunológicos propostos pelo Centers for Disease Control and Prevention, em 1994, com a inclusão da tuberculose pulmonar como um critério para a categoria clínica B, devido às suas características epidemiológicas (Ministério da Saúde, 2004).

A classificação da infecção por HIV, em população pediátrica abaixo de 13 anos de idade está indicada no quadro 1.

Quadro 1 – Classificação da infecção pelo HIV em crianças e adolescentes menores de 13 anos, relacionada a sintomas clínicos e alteração imunológica.

Alteração imunológica	N	A	B	C
Ausente (1)	N1	A1	B1	C1
Moderada (2)	N2	A2	B2	C2
Grave (3)	N3	A3	B3	C3

N: ausência de sinais e/ou sintomas clínicos. A: sinais e/ou sintomas clínicos leves. B: sinais e/ou sintomas clínicos moderados. C: sinais e/ou sintomas clínicos graves.

De acordo com o consenso sobre terapia antiretroviral para crianças infectadas por HIV no Brasil (Ministério da Saúde, 2007), a indicação para o início do tratamento deve levar em consideração parâmetros virológicos associados à sintomatologia clínica e parâmetros imunológicos, adequados à idade da criança.

As categorias imunológicas para a classificação da infecção por HIV em crianças até treze anos de idade estão indicadas no quadro 2.

Quadro 2 – Categorias imunológicas da classificação da infecção por HIV em crianças e adolescentes abaixo de 13 anos.

Alteração imunológica	Contagem de linfócitos T CD4+ de acordo com a faixa etária		
	< 12 meses	1 a 5 anos	6 a 12 anos
Ausente (1)	>1.500 (>25%)	≥1.000 (≥25%)	≥500 (≥25%)
Moderada (2)	750-1499 (15-24%)	500-999 (15-24%)	200-499 (15-24%)
Grave (3)	<750 (<15%)	<500 (<15%)	<200 (<15%)

Os critérios atuais estabelecidos para início da terapia, por faixa etária, são descritos a seguir, observando-se que deverão ser considerados os critérios clínicos ou os critérios laboratoriais:

1) Crianças até 11 meses:

Critérios clínicos: categoria B (exceto pneumonia intersticial linfocítica, plaquetopenia, tuberculose pulmonar, febre persistente, pneumonia - único episódio) ou categoria C: tratar.

Critérios laboratoriais: CD4 < 25% ou < 1.500 céls/mm³: tratar

Carga viral > 1.000.000 cópias/mm³: considerar tratamento.

2) Crianças entre 12 e 35 meses:

Critérios clínicos: categoria B (exceto pneumonia intersticial linfocítica, plaquetopenia, tuberculose pulmonar, febre persistente, pneumonia - único episódio) ou categoria C: tratar.

Critérios laboratoriais: CD4 < 20% ou < 750 céls/mm³: tratar

Carga viral > 250.000 cópias/mm³: considerar tratamento.

3) Crianças entre 36 e 59 meses:

Critérios clínicos: categoria C: tratar.

Critérios laboratoriais: CD4 < 15% ou < 350 céls/mm³: tratar

Carga viral > 250.000 cópias/mm³: considerar tratamento.

4) Crianças até os 5 anos de idade:

Critérios clínicos: categoria C: tratar.

Critérios laboratoriais: CD4 < 15% ou < 200 céls/mm³: tratar

Carga viral > 250.000 cópias/mm³: considerar tratamento.

4.1.2 Esquemas terapêuticos

A terapia inicial deve ser composta por combinação de, ao menos, três drogas antiretrovirais.

As recomendações feitas pelo Grupo Assessor de Terapia Antiretroviral em Crianças, do Ministério da Saúde, 2006 indicam que esta combinação deve incluir duas drogas da classe dos Inibidores da Transcriptase Reversa Análogos de Nucleosídeo (zidovudina e lamivudina ou estavudina e lamivudina ou abacavir e lamivudina) e uma droga da classe de Inibidores da Transcriptase Reversa Não-análogos de Nucleosídeo (nevirapina, se a criança tiver menos que três anos e nevirapina ou efavirenz se tiver acima de três anos).

A estavudina deverá ser reservada para as situações de contra-indicação absoluta ao uso da zidovudina, uma vez que apresenta elevado risco de causar lipoatrofia (Niehues & Lyall, 2007) e a inclusão dos inibidores de protease ficará reservada aos casos de regimes de falha terapêutica (Ministério da Saúde, 2006).

Alguns efeitos colaterais, relacionados à terapia HAART em crianças, incluem disfunção neuromuscular, cardiomiopatia, pancitopenia, pancreatite e neuropatia. Efeitos colaterais graves, porém raros, consistem em acidose láctica e esteatose hepática (Niehues & Lyall, 2007).

5 MUTAÇÕES E RESISTÊNCIA AOS ANTIRETROVIRAIS

Mutações relacionadas à resistência aos antiretrovirais têm sido relatadas para todos os compostos usados no tratamento de pacientes infectados e, mesmo antes da administração da terapia antiviral, linhagens resistentes podem estar presentes, em reduzidos níveis.

Durante a terapia, a manutenção da supressão viral depende do nível pré-existente de linhagens resistentes, da taxa de replicação viral e da frequência de mutações necessárias ao desenvolvimento de resistência.

A resistência primária às drogas ou resistência transmitida é definida como a resistência observada em indivíduos previamente não tratados.

Uma vez que a resistência aleatória às drogas ocorre sem exposição aos medicamentos, este tipo de resistência implica na transmissão de vírus mutantes resistentes, tanto diretamente como através de um ou mais intermediários, a partir de indivíduos com resistência adquirida.

Indivíduos previamente não tratados incluem pessoas sem tratamento com evidências laboratoriais para a infecção recente (geralmente no período precedente de seis a 18 meses), os recentemente diagnosticados com infecção de duração incerta e aqueles previamente diagnosticados com infecção de duração incerta.

A infecção primária por HIV-1 deve ser distinguida da resistência primária às drogas. Na infecção, o termo “primária” é usado para descrever pessoas que tenham sido recentemente infectadas e, na resistência, refere-se a indivíduos com resistência viral transmitida.

A resistência secundária às drogas ou resistência adquirida é definida como a forma de resistência desenvolvida em pessoas que tenham sido submetidas à terapia antiretroviral.

A resistência adquirida resulta do surgimento da variação genética da população de vírus no indivíduo infectado, seguida pela seleção das variantes resistentes às drogas durante a terapia.

5.1 Padrões de resistência viral

Padrões de mutação no gene pol do HIV-1 têm sido relatados para os compostos NRTIs, NNRTIs e PIs usados no tratamento de pacientes infectados, na

vigência da terapia antiretroviral prolongada (Brenner et al., 2002; Coffin, 1995) ou em pacientes que não apresentam tratamento prévio (Nájera et al., 1995, Pieniazek et al., 2000).

O nível de resistência aos inibidores de RT análogos de nucleosídeo é proporcional ao número de mutações que ocorrem na região codificando para a enzima do HIV-1 (Richman et al., 1991), enquanto que, para os não análogos, uma única mutação é suficiente para conferir resistência aos compostos atualmente utilizados no tratamento antiviral.

As mutações primárias são, geralmente, selecionadas no início do processo de acúmulo de mutações que conferem resistência aos antiretrovirais; são relativamente específicas aos inibidores e podem atuar na suscetibilidade viral à droga.

As mutações secundárias acumulam-se em genomas virais que já apresentem uma ou mais mutações primárias.

Algumas mutações secundárias podem apresentar pouco ou não apresentarem, individualmente, efeito considerável sobre a resistência viral; entretanto, a seleção pode ocorrer mais pelo fato de poderem estimular a capacidade de replicação viral do que pelo decréscimo de ligação da droga às enzimas-alvo.

Em geral, os efeitos clínicos decorrentes de muitas destas mutações se sobrepõem.

5.2 Mutações de resistência aos NRTIs

O padrão utilizado, até recentemente, para a classificação das mutações de resistência aos NRTIs, apresentava-se dividido em quatro categorias:

1) Mutações aos análogos de timidina (TAMs), selecionadas, predominantemente, pelo uso de zidovudina e estavudina, mas com resistência cruzada a outros NRTIs.

2) Mutações associadas às TAMs que incluíam as mutações 44AD, 69DN, 69_ins, 75TMA e 118I, sendo que as mutações E44D e V118I, polimórficas, foram observadas em cerca de 2% de indivíduos não tratados.

3) Mutações discriminatórias (65R, 74VI, 115F, 184VI), que permitem à enzima RT reconhecer diferenças estruturais entre NRTIs e dNTPs, prevenindo a adição dos NRTIs ao alongamento da cadeia de DNA viral.

4) Mutações padrão Q151M, nos códons 62V, 75I, 77L, 116Y, geralmente associadas à Q151M, que confere multiresistência aos NRTIs.

Entretanto, em 2007, foram propostas por Shafer et al., considerações para o desenvolvimento de uma lista provisória de mutações de resistência viral para estimativas epidemiológicas, incluindo mutações que causem ou contribuam para a resistência, que sejam desenvolvidas em indivíduos em tratamento e aplicáveis a todos os subtipos virais do grupo M.

Neste trabalho, as mutações incluídas foram definidas de acordo com três ou mais de cinco listas de especialistas sobre resistência do HIV-1 aos antiretrovirais: 1) International AIDS Society - USA; 2) Los Alamos HIV Sequence Database; 3) HIVdb drug resistance interpretation algorithm (version 4.1.9); 4) ANRS drug resistance interpretation algorithm (version 2005.07) e 5) Rega Institute drug resistance interpretation algorithm (version 6.4.1).

Assim, uma nova classificação de mutações, disponibilizada pelo banco de dados de resistência do HIV aos antiretrovirais, da universidade de Stanford, foi utilizada para a análise das mutações de resistência viral observadas no presente trabalho, agrupadas como descrito a seguir:

1) Mutações aos análogos de timidina (TAMs): a nomenclatura foi preservada para esta classe. As TAMs, também denominadas mutações de excisão de nucleotídeo, promovem o desbloqueio de cadeias de DNA viral interrompidas por ação dos NRTIs, através de fosforólise via ATP e ocorrem nos códons : 41, 67, 70, 210, 215 e 219. Os análogos de timidina incluem zidovudina e estavudina.

2) Mutações aos não-análogos de timidina: referem-se a regimes terapêuticos incluindo abacavir, didanosina ou tenofovir. Incluem as mutações nos códons 65, 70, 74,75 e 115.

3) Mutações de resistência a múltiplos NRTIs: ocorrem nos códons 62, 75, 77 e 116, associadas às mutações no códon 151 que conferem elevados níveis de resistência a abacavir, didanosina, estavudina e zidovudina.

4) Mutações adicionais: foram estabelecidas nesta categoria as mutações D67GE, T69DSAING, K70N, V75AS e K219NR.

5) Mutações acessórias: ocorrem com as TAMs e estão associadas a reduções na suscetibilidade a múltiplos NRTIs. Estas mutações incluem: K43EQN, E44DA, V118I, H208Y, D218E, H221Y, L228HR e N348I.

6) Mutações de hipersuscetibilidade: várias mutações estão associadas à suscetibilidade aumentada aos NRTIs. A mutação M184VI aumenta a suscetibilidade a zidovudina, tenofovir e estavudina; a L74V está relacionada a zidovudina e tenofovir; e as mutações K65R e K70E aumentam a suscetibilidade à zidovudina.

Na figura 12 estão representados alguns sítios de mutação na subunidade p66 de RT conferindo resistência aos antiretrovirais.

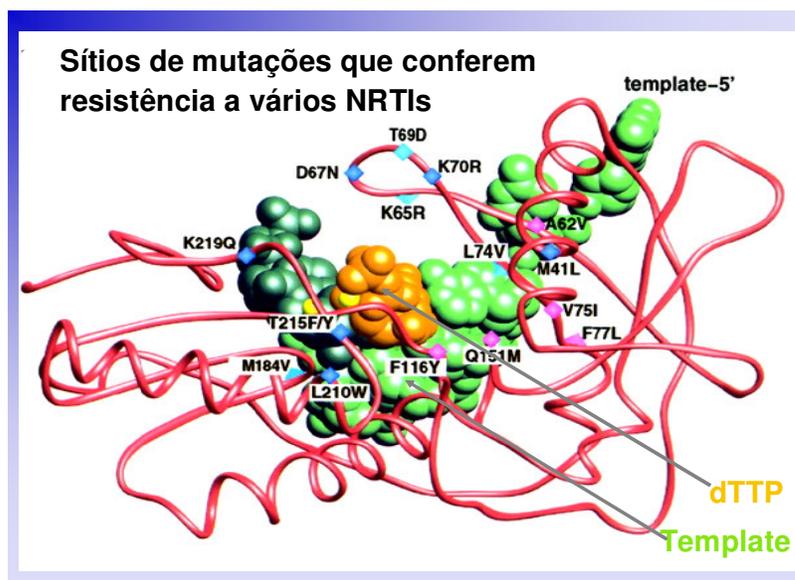


Figura 12 - Representação esquemática da subunidade p66, com sítios de mutações de resistência a vários inibidores de RT. [acesso em 18/03/2007]. Disponível em: <http://www.hivinsite.ucsf.edu/>.

Dentre as mutações aos análogos de timidina, as que ocorrem no códon 215 podem acarretar a substituição da treonina por tirosina ou fenilalanina, resultando em distintos padrões TAM-1 e TAM-2, biologicamente importantes.

No padrão TAM-1, a mutação T215Y pode ocorrer sozinha ou em associação às mutações M41L e L210W.

No segundo padrão, a mutação T215F apresenta-se associada às mutações D67N, K70R e K219Q.

De acordo com Hu et al., 2006, vírus mutantes T215Y apresentam cinética de replicação mais rápida e fitness relativamente maior, quando comparados a mutantes T215F, na presença ou ausência de zidovudina.

Além disso, apresentam maior infectividade que HIV-1 tipo selvagem, em diferentes concentrações de zidovudina, em relação aos mutantes T215F, sendo esta a explicação para que a mutação T215Y, e não a T215F, surja, geralmente, como a principal mutação TAM.

5.3 Mutações de resistência aos NNRTIs

Para os NNRTIs, o padrão de classificação de mutações era dividido em três classes, de acordo com a posição das mutações:

1) Mutações nas posições 98-108: 98G, 100I, 101E, 101P, 103NS, 106A, 106M, 108I.

2) Mutações nas posições 179-190: 179DE, 181CIV, 188L, 188CH, 190A, 190S, 190EQC.

3) Mutações nas posições 225-238: 225H, 227L, 230L, 236L, 238TN, 318F.

De acordo com a nova classificação, temos:

1) Mutações de resistência aos NNRTIs: incluem A98G, L100I, K101EP, K103NS, V106AM, V108I, V179DEF, Y181CIV, Y188LHC, G190ASE, P225H, F227LC, M230L, P236PL, K238T, todas elas conferindo diferentes níveis de resistência a nevirapina, delavirdina e efavirenz, com exceção das mutações P225H, com resistência somente a efavirenz e P236L, com resistência somente a delavirdina. Adicionalmente, as mutações A98G, L100I, K101EP, V179DEF, Y181CIV, Y188LHC, G190ASE, F227C e M230L conferem resistência à etravirina.

2) Mutações adicionais: incluem várias mutações incomuns, associadas à terapia com NNRTIs e à suscetibilidade reduzida a estes compostos. São as mutações: K101NH, K103TH e G190QCTV.

3) Mutações polimórficas: as mutações A98S, K101RQ, V106I, E138A, V179I e K238R são substituições polimórficas com pouco efeito sobre a resistência aos antiretrovirais. A exceção a este grupo é a substituição polimórfica K103R, que ocorre em cerca de 1% a 2% de indivíduos não tratados, reduzindo a suscetibilidade, em

quinze vezes, a nevirapina, delavirdina e efavirenz, quando associada à mutação V179D.

4) Mutações em posições adicionais: incluem E138K, selecionada por etravirina e causa redução à suscetibilidade a cada um dos NNRTIs; L234I, também selecionada por etravirina e atua sinergicamente à mutação Y181C na redução à suscetibilidade a esta droga; L318F, mutação não polimórfica, selecionada pelos NNRTIs, causando redução à suscetibilidade a delavirdina, nevirapina e, possivelmente, etravirina.

As mutações de resistência aos NNRTIs são encontradas próximas ao sítio hidrofóbico da subunidade p66 de RT. Na figura 13 está indicado o local para a ligação dos NNRTIs.

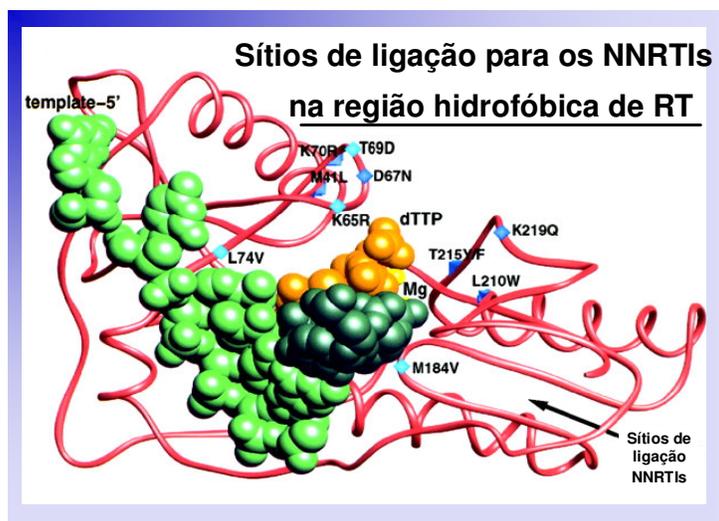


Figura 13 - Sítios de ligação aos NNRTIs estão próximos ao sítio hidrofóbico da subunidade p66. [acesso em 18/03/2007]. Disponível em: <http://www.hivinsite.ucsf.edu/>.

5.4 Mutações de resistência aos PIs

As mutações selecionadas pelos antiretrovirais inibidores de protease afetam, diretamente, o sítio catalítico enzimático (posições 25 a 27), causando resistência pelo decréscimo da capacidade de ligação destes quimioterápicos.

O padrão de classificação das mutações de resistência aos PIs apresentava-se dividido em cinco categorias:

1) Mutações principais ou primárias: observadas precocemente no tratamento com PIs, com origem no centro ativo da enzima, reduzindo a capacidade de fixação do antiretroviral à enzima. Incluíam as mutações nos códons 30N, 48VM, 50LV, 82ATFSML, 84VAC, 90M.

2) Mutações secundárias: localizadas fora do centro catalítico da enzima, compensando a perda de *fitness* viral causada pelas mutações principais. Incluíam os códons: 46ILV, 47V, 47A, 53L, 54VATS, 54ML.

3) Mutações de exposição prévia aos PIs: geralmente atuando como mutações acessórias, foram definidas nos códons: 23I, 24I, 32I, 33F, 73CSTA, 76V, 88D, 88S.

4) Mutações polimórficas: contribuíam para a resistência apenas quando associadas a uma ou mais mutações principais, secundárias e de exposição prévia. Estas mutações eram: 10IV, 20RMIVT, 36IVLT, 63P, 71VTI, 77I, 93L.

5) Mutações de resistência a atazanavir, tipranavir ou darunavir: definidas nos códons 11I, 13V, 35G, 43T, 58E, 60E, 62V, 74SPA, 83D, 85V, 89V.

Na figura 14 estão indicadas as posições em protease para algumas mutações de resistência aos PIs.

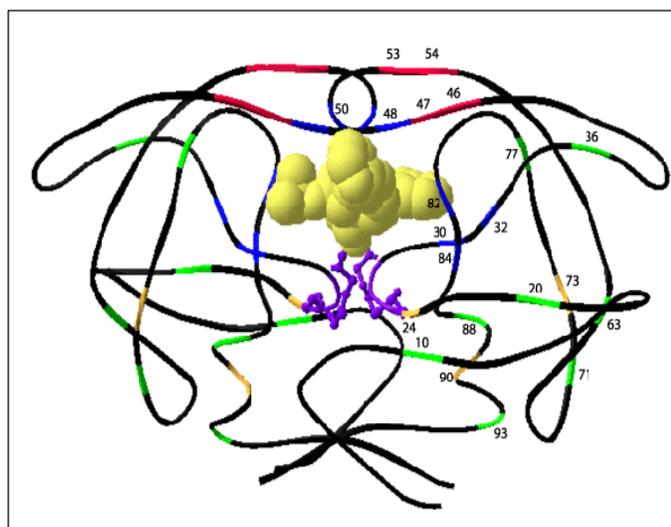


Figura 14 - Modelo estrutural do homodímero - protease do HIV-1, com mutações de resistência aos PIs indicadas em uma das subunidades (Chen et al., 1994).

A nova classificação para as mutações no gene da protease foi estabelecida como descrito a seguir:

1) Mutações de resistência aos PIs: incluem as mutações L23I, L24I, D30N, V32I, V33F, M46IL, I47VA, G48VM, I50LV, F53L, I54VTALM, G73ST, L76V, V82ATFSL, I84VAC, N88DS, L90M.

2) Mutações adicionais: várias mutações incomuns adicionais, selecionadas por PIs, incluem L24F, L33I, M46V, F53Y, I54S, G73CA, V82MC e N88TG.

3) Mutações acessórias: mutações acessórias polimórficas ocorrem nos códons L10IV, I13V, K20RMI, M36I, D6OE, I62V, L63P, A71VT, V77I e I93L, enquanto que as não-polimórficas são observadas nas posições L10FR, V11I, E34Q, E35G, K43T, K45I, K55R, Q58E, A71IL, T74PAS, V75I, N83D, P79AS, I85V, L89V, T91S, Q92K e C95F.

Os polimorfismos são definidos como mutações naturais que ocorrem, frequentemente, em vírus não expostos à pressão seletiva das drogas e as mutações não-polimórficas são aquelas que não ocorrem na ausência de terapia.

4) Mutações de hipersuscetibilidade: a mutação I50L aumenta a suscetibilidade a todos os PIs, com exceção de atazanavir; I50V e I54L aumentam a suscetibilidade a tipranavir; N88S aumenta a suscetibilidade a fosamprenavir e a mutação L76V aumenta a suscetibilidade a atazanavir, saquinavir e tipranavir.

5.5 Mutações de resistência aos inibidores de fusão

Mutações no gene *env* do HIV-1, que codifica para a glicoproteína 41 (gp41), domínio HR-2, foram relatadas em oito posições conferindo resistência ao enfuvirtide.

Estas mutações são: G36DEVs, I37V, V38EAMG, Q40H, N42T, N43DKS, L44M e L45M.

A mutação adicional N42S é o único polimorfismo comum observado entre os códons 36 a 45. Ela ocorre em cerca de 15% dos isolados virais de indivíduos não tratados e não altera a suscetibilidade ao ENF.

Mutações acessórias, em posições adicionais na região HR-2, incluem N126K, N137K e S138A.

Estas mutações, associadas a outras mutações específicas nas posições 36 a 45, contribuem para uma capacidade melhor de replicação viral.

5.6 Mutações de resistência aos inibidores de integrase

Mutações de resistência aos inibidores de integrase (INIs), selecionadas em indivíduos em tratamento com raltegravir ou elvitegravir, têm sido caracterizadas para a suscetibilidade *in vitro*.

Mutações de resistências às duas drogas foram reportadas nos códons E92Q, F121Y, E138AK, G140AS, S147G, Q148HRK, N155HS e E157Q.

As mutações T66I, S153Y e R263K estão relacionadas à resistência ao elvitegravir e a mutação Y143CHR, ao raltegravir.

Outras mutações, selecionadas *in vitro* ou *in vivo* por raltegravir incluem as mutações não-polimórficas H183P, Y226DFH, S230R e D232N e as mutações polimórficas L74M, T97A, V151I, G163R, I203M e S230N. As selecionadas por elvitegravir incluem as não-polimórficas H51Y, Q95K e Q146P.

Na classe de mutações adicionais de resistência aos INIs estão incluídas as mutações não-polimórficas T125K, A128T, Q146K, N155S e K160D e as polimórficas V72I, A154I, V165I e V201I.

6 MODELAGEM MOLECULAR

A farmacoterapia em pacientes infectados por HIV e o desenvolvimento de regimes antiretrovirais seguros e eficazes têm sido dificultados por inúmeros fatores, incluindo-se o rápido desenvolvimento de resistência viral à terapia, a estreita faixa terapêutica de compostos medicamentosos e a ausência de conhecimento fundamental referente às fontes de variação na exposição e resposta aos agentes antiretrovirais.

As fontes de variação podem incluir fatores tais como diferenças interpacientes na expressão genética, resposta imunológica, patogênese, fatores epidemiológicos, sócio-econômicos e demográficos.

Técnicas de modelagem e simulação tornaram-se valiosas alternativas na identificação e quantificação da variabilidade na exposição e resposta aos agentes antiretrovirais. A sua aplicação pode ser um componente essencial no desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento da AIDS.

Vários trabalhos estão disponíveis, na literatura científica, relacionados ao tema, abordando não só o desenvolvimento da resistência aos antiretrovirais e a importância dos resultados na contribuição para a elaboração de novos fármacos como também aspectos elucidativos sobre mecanismos moleculares antagônicos entre mutações de resistência.

Herschhorn et al., 2007 utilizaram a modelagem molecular, em uma pesquisa desenvolvida em Israel, para a obtenção de compostos de amplo espectro inibidores da replicação viral, que pudessem atuar contra cepas virais selvagens e variantes resistentes às drogas antiretrovirais, desenvolvendo cepas com mutações de resistência na transcriptase reversa do HIV.

Os autores observaram que, de vinte e sete diferentes compostos sintetizados e analisados, quatro inibiram a atividade DNA polimerase de RT com valores de IC_{50} abaixo de 10 μ M.

Um dos compostos apresentou valores de IC_{50} equivalentes a 3,5 μ M, inibindo variantes resistentes de forma mais eficiente do que a nevirapina; além disto, de forma contrária à nevirapina, o composto demonstrou efeito inibitório sobre a atividade ribonuclease H de RT com IC_{50} de 20 μ M, atuando, assim, sobre ambas as atividades enzimáticas da transcriptase reversa.

De acordo com os autores, este novo composto poderá ser utilizado como modelo para a síntese de outros inibidores de RT.

Em um outro estudo, associando-se técnicas de modelagem molecular e cinética, Parikh et al., 2007 analisaram os mecanismos moleculares de antagonismo entre as mutações em análogos de timidina e a mutação K65R na transcriptase reversa de HIV-1.

A mutação K65R diminui a suscetibilidade a todos os inibidores de RT análogos de nucleosídeo aprovados, com exceção da zidovudina, decrescendo seletivamente a incorporação de NRTIs trifosfato em relação ao substrato desoxirribonucleotídeo trifosfato natural.

As mutações em análogos de timidina, mutações TAM, conferem elevado nível de resistência à zidovudina e resistência cruzada a outros inibidores de RT análogos, aumentando a excisão de NRTIs monofosfato terminadores de cadeia através de reação de clivagem fosforolítica.

No trabalho citado, os autores buscaram elucidar os mecanismos bioquímicos e estruturais responsáveis por este antagonismo, analisando a cinética da incorporação de NRTIs trifosfato e excisão de NRTIs monofosfato por enzimas RT contendo as mutações TAMs ou K65R.

Os resultados demonstraram que, a adição da mutação K65R, a dois padrões de mutação TAM clinicamente importantes (M41L, L210W, T215Y ou D67N, K70R, T215F, K219Q), reduziu significativamente a habilidade das enzimas recombinantes na excisão de todos os NRTIs monofosfato terminadores de cadeia.

Além disso, os autores observaram que a adição de mutações TAMs em RT contendo a mutação K65R diminuiu a capacidade enzimática na discriminação aos análogos D-nucleotídeo mas não aos análogos L-nucleotídeo restaurando, parcialmente, o valor máximo de incorporação de NRTIs trifosfato.

Na conclusão do trabalho confirma-se que a mutação K65R antagoniza a atividade de excisão de NRTIs monofosfato em enzimas RT contendo mutações TAMs e que, por outro lado, as mutações TAMs antagonizam a habilidade de enzimas RT contendo K65R em discriminar contra os análogos de nucleotídeo.

Os autores finalizam considerando que terapias que incluem NRTIs que selecionam para ambas as mutações, TAMs e K65R, podem prolongar a resposta ao tratamento, através das interações, mutuamente antagonistas, entre estas mutações de resistência.

7 SUBTIPOS VIRAIS E RESISTÊNCIA AO HIV-1

7.1 Subtipos genéticos do HIV-1

O HIV-1 caracteriza-se por extensa heterogeneidade genética, resultante da interferência de vários fatores, tais como a ausência da capacidade de edição da enzima transcriptase reversa (Roberts et al., 1988), a elevada taxa da dinâmica viral *in vivo* (Ho et al., 1995), pressões seletivas exercidas pelo sistema imune do hospedeiro (Michael, 1999) e os eventos de recombinação de genes durante o processo de replicação viral (Temin, 1993).

Devido à esta diversidade, variantes do HIV-1 são classificadas em três principais grupos filogenéticos: grupo M (*main*), grupo O (*outlier*) e grupo N (*non-M/non-O*) (Ayoub et al., 2000; Gurtler et al., 1994; Simon et al., 1998).

O grupo M, responsável pela maioria das infecções em todo o mundo, pode ser subdividido em dez reconhecidos subtipos filogenéticos ou clades, aproximadamente equidistantes entre si e designados de A a K.

Neste grupo, a média da variabilidade genética intersubtipo é de 15% para o gene *gag* e 25% para o gene *env* (Janssens et al., 1994; Kostrikis et al., 1995; Myers et al., 1992; Robertson et al., 2000).

Além dos subtipos já classificados, é possível identificar, internamente a eles, grupos de isolados virais que formam clades geneticamente relacionadas, denominadas subsubtipos (Robertson et al., 2000). Estes grupos apresentam-se filogeneticamente mais relacionadas entre si do que aos outros subtipos.

Isto ocorre para as clades A e F, com cepas virais atualmente classificadas em subsubtipos A1 e A2, F1 e F2 (Gao et al., 2001; Triques et al., 2000).

As clades B e D estão mais intimamente relacionadas entre si do que aos demais subtipos e a clade D é considerada o precursor da variante clade B africana, mas suas designações originais como subtipos são mantidas pela consistência de trabalhos publicados (Gao et al., 1996; Louwagie et al., 1993).

A classificação de subtipos do HIV-1 foi originalmente baseada em regiões subgenômicas de genes individuais.

Entretanto, com o aumento do número de isolados virais disponíveis em todo o mundo e as melhorias em métodos de sequenciamento, a sua classificação filogenética é, atualmente, baseada tanto em sequências de nucleotídeos derivadas

de múltiplas regiões subgenômicas (*gag*, *pol*, *env*) do mesmo isolado, como na análise da sequência do genoma completo.

Este procedimento tem revelado isolados virais, nos quais as relações filogenéticas, com diferentes subtipos, são trocadas em seus genomas.

Acredita-se que estas formas recombinantes intersubtipo originaram-se em indivíduos infectados com cepas virais de dois ou mais subtipos.

Quando um recombinante viral idêntico é isolado em, no mínimo, três pessoas não relacionadas epidemiologicamente e é caracterizado pelo sequenciamento do genoma completo, ele pode ser designado com uma forma recombinante circulante (CRF).

Acima de 20 CRFs, cujas origens podem ser rastreadas, em áreas onde linhagens parentais são cocirculantes, têm sido reportadas. A cocirculação de múltiplos subtipos e CRFs nas mesmas populações aumenta a probabilidade de que indivíduos tornem-se “superinfectados” com diferentes formas genéticas do HIV-1.

Estas formas podem sofrer trocas de segmentos de seu material genético, resultando na geração de vários recombinantes, chamados formas recombinantes únicas (URFs) que, se disseminadas a outras pessoas, irão gerar as CRFs (McCutchan, 2006).

7.2 Subtipos e resistência viral

A variabilidade genética que caracteriza os diferentes subtipos do HIV-1 e CRFs também afeta os genes da protease e transcriptase reversa que codificam para as enzimas virais consideradas os principais alvos para as drogas antiretrovirais.

Caso estes polimorfismos confirmem resistência às drogas, poderão ser selecionados pela pressão seletiva, influenciando, dramaticamente, o resultado terapêutico.

Alternativamente, os polimorfismos podem não conferir resistência às drogas, mas podem alterar a barreira genética, definida como o número de mutações virais requeridas para desenvolver mutações de escape, capazes de manter sob controle a pressão seletiva das drogas.

Em geral, várias mutações são requeridas para que o HIV torne-se resistente aos inibidores de protease (alta barreira genética), enquanto que uma única substituição de aminoácidos pode induzir resistência aos inibidores de transcriptase reversa não análogos de nucleosídeo (baixa barreira genética) (Beerenwinkel et al., 2005).

A frequência e padrão, dentre os subtipos de HIV-1, de polimorfismos que possam induzir à resistência ou levar à emergência mais rápida de resistência às drogas, sob pressão farmacológica, têm sido avaliados em vários trabalhos recentes.

Em particular, considerando a pouca informação em subtipos não-B, predominantes em países onde a disponibilidade da terapia antiretroviral é bastante limitada, maior ênfase tem sido dada aos estudos comparativos de subtipos B e não-B.

Em um estudo europeu, envolvendo pacientes virgens de tratamento, foram analisadas aproximadamente 2.000 sequências para os genes da protease e transcriptase reversa, das quais 600 eram de subtipo não-B. Observou-se que a barreira genética foi bastante similar para ambos os grupos de subtipo, B e não-B, em todas as posições dos codons avaliados (van de Vijver et al., 2006).

Em adição, dados específicos estão disponíveis para as classes individuais de drogas antiretrovirais. Em relação às poucas posições na sequência da protease, onde foram encontradas diferenças, tais como os polimorfismos 82A e 82T, a barreira genética apresentou-se mais baixa para o subtipo C e mais elevada para o subtipo G, sugerindo que determinados subtipos não-B podem requerer ainda mais mutações que o subtipo B para o desenvolvimento de resistência.

Além disso, polimorfismos específicos em protease podem conferir maior suscetibilidade aos inibidores de protease, em outros subtipos não-B. Em particular, vírus subtipo C e recombinantes CRF02_AG, de pacientes virgens de tratamento, demonstraram, *in vitro*, hipersuscetibilidade a estas drogas (Abecasis et al., 2006).

Diferenças em substituições de menor importância na protease também foram encontradas entre os subtipos. Estas substituições não dificultam a suscetibilidade às drogas, mas podem afetar a via genética de resistência, após o desenvolvimento de relevantes substituições principais (Gonzalez et al., 2004, Menzo et al., 2004). Isto significa que a emergência mais rápida de resistência a um particular inibidor de protease poderia ser esperada em alguns subtipos não-B.

Em relação aos compostos NRTIs, os subtipos não-B não demonstram uma barreira genética mais baixa em quaisquer substituições associadas à resistência, indicando uma evolução ao fenótipo droga-resistente em uma taxa comparável à dos isolados subtipo B.

Para as substituições relacionadas à resistência aos NNRTIs, a informação mais relevante é a barreira genética reduzida para a substituição V106M no subtipo C, observada em diferentes estudos e que confere resistência em altos níveis a todos os NNRTIs (van de Vijver et al., 2006).

Em particular, a mutação V106M em RT é facilitada, no subtipo C, por uma única transição (GTG para ATG), comparada a duas transições em vírus de outros subtipos (GTA para ATG).

Além disso, a resistência natural aos NNRTIs tem sido observada em pacientes com vírus HIV-1 do grupo O (Quiñones-Mateu et al., 1998) e acredita-se haver uma base genética relacionada ao polimorfismo natural em RT, Y181C, similar ao divergente Y181I, observado em HIV-2 naturalmente resistente aos NNRTIs (Spira et al., 2003).

A ausência de mutações de resistência em pacientes virgens de tratamento, com vírus de subtipo não-B, e a substancial similaridade entre os subtipos B e não-B no grau de probabilidade de desenvolvimento de resistência às drogas são confirmadas por uma suscetibilidade às drogas geralmente conservada *in vivo*. De fato, a eficácia da terapia antiretroviral de primeira linha parece não ser afetada pelos subtipos do HIV-1 e, os inibidores de protease e transcriptase reversa, atualmente disponíveis, são igualmente ativos para todos os subtipos virais (Bocket et al., 2005).

Um estudo global baseado em 3.686 sequências de subtipo não-B demonstrou que a maioria das posições em RT e PR, associadas com resistência às drogas no subtipo B, é selecionada pelos antiretrovirais em um ou mais subtipos não-B. Adicionalmente, observou-se não haver evidências suficientes de que vírus não-B possam desenvolver resistência por mutações em posições não associadas à resistência em vírus com subtipo B (Kantor et al., 2005).

Entretanto, poucas exceções a esta regra geral têm sido reportadas em pacientes em tratamento com antiretrovirais. Um estudo sobre a prevenção da transmissão mãe-filho, em Uganda, mostrou que uma única dose de nevirapina induziu a seleção mais frequente de mutações genotípicas, associadas com a

resistência à nevirapina, em mulheres infectadas com o subtipo D do que naquelas infectadas com o subtipo A (Eshleman et al., 2001).

8 OBJETIVOS

8.1 Objetivo primário

- Avaliar a ocorrência de linhagens virais ou subpopulações do HIV-1, resistentes aos antiretrovirais, em pacientes pediátricos infectados, com indicação para a terapia antiretroviral, aplicando-se técnicas de biologia molecular e sequenciamento genômico.

8.2 Objetivos secundários

- Avaliar subtipos virais na população em estudo através da análise filogenética
- Analisar o perfil de mutações observadas em amostras de subtipos B e não-B
- Avaliar a presença de recombinantes na população em estudo
- Avaliar os valores da carga viral e linfócitos T CD4(+) relacionados às terapias pregressas e atuais, em função dos resultados de genotipagem

9 CASUÍSTICA

9.1 Pacientes

A população de estudo consistiu em crianças, de ambos os sexos, comprovadamente infectadas, nascidas de mães soropositivas para HIV, atendidas no Departamento Materno-Infantil do Hospital Universitário Pedro Ernesto, Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ, RJ, Brasil).

9.2 Critérios de inclusão

Os pacientes incluídos no estudo preencheram os seguintes critérios:

- Crianças, de ambos os sexos, até a idade de 16 anos.
- Presença ou não de sinais e sintomas clínicos
- Classificação em categorias clínicas definidas de acordo com adaptação de critérios estabelecidos pelo Centers for Disease Control and Prevention (1994) e parâmetros laboratoriais.
- Vigência ou indicação para o início de tratamento antiretroviral.

9.3 Termo de consentimento

Os pais ou tutores responsáveis pela guarda das crianças foram informados sobre o desenvolvimento deste trabalho e questionados sobre a aprovação da inclusão da criança, através do termo de consentimento informado. Os Comitês de Ética em Pesquisa do Instituto Oswaldo Cruz e do Hospital Universitário Pedro Ernesto aprovaram o protocolo de estudo (CEP IOC/FIOCRUZ CAAE-0024.0.011.000-04; CEP HUPE CAAE-0049.0.228.000-05).

10 DESENHO DE ESTUDO E PLANO DE TRABALHO

Trata-se de um ensaio observacional não-controlado. Foram incluídas no projeto 25 crianças infectadas por HIV, que atenderam aos critérios de elegibilidade, sendo 12 crianças do sexo masculino e 13 do sexo feminino. O período de acompanhamento estendeu-se de fevereiro de 2005 a agosto de 2008.

A inclusão das crianças no estudo foi feita através de fluxo contínuo, à medida que, conforme fossem encaminhadas ao serviço médico de atendimento, atendessem aos critérios estabelecidos.

Os levantamentos clínico-epidemiológicos e laboratoriais foram feitos por consulta às fichas de cada paciente, arquivadas no consultório de atendimento em pediatria do Departamento Materno-Infantil do Hospital Universitário Pedro Ernesto.

Este levantamento teve como finalidade a obtenção dos valores de carga viral e níveis de linfócitos T anteriores à execução do teste de genotipagem, para comparação de resultados, havendo ou não indicação para a alteração dos esquemas terapêuticos.

Os participantes do estudo foram avaliados clinicamente nas visitas pré-determinadas e encaminhados ao Laboratório Central do Hospital Universitário Pedro Ernesto para a coleta de amostras de sangue para a execução dos testes de carga viral e avaliação dos níveis de linfócitos T.

Amostras de sangue para o teste de genotipagem foram coletadas no mesmo dia das visitas e encaminhadas ao Departamento de Virologia do Instituto Oswaldo Cruz (IOC/FIOCRUZ).

Os resultados dos testes de genotipagem foram repassados aos médicos responsáveis pelo atendimento às crianças, para que fossem feitas as adequadas alterações terapêuticas.

11 PROCEDIMENTOS E MÉTODOS LABORATORIAIS

11.1 Parâmetros clínicos

11.1.1 Categorias clínicas

Dentre as 25 crianças incluídas neste trabalho, 12 foram classificadas na categoria clínica C3, duas na categoria C2 e, as duas restantes, na categoria C1 indicando, em todas elas, a presença de sinais e/ou sintomas clínicos graves com, respectivamente, grave alteração imunológica, moderada alteração imunológica e ausência de alteração imunológica.

Três crianças foram classificadas na categoria clínica B1, três na categoria B2 e uma criança na categoria B3, apresentando moderados sinais e/ou sintomas clínicos.

Uma das duas crianças restantes foi classificada na categoria A2, apresentando leves sinais e/ou sintomas clínicos e moderada alteração imunológica e a outra criança foi classificada na categoria clínica N3, sem importantes sinais ou sintomas clínicos, mas com grave alteração imunológica.

11.1.2 Terapia antiretroviral

Vinte e uma crianças encontravam-se sob terapia antiretroviral por períodos prolongados, com variação entre dois a dez anos (média 5,5 anos) previamente à avaliação da resistência viral por genotipagem.

Os regimes terapêuticos incluíram diferentes possibilidades: a associação de duas drogas, AZT + ddl ou AZT + 3TC foi administrada a três crianças. Nos demais pacientes, a terapia antiretroviral altamente potente (HAART) foi administrada de acordo com a seguinte associação: 1) AZT, 3TC associados a NFV ou ABC ou RTV ou EFV ou NVP ou Kaletra (LPV+RTV); 2) AZT, ddl associados a NVP ou Kaletra; 3) AZT, TDF, 3TC, RTV; 4) 3TC, d4T associados a APV ou NFV ou Kaletra; 5) 3TC, ABC, Kaletra. Quatro crianças, virgens de tratamento, tiveram a terapia HAART iniciada no momento de sua inclusão no estudo.

11.2 Procedimentos laboratoriais

11.2.1 Processamento das amostras de sangue

Amostras de sangue, em volume de 5mL, foram coletadas pelo Laboratório Central do Hospital Universitário Pedro Ernesto para a execução dos testes de carga viral e metodologia de citometria de fluxo para a avaliação dos níveis de linfócitos T.

Para a execução do teste de genotipagem, foram coletadas, de cada criança, duas amostras de sangue, em volume de 5mL, encaminhadas ao Departamento de Virologia do Instituto Oswaldo Cruz, para a separação do plasma. As amostras de plasma foram estocadas a -20°C , até seu processamento para a extração do RNA viral.

11.2.2 Carga viral

A avaliação da carga viral foi feita utilizando-se conjuntos diagnósticos comerciais, NucliSens HIV-1 QT (NASBA, bioMerieux Inc., Durham, North Carolina) com limite mínimo de quantificação fixado em 80 cópias de RNA/mL ou Quantiplex HIV-1 RNA 3.0 Assay (bDNA, Bayer Diagnostics, Walpole, Massachusetts) com limite mínimo de quantificação estabelecido em 50 cópias de RNA/mL, de acordo com as especificações dos fabricantes.

11.2.3 Citometria de Fluxo

As subpopulações de células T foram avaliadas através da metodologia de citometria de fluxo para a quantificação de células CD4⁺ e CD8⁺, utilizando-se citômetro FACSCalibur, Becton-Dickinson (FACSCountTM), como descrito (de Wolf et al., 1988).

A metodologia utilizada resume-se, basicamente, no seguinte procedimento: a partir de amostras de sangue total, células mononucleares do sangue periférico foram separadas por gradiente de densidade em Ficoll e tratadas com anticorpos monoclonais específicos para receptores de linfócitos, marcados com fluorocromos.

As amostras foram introduzidas na câmara de fluxo vibratório do separador de células ativadas por fluorescência, que fornece a contagem de linfócitos T CD4+, CD8+ e CD3+, em números absolutos por microlitro de sangue, e a razão CD4+/CD8+.

11.2.4 rt-PCR e genotipagem

As amostras de sangue de cada paciente foram processadas para a separação do plasma, utilizado para a extração de RNA-HIV.

As amostras de plasma apresentando valores de carga viral inferiores a 1.000 cópias/mL foram previamente concentradas por centrifugação a 15.000 rpm por 30 minutos e, a seguir, processadas como descrito: o RNA HIV-1 foi extraído utilizando-se conjunto laboratorial comercial (QIAamp Viral RNA purification, QIAGEN Inc., Valencia, CA), de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante e estocado a -20°C até a sua utilização.

O produto da extração viral foi retrotranscrito em cDNA e amplificado em um único tubo rt-PCR, através do conjunto laboratorial comercial para a genotipagem de HIV-1 (TruGene™, Bayer HealthCare, Tarrytown, NY), resultando em um amplicon de 1.3 kb compreendendo o gene protease (codons 1-99) e o gene transcriptase reversa (codons 39-244).

As condições de otimização da reação, em cicladores térmicos, foram: um ciclo de 90°C por 2 min, 50°C por 60 min, 94°C por 2 min; 20 ciclos de 94°C por 30 seg, 57 °C por 30 seg, 94°C por 2 min; 17 ciclos de 94°C por 30 seg, 60°C por 30 seg, 68°C por 2 min e 30 seg e um ciclo de 68°C por 7 min, permanecendo a 4°C até a execução da etapa de sequenciamento cíclico.

As reações de sequenciamento foram geradas a partir do cDNA amplificado, conforme descrito: os amplicons, em volume de 5µL, foram submetidos ao sequenciamento cíclico por terminação de didesoxinucleotídeos, em volume final de 12µL, através do sequenciamento CLIP™ (OpenGene™, Bayer HealthCare) sob condições térmicas cíclicas.

Os ciclos térmicos foram: 94°C por 5 min; 30 ciclos de 94°C por 20 seg, 56°C por 20 seg, 70°C por 1min e 30 seg, seguindo-se um ciclo à temperatura de 70°C por 5 min e permanecendo a 4°C até a execução da próxima etapa.

Cada reação de sequenciamento foi submetida ao processamento automatizado de DNA, com corrida eletroforética em gel de acrilamida 6% (MicroGene Clipper™, Bayer HealthCare): as amostras foram aplicadas, em posições específicas pré-determinadas, em um sistema constituído por placas de vidro acopladas, preenchidas com gel de acrilamida a 6%.

Dois primers marcados por colorações distintas foram utilizados para a análise simultânea de ambas as direções do cDNA, para cada uma das quatro reações de sequenciamento. A incorporação de bases marcadas (fluorocromos) possibilitou a sua detecção por raio laser, na corrida eletroforética em gel de acrilamida.

Os ensaios foram submetidos à ordenação de bases através do programa GeneObjects (GeneObjects, Bayer HealthCare) e, a seguir, ao seu alinhamento, gerando os eletroferogramas através do programa GeneLibrarian (GeneLibrarian, Bayer HealthCare).

As sequências-consenso de nucleotídeos de cada amostra dos pacientes foram comparadas a um banco de dados de sequências do HIV-1 tipo selvagem (HxB2, GenBank K03455) para a identificação de mutações no RNA HIV-1, analisando-as em relação à resistência aos antiretrovirais. .

A classificação das mutações associadas ao decréscimo da sensibilidade às drogas foi estabelecida de acordo com o consenso de testes de resistência aos antiretrovirais.

Na figura 15 é apresentado um modelo de eletroferograma e as sequências de nucleotídeos em análise.



Figura 15 - Análise dos eletroferogramas e interpretação dos resultados

11.2.5 Análise filogenética

Sequências de nucleotídeos do HIV-1 de pacientes e sequências DNA HIV-1 de referência para os principais subtipos virais, compreendendo os genes da protease e transcriptase reversa do HIV-1, foram alinhadas utilizando-se o software BioEdit Sequence Alignment Editor (v.5.0).

As linhagens de referência para HIV-1 foram obtidas através do banco de dados disponibilizado em HIV Sequence Database, Los Alamos National Laboratory Web site (http://hiv-web.lanl.gov/content/hiv-db/SUBTYPE_REF/align.html).

Análises comparativas das sequências de pacientes e de referência foram feitas com base no alinhamento de nucleotídeos, usando-se o software CLUSTAL.

As árvores filogenéticas foram construídas, para cada gene analisado, de acordo com o método neighbor-joining, com intervalos de confiança bootstrap calculados em 1.000 heuristic search replicate, utilizando-se a versão 3.1 do programa Molecular Evolutionary Genetics Analysis, Pennsylvania State University, (MEGA 3.1).

A distância genética foi determinada pelo método estatístico de distância proporcional (Kimura two-parameter), (Kimura, 1980), aplicando-se a deleção de gaps no pareamento de bases e a igual frequência de transições e transversões para as três posições nos códons.

12 RESULTADOS

12.1 Genotipagem do HIV-1 e resistência viral

Todas as crianças incluídas no estudo apresentaram mutações de resistência aos antiretrovirais e/ou polimorfismos nos genes da transcriptase reversa e protease do HIV-1.

Mutações importantes, conferindo resistência viral às drogas incluídas no regime terapêutico de cada criança foram observadas em 18 das 25 crianças analisadas.

Dentre as sete crianças restantes, sem evidências de resistência aos antiretrovirais, quatro eram virgens de tratamento e não apresentaram mutações relevantes e, nas três crianças remanescentes, em tratamento antiretroviral, houve a detecção de polimorfismos nos genes da transcriptase reversa e protease, que não conferiram evidências de resistência.

Alterações do regime terapêutico, de acordo com os resultados obtidos no teste de genotipagem, foram feitas em 16 das 18 crianças que apresentaram resistência aos antiretrovirais, durante o período de observação do estudo.

Modificações do regime terapêutico foram feitas, também, para uma das sete crianças que não apresentaram evidências de resistência aos antiretrovirais.

12.2 Resistência viral aos NRTIs e NNRTIs

Dezoito entre as 25 crianças apresentaram, no mínimo, uma mutação no gene da transcriptase reversa, conferindo resistência aos NRTIs. Duas crianças gêmeas, com cinco anos de idade (números 12 e 13), quatro crianças virgens de tratamento (números 18, 19, 21 e 30) e uma paciente com 15 anos de idade (número 26) não demonstraram evidências de resistência viral.

Os irmãos gêmeos estavam infectados com linhagens HIV-1 subtipadas como F1. Ambos estavam sob terapia HAART no momento da avaliação do teste de genotipagem e apresentaram as mutações F77L ou V118I no gene da transcriptase reversa que não conferiram evidências de resistência viral.

A paciente com 15 anos de idade, também em terapia, e as quatro crianças virgens de tratamento não apresentaram mutações relevantes no gene da transcriptase reversa do HIV-1.

No grupo das 18 crianças apresentando linhagens HIV-1 resistentes aos NRTIs, mutações no gene da transcriptase reversa conferiram resistência a, no mínimo, duas e até a onze drogas. Observou-se que, de forma mais importante, nove destas crianças apresentaram resistência viral aos inibidores da transcriptase reversa variando entre oito a onze drogas.

A resistência viral aos NNRTIs foi relatada em sete entre as 18 crianças. Seis apresentaram linhagens virais resistentes a todas as três drogas, nevirapina, delavirdina e efavirenz.

Os regimes NRTIs e NNRTIs administrados às crianças no momento da avaliação genotípica, as mutações no gene da transcriptase reversa do HIV-1 e a resistência viral observados neste grupo de pacientes pediátricos estão descritos na tabela 4.

As mutações em análogos de timidina (TAMs) foram detectadas em 16 das 18 crianças. Os “clusters” TAM-1 e TAM-2 foram analisados neste subgrupo e os resultados indicaram que mutações em sequências RT do HIV-1 foram compatíveis com o padrão TAM-1 em oito crianças, enquanto que o padrão TAM-2 foi observado em cinco crianças. Em uma criança (número 6), a mutação T215Y foi detectada em associação a outras mutações diferentes das relacionadas aos “clusters” TAM.

Mutações de múltipla resistência aos NRTIs foram detectadas em quatro crianças e mutações em regimes com não análogos à timidina foram, adicionalmente, observadas em duas crianças.

As mutações acessórias E44D, V118IV e H208Y foram relatadas, tanto sozinhas como em associação, em 12 crianças. A mutação adicional T69D, selecionada por tratamento, foi detectada em quatro crianças e a mutação M184V, associada à suscetibilidade aumentada ao AZT, TDF e d4T foi detectada em 13 crianças.

Mutações de resistência aos NRTIs ocorreram mais frequentemente nas posições T215F/Y (14 crianças), M41L (13 crianças) e M184V (13 crianças), e a distribuição das mutações de resistência aos NNRTIs foi observada conforme descrito: A98G (duas crianças), K101E (três crianças), K103N (duas crianças), V106A (uma criança) e G190A (três crianças).

Tabela 4 - Regime terapêutico com NRTIs e NNRTIs em vigência na avaliação do teste de genotipagem, mutações em RT e resistência viral em pacientes pediátricos infectados por HIV-1.

Id.	Regime NRTIs/NNRTIs	Mutações em RT	Resistência (possível resistência) aos NRTIs e NNRTIs
1	AZT, ddl	M41L, D67N, K70R, V118I, T215F, K219Q	AZT, ddl, ddC, d4T, ABC, TDF
2	AZT, 3TC	M41L, D67N, V118I/V, T215Y	AZT, (ddl), (ddC), d4T, (ABC), (TDF)
3	AZT, 3TC	M184V	(ddC), 3TC/FTC
5	AZT, 3TC	M41L, E44D, M184V, T215Y	(AZT), (ddC), 3TC/FTC, (d4T), ABC, (TDF)
6	d4T, 3TC	A62V, K65R, M184V, T215Y	(AZT), (ddl), ddC, 3TC/FTC, (d4T), ABC, TDF
7	d4T, 3TC	M41L, E44D, D67N, M184V, L210W, T215Y	(AZT), ddl, ddC, 3TC/FTC, (d4T), ABC, TDF
8	AZT, 3TC	M41L, E44D, D67N, T69D, K70R, A98G, M184V, T215F, K219Q	AZT, ddl, ddC, 3TC/FTC, d4T, ABC, TDF, (NVP), (DLV), (EFV)
9	AZT, 3TC	M41L, E44D, D67N, T69D, V118I, M184V, L210W, T215Y	(AZT), ddl, ddC, 3TC/FTC, (d4T), ABC, TDF
10	AZT, 3TC	M41L, D67N, K103N, M184V, H208Y	(AZT), (ddC), 3TC/FTC, (d4T), (ABC), (TDF), NVP, DLV, EFV
11	AZT, 3TC	M41L, E44D, D67N, T69D/N, M184V, T215Y	(AZT), ddl, ddC, 3TC/FTC, (d4T), ABC, (TDF)
12	AZT, 3TC	F77L	Sem evidências de resistência
13	AZT, 3TC	V118I	Sem evidências de resistência
14	3TC, TDF, EFV	M41L, K70R, V75M, F77L, K101E, V118I, M184V, G190A, T215F, K219Q	(AZT), ddl, ddC, 3TC/FTC, d4T, (ABC), TDF, NVP, (DLV), (EFV)
15	AZT, 3TC	M184V	3TC/FTC
17	d4T, 3TC	M41L, M184V, T215Y	(AZT), (ddl), (ddC), 3TC/FTC, (d4T), ABC, (TDF)
18	AZT, ddl	Não foram detectadas mutações relevantes	Sem evidências de resistência
19	AZT, ddl	Não foram detectadas mutações relevantes	Sem evidências de resistência
20	AZT, 3TC, EFV	D67N, K101E, G190A, K219Q	(AZT), (d4T), NVP, (DLV), (EFV)
21	Sem terapia	Não foram detectadas mutações relevantes	Sem evidências de resistência
23	AZT, 3TC	A62V, K70R, A98G, V118I, M184V, H208Y, T215C/F, K219Q	(AZT), 3TC/FTC, (d4T), (DLV)
24	AZT, 3TC, NVP	M41L, K103N, M184V, T215Y	(AZT), (ddl), 3TC/FTC, (d4T), (ABC), (TDF), NVP, DLV, EFV
25	AZT, ddl	M41L, T69N, K70R, K101E, V106A, G190A, T215F, K219Q	AZT, ddl, d4T, TDF, NVP, DLV, (EFV)
26	AZT, 3TC	Não foram detectadas mutações relevantes	Sem evidências de resistência
27	AZT, ddl	M41L, D67N, V118I, L210W, T215Y	AZT, ddl, d4T, (ABC), TDF
30	AZT, 3TC	Não foram detectadas mutações relevantes	Sem evidências de resistência

Crianças 18, 19 e 30: genotipagem foi realizada imediatamente após a introdução da terapia antiretroviral. Id = nº de identificação da criança.

A distribuição das mutações de resistência aos NRTIs, classificadas de acordo com a lista de mutações do banco de dados de resistência às drogas antiretrovirais da universidade de Stanford (Stanford HIV Drug Resistance Database), é apresentada na tabela 5.

Tabela 5 – Distribuição da frequência das mutações de resistência viral aos NRTIs, de acordo com a lista de mutações do banco de dados da universidade de Stanford (Stanford HIV Drug Resistance Database).

	Mutações de resistência aos NRTIs							
	Análogos à timidina					Não-análogos à timidina		
Códon	M41L	D67N	K70R	L210W	T215F/Y	K219Q	K65R	V75M
Nº de crianças	13	9	5	3	14	6	1	1
	Acessórias			Resistência a múltiplos NRTI		Hiper-suscetibilidade	Adicional	
	Códon	V118I/V	E44D	H208Y	A62V	F77L	M184V	T69D
Nº de crianças	7	5	2	2	2	13	4	

12.3 Resistência viral aos PIs

Treze pacientes, dentre os 25 incluídos neste estudo, não relataram evidências de resistência viral aos PIs. Quatro crianças eram virgens de tratamento e duas não apresentavam prescrição de inibidores da protease em seus regimes terapêuticos, no momento da avaliação da resistência genotípica.

Nas sete crianças restantes, expostas aos PIs, mutações polimórficas associadas ou não associadas a L63P foram observadas nos códons K20R, M36I, D60E, A71V e V77I. A mutação polimórfica acessória L63P foi observada como mutação única em cinco dentre os 13 pacientes.

Mutações no gene da protease, conferindo resistência viral aos PIs, com variações entre duas a doze drogas, foram relatadas em doze crianças.

Os resultados concernentes ao regime com inibidores de protease, administrado às crianças por ocasião da avaliação da resistência genotípica, as mutações detectadas no gene da protease do HIV-1 e a resistência viral observada nos pacientes pediátricos infectados por HIV-1 são apresentados na tabela 6.

A frequência das mutações de resistência aos PIs, mutações acessórias, adicionais e de hipersuscetibilidade, observadas neste grupo de pacientes pediátricos, é apresentada na tabela 7.

Mutações mais importantes de resistência aos PIs foram observadas nos códonos M46IL (seis crianças), L90M (cinco crianças) e D30N (quatro crianças). As mutações de hipersuscetibilidade I50V e I54L foram detectadas, cada uma, em uma criança.

Mutações acessórias foram frequentemente relatadas: as mutações acessórias polimórficas L63P e M36IVL foram, respectivamente, detectadas em 19 e 12 crianças e as mutações acessórias não-polimórficas L10F e T74S foram, respectivamente, detectadas em duas crianças e uma criança.

Resíduos pouco comuns foram registrados para a mutação L89MI e não foram descritos critérios para a sua classificação de acordo com a lista de mutações adotada (Stanford HIV Drug Resistance Database). Portanto, o papel e importância destas mutações em relação à resistência antiretroviral serão discutidos posteriormente.

Tabela 6 – Regime terapêutico com inibidores de protease em vigência na avaliação do teste de genotipagem, mutações em PR e resistência viral em pacientes pediátricos infectados por HIV-1.

Id.	Regime terapêutico PIs	Mutações em PR	Resistência (possível resistência) aos PIs
1	Sem PIs	L63P	Sem evidências de resistência
2	Kaletra	L10F, D30N, L33F, M36L, N88D	NFV, (ATV)
3	NFV	L10I, M36I, L63P, L90M	SQV, (IDV), (RTV), NFV, (ATV)
5	NFV	L10F, D30N, M36V, L63P	NFV, (ATV)
6	NFV	L10I, K20R, D30N, M36V, L63P, A71V, N88D	NFV, ATV
7	APV	D30N, L33F, I54L, L63P, A71T, I84V, N88D, L90M	SQV, IDV, RTV, NFV, APV/FPV, (LPV/r), ATV
8	ABC	L63P	Sem evidências de resistência, exceto ATV (evidências insuficientes)
9	NFV	G16E, K20I, L33V, M36I, M46I, G73S, L90M	SQV, (SQV/r), IDV, (IDV/r), RTV, NFV, APV/FPV, (APV/r ou FPV/r), ATV
10	ABC	M36I, L63P	Sem evidências de resistência
11	RTV	L10V, M36I, M46I, I54V, L63P, V82S	SQV, (SQV/r), IDV, IDV/r, RTV, NFV, APV/FPV, APV/r ou FPV/r, (LPV/r), ATV
12	NFV	M36I	Sem evidências de resistência
13	Sem PIs	M36I, V77I, L89M	Sem evidências de resistência
14	RTV	L10I, K20I, M36I, M46I, I50V, I54V, L63P, A71V, V82A, L89I	SQV, SQV/r, IDV, IDV/r, RTV, NFV, APV/FPV, APV/r ou FPV/r, LPV/r, ATV
15	NFV	L10I, I13V, D60E, L63P, A71V, G73S, V77I, L90M	SQV, (SQV/r), IDV, (IDV/r), RTV, NFV, (APV/FPV), (APV/r ou FPV/r), (LPV/r), (ATV), (ATV/r)
17	NFV	K20I, M46I, L63P, T74S, V77I, L90M	SQV, (SQV/r), IDV, (IDV/r), RTV, NFV, APV/FPV, (APV/r) ou (FPV/r), (ATV)
18	Kaletra	L63P, A71V, V77I	Sem evidências de resistência
19	NVP	L63P	Sem evidências de resistência
20	EFV	K20R, D60E, L63P	Sem evidências de resistência
21	Sem PIs	M36I, L89M	Sem evidências de resistência
23	RTV	I13V, L24I, L33F, M46L, I54V, L63P, V77I, V82A, L89I	SQV, (SQV/r), IDV, IDV/r, RTV, NFV, APV/FPV, APV/r ou FPV/r, LPV/r, ATV, ATV/r, (TPV/r)
24	NVP	L63P	Sem evidências de resistência
25	NVP	L63P, A71T	Sem evidências de resistência
26	Kaletra	L63P	Sem evidências de resistência
27	Sem PIs	M46L, A71V	IDV, (IDV/r), (RTV), APV/FPV, (APV/r ou FPV/r)
30	NVP	M36I, L63P	Sem evidências de resistência

Crianças 18, 19 e 30: genotipagem foi realizada imediatamente após a introdução da terapia antiretroviral; Kaletra = LPV+RTV. Id = nº de identificação da criança.

Tabela 7 – Distribuição da frequência de polimorfismos e mutações de resistência viral aos PIs, de acordo com a lista de mutações do banco de dados da universidade de Stanford (Stanford HIV Drug Resistance Database).

		Mutações de resistência aos PIs								
Códon		L24I	D30N	M46IL	I54V	G73S	V82SA	I84V	N88D	L90M
Nº de crianças		1	4	6	3	2	3	1	3	5
		Acessórias polimórficas								
Códon		L10IV	I13V	G16E	K20RI	M36IVL	D60E	L63P	A71VT	V77I
Nº de crianças		5	2	1	5	12	2	19	7	5
		Acessórias não-polimórficas		Hiper-suscetibilidade		Adicionais				
Códon		L10F	T74S	I50V	I54L	L33V				
Nº de crianças		2	1	1	1	1				

12.4 Subtipagem do HIV-1

Subtipos do HIV-1 foram avaliados através da análise filogenética para todas as 25 amostras. As árvores filogenéticas foram construídas individualmente para cada amostra, de acordo com o programa MEGA, versão 3.1, utilizando-se o método neighbor-joining, com base em nucleotídeos do gene da protease do HIV-1 e nucleotídeos do gene da transcriptase reversa do HIV-1.

A maioria das amostras (18 dentre 25) agrupou-se no subtipo B. Três amostras foram subtipadas como F1 e linhagens virais recombinantes, sendo uma BF, duas BD e uma DF foram, também, observadas.

A fim de comparar os resultados obtidos na análise filogenética, as sequências dos pacientes foram, adicionalmente, submetidas à análise de mutações e subtipos virais, disponível pela universidade de Stanford, no web site HIVdb: Genotypic Resistance Interpretation Algorithm, HIV Drug Resistance Database, http://hivdb6.stanford.edu/asi/deployed/hiv_central.pl?program=hivdb&action=showMutationForm.

A concordância para a subtipagem do HIV-1 entre ambas as metodologias foi relatada para todas as amostras, com exceção das duas linhagens recombinantes BD, referentes às amostras números 15 e 17, subtipadas como somente B de acordo com Stanford HIV Drug Resistance Database. Os resultados são apresentados na tabela 8.

Os resultados observados nas árvores filogenéticas individuais, para as amostras discordantes, são apresentados nas figuras 16a e 16b para a amostra HUPE 15 e nas figuras 17a e 17b para a amostra HUPE17.

Tabela 8 - Dados comparativos para a genotipagem do HIV-1: Stanford HIV Drug Resistance Database e análise filogenética.

Nº de identificação da criança	Stanford HIV Drug Resistance Database		Análise filogenética (MEGA neighbor-joining method)	
	PR ^(a)	RT ^(a)	PR ^(b)	RT ^(b)
1	B (94.8%)	B (93.9%)	B (96)	B (99)
2	B (93.8%)	B (91.7%)	B (86)	B (98)
3	B (93.1%)	B (95.0%)	B (66)	B (99)
5	B (94.1%)	B (92.5%)	B (91)	B (95)
6	B (92.6%)	B (95.2%)	B (94)	B (97)
7	B (89.2%)	B (93.8%)	B (42)	B (87)
8	B (94.0%)	B (93.0%)	B (92)	B (91)
9	B (92.4%)	B (93.0%)	B (86)	B (99)
10	B (91.0%)	F (90.7%)	B (84)	F1 (70)
11	B (94.4%)	B (94.8%)	B (82)	B (99)
12	F (94.8%)	F (92.5%)	F1 (99)	F1 (98)
13	F (93.8%)	F (95.4%)	F1 (99)	F1 (100)
14	B (90.3%)	B (91.4%)	B/D (59)	B (83)
15	B (92.0%)	B (94.3%)	B/D (65)	B(75)/D(85)
17	B (94.8%)	B (94.8%)	B(76)/D(83)	B(87)/D(88)
18	B (94.1%)	B (94.9%)	B (90)	B (73)
19	B (94.1%)	B (93.8%)	B (73)	B (92)
20	B (96.9%)	B (94.9%)	B (93)	B (99)
21	F (95.8%)	F (96.1%)	F1 (95)	F1 (99)
23	B (91.7%)	B (94.9%)	B (87)	B (99)
24	B (95.1%)	B (94.8%)	B (93)	B (92)
25	B (97.2%)	B (94.6%)	B (97)	B (93)
26	B (97.2%)	B (96.0%)	B (94)	B (98)
27	B (95.1%)	B (93.3%)	B (94)	B (87)
30	D (95.1%)	F (96.3%)	B/D (76)	F1 (100)

^(a) Similaridade ao isolado de referência mais próximo

^(b) Valores de bootstrap, indicando a significância dos agrupamentos

Figura 16a - Árvore filogenética construída com base na sequência de nucleotídeos do gene da protease do HIV-1, indicando os valores de bootstrap, para a identificação do subtipo viral da amostra HUPE 15.

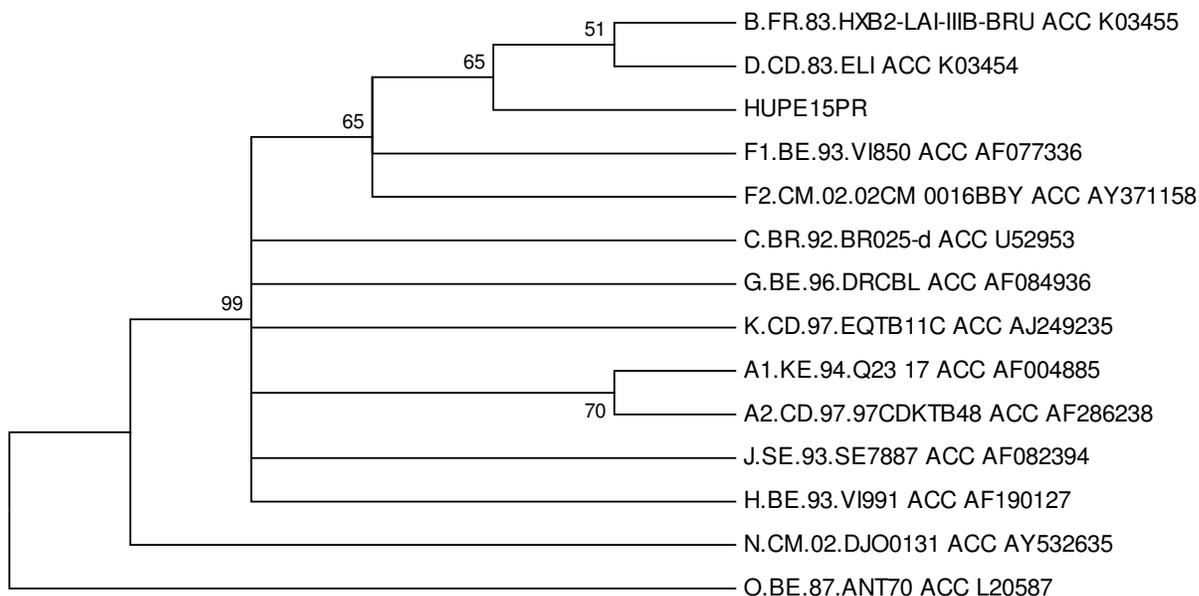


Figura 16b - Árvore filogenética construída com base na sequência de nucleotídeos do gene da transcriptase reversa do HIV-1, indicando os valores de bootstrap, para a identificação do subtipo viral da amostra HUPE 15.

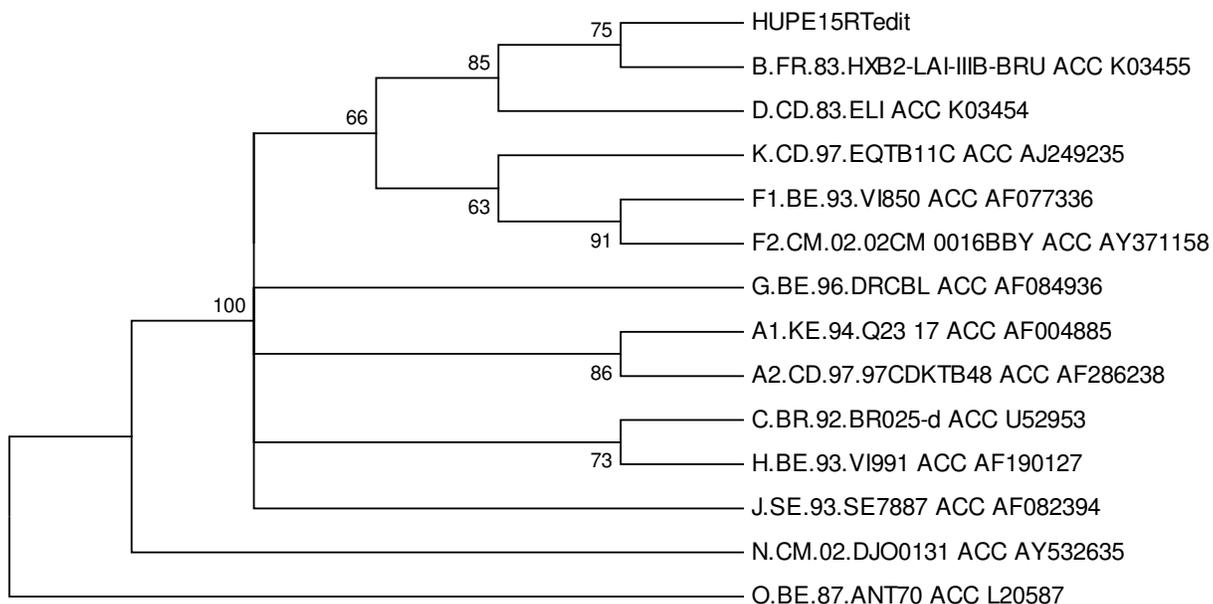


Figura 17a - Árvore filogenética construída com base na sequência de nucleotídeos do gene da protease do HIV-1, indicando os valores de bootstrap, para a identificação do subtipo viral da amostra HUPE 17.

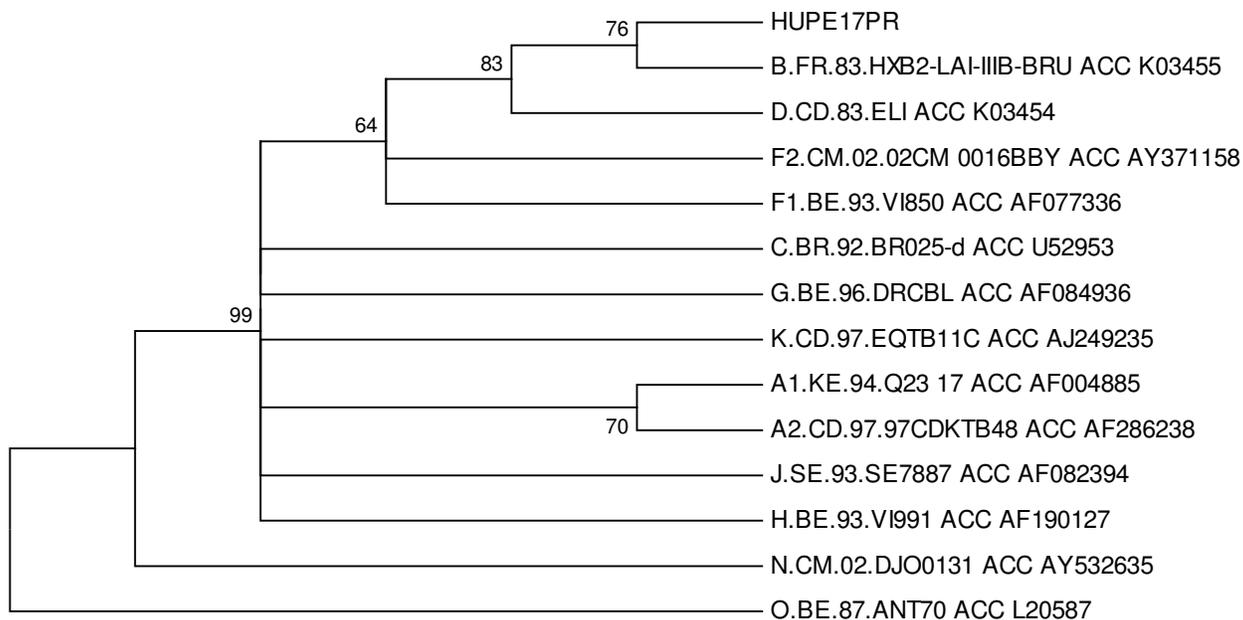
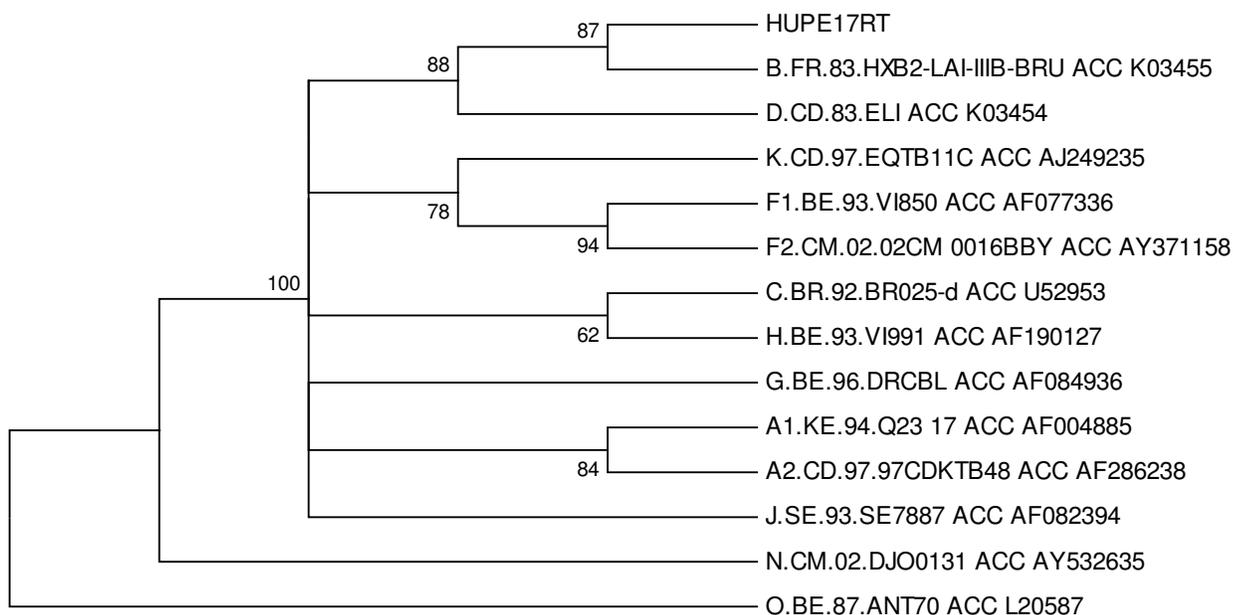


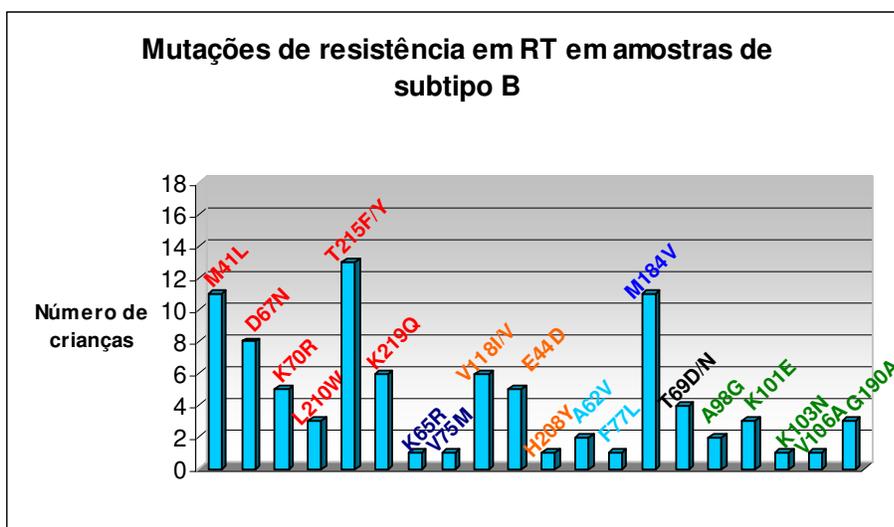
Figura 17b - Árvore filogenética construída com base na sequência de nucleotídeos do gene da transcriptase reversa do HIV-1, indicando os valores de bootstrap, para a identificação do subtipo viral da amostra HUPE 17.



12.5 Perfil de mutações em amostras de subtipos B e não-B

Nas 18 amostras classificadas como subtipo B, a análise do gene RT mostrou que as mutações aos análogos de timidina (TAMs) mais frequentes foram observadas nos códons M41L (onze crianças) e T215F/Y (treze crianças). A mutação de hipersuscetibilidade M184V foi relatada em onze crianças. A distribuição da frequência de todas as mutações de resistência aos inibidores da transcriptase reversa, análogos e não-análogos de nucleosídeos, observadas neste grupo de pacientes está ilustrada no gráfico 1.

Gráfico 1 - Distribuição da frequência de mutações de resistência aos NRTIs e NNRTIs em pacientes pediátricos infectados por HIV-1 subtipo B.



Resistência aos NRTIs

- análogos à timidina
- não-análogos à timidina
- acessórias
- múltipla resistência
- hipersuscetibilidade
- adicional

Resistência aos NNRTIs

- A98G: (NVP)
- K101E: (NVP) (DLV) (EFV)
- K103N: NVP DLV EFV
- V106A: NVP (DLV) (EFV)
- G190A: NVP (EFV)

Sete das 25 crianças incluídas no estudo apresentaram cepas virais que foram classificadas em formas recombinantes (amostras de quatro crianças) ou no subtipo F1 (amostras de três crianças).

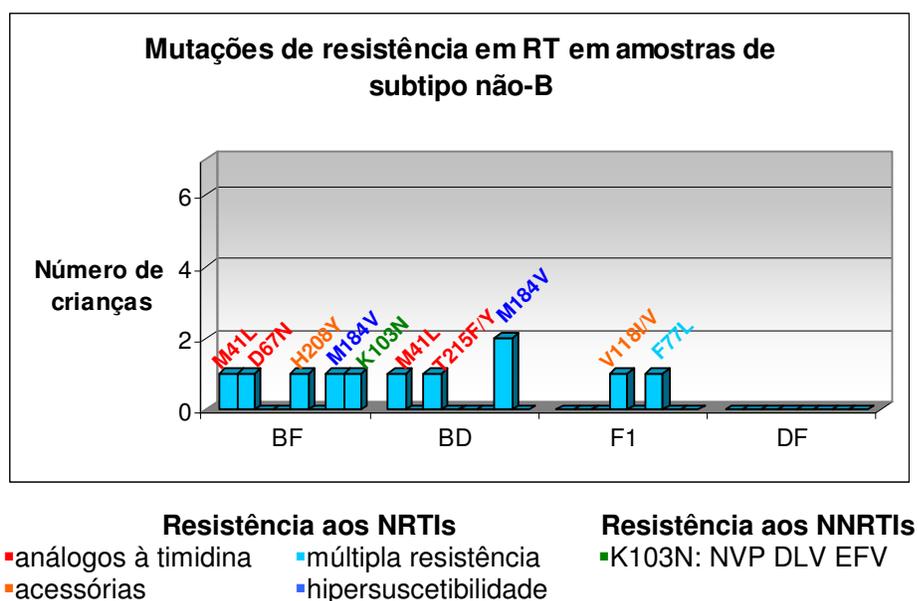
Para o subtipo F1, duas em três amostras apresentaram mutações em RT. A mutação F77L, observada em uma delas, está associada ao padrão Q151M, de múltipla resistência para o subtipo B, e a mutação V118I/V, observada na outra amostra, está associada às TAMs. Nestas duas amostras, entretanto, estas mutações foram detectadas como mutações únicas, sem conferir resistência aos antiretrovirais.

Para os recombinantes B/D (duas amostras), as mutações detectadas seguiram o padrão observado para o subtipo B, com as mutações M41L e T215F/Y observadas em uma criança e a mutação M184V em ambas.

O recombinante B/F, detectado em uma criança, apresentou as mutações M41L, D67N, K103N, M184V e H208Y e o recombinante DF não apresentou mutações relevantes de resistência viral aos inibidores da transcriptase reversa.

Os resultados da distribuição da frequência destas mutações, relacionadas aos recombinantes e subtipos virais, encontram-se no gráfico 2.

Gráfico 2 - Distribuição da frequência de mutações em RT, em pacientes pediátricos infectados por HIV-1 subtipo F1 e recombinantes virais.

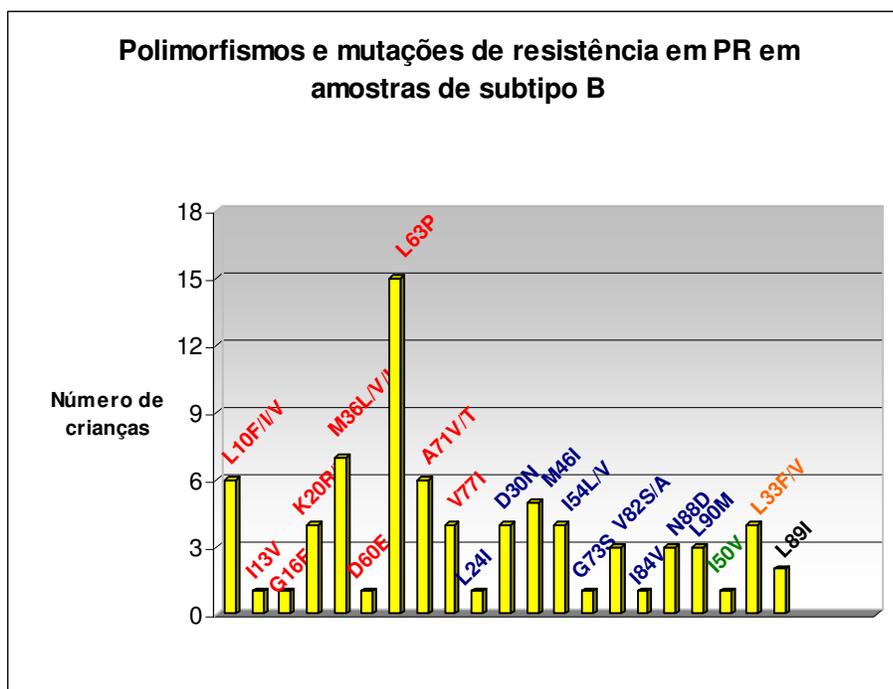


Para o gene PR, a distribuição das mutações nas 18 amostras, identificadas como subtipo viral B, mostrou maior frequência de polimorfismos, com alterações nos códons L63P em 15 crianças, M36L/V/I em sete crianças, e L10F/I/V e A71V/T em seis crianças.

Dentre as mutações principais de resistência viral aos PIs, as mais frequentes foram observadas nos códons M46I (cinco crianças), D30N e I54LV (quatro crianças). A mutação de hipersuscetibilidade aos PIs, I50V, foi registrada em uma criança e a mutação adicional, L33FV, em duas crianças.

A mutação no códon 89, observada em duas crianças, apresentou um resíduo incomum, com a substituição de leucina por isoleucina, e não foi classificada de acordo com a lista de mutações adotada pela universidade de Stanford. Os dados são apresentados no gráfico 3.

Gráfico 3 - Distribuição da frequência de polimorfismos e mutações de resistência aos PIs em pacientes pediátricos infectados por HIV-1 subtipo B.



Resistência aos PIs

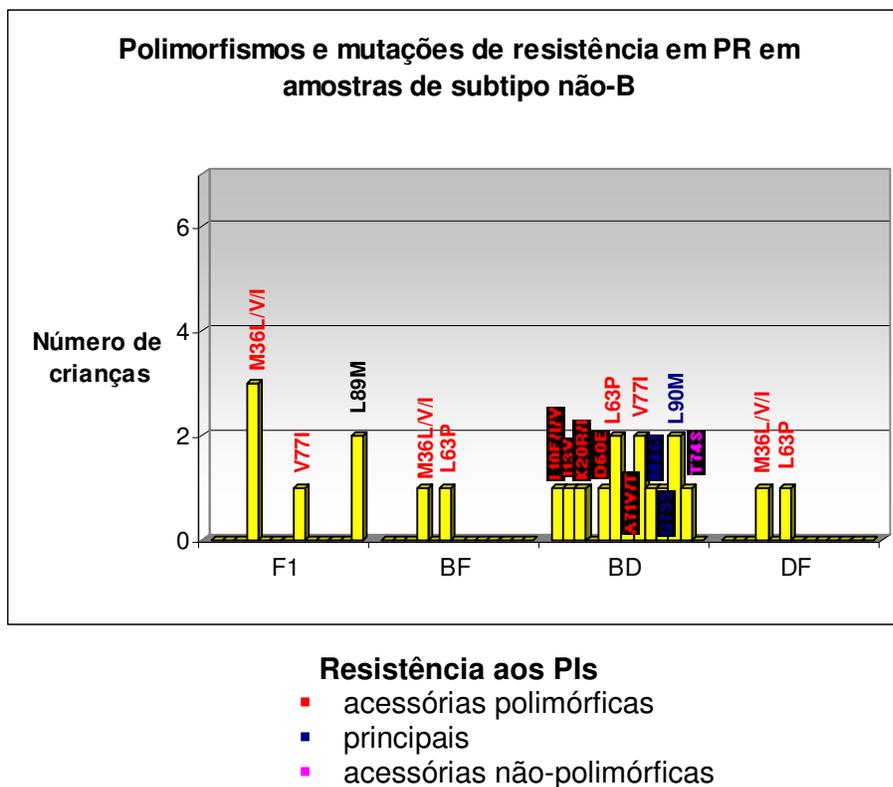
- acessórias polimórficas
- principais
- hipersuscetibilidade
- adicionais

A distribuição de polimorfismos e mutações de resistência aos PIs, nas sete amostras classificadas em não-B, foi observada conforme descrito a seguir: nas três amostras com subtipo F1, foi registrada a mutação acessória polimórfica M36ILV. Uma amostra apresentou a mutação polimórfica V77I e, em duas amostras, foi observada a mutação L89M, não classificada de acordo com o padrão adotado.

As amostras recombinantes BF e DF apresentaram as mutações acessórias polimórficas M36ILV e L63P e, nas duas amostras classificadas como recombinante BD, foram registradas mutações acessórias polimórficas e mutações principais de resistência viral aos PIs. Adicionalmente, a mutação acessória não-polimórfica, T74S, foi relatada em uma criança.

Os resultados da distribuição da frequência destas mutações e polimorfismos, relacionadas aos recombinantes virais e subtipo viral F1, encontram-se no gráfico 4.

Gráfico 4 - Distribuição da frequência de mutações e polimorfismos em PR, em pacientes pediátricos infectados por HIV-1 subtipo F1 e recombinantes virais.



12.6 Carga viral, avaliações de CD4 e CD8 e terapia

As determinações da carga viral do HIV-1 e avaliações de células T CD4+ e CD8+ foram feitas, para cada criança, em intervalos variados, durante diferentes períodos de acompanhamento, com variações entre nove meses a 33 meses (média de 17,4 meses), com exceção de uma criança, sem retorno às consultas clínicas, acompanhada pelo período de três meses.

A avaliação dos dados laboratoriais para carga viral e subpopulações de linfócitos T, referente à inclusão da criança no estudo, foi definida como a mais próxima à data da coleta de sangue para a realização do teste de genotipagem.

Com o intuito de uniformizar a comparação de dados, a avaliação de declínios da carga viral foi calculada em escala logarítmica, considerando a diferença entre o valor inicial da carga viral, referente à inclusão da criança no estudo, e o valor consecutivo registrado após a modificação do regime antiretroviral.

Diferenças significativas adotadas foram as equivalentes a $0,7 \log_{10}$ para pacientes pediátricos até dois anos de idade e $0,5 \log_{10}$ para aqueles acima de dois anos de idade.

A classificação clínica de cada criança incluída no estudo foi considerada aquela relacionada à avaliação feita na ocasião de sua inclusão, independente da evolução do curso clínico.

Esta classificação, valores da carga viral, taxas de CD4 e CD8, observados para cada criança, e as modificações feitas em relação aos regimes terapêuticos estão indicados na tabela 9.

A avaliação dos mesmos dados laboratoriais e clínicos, para o grupo de crianças que não apresentaram alterações nos regimes terapêuticos, está indicada na tabela 10.

Tabela 9 - Dados clínicos e laboratoriais referentes às crianças em terapia HAART, apresentando modificações no regime terapêutico.

Id.	Idade (anos)	Categ. clínica	Regime terapêutico		Carga viral			CD4	CD8	CD4/CD8
			Data	Regime	Data	Cópias/mL	Log	cels/μL (%)	cels/μL (%)	
1	6	C3	Fev 2005	AZT, ddl	Abr 2005	5.300	3,724	435 (12,5)	2.226 (63,9)	0,19
			Ago 2005	AZT, 3TC, NVP	Set 2005	<80	<1,903	714 (22,0)	1.808 (55,8)	0,39
			Fev 2006	AZT, 3TC, NVP	Fev 2006	3.100	3,491	532 (24,4)	1.049 (48,1)	0,50
			Jul 2006	AZT, 3TC, NVP	Jun 2006	4.500	3,653	577 (17,1)	2.016 (59,6)	0,28
			Out 2006	AZT, 3TC, NVP	Set 2006	3.500	3,544	509	1.536	0,33
2	12	C3	Abr 2005	AZT, 3TC, Kaletra	Mai 2005	83.000	4,919	547 (26,7)	1.155 (56,3)	0,47
			Jul 2005	AZT, 3TC, Kaletra	Jul 2005	270.000	5,431	307 (23,0)	422 (32,0)	0,72
			Set 2005	3TC, Kaletra, EFV	Ago2005	140.000	5,146	424 (25,5)	753 (45,4)	0,56
			Dez 2005	3TC, Kaletra, EFV	Dez2005	1.300	3,114	480 (25,5)	1.022 (54,4)	0,46
			2006 Mar	3TC, Kaletra, EFV	2006 Mar	1.900	3,279	568 (26,54)	865 (40,42)	0,65
			2006 Jul	3TC, Kaletra, EFV	2006 Jul	1.300	3,114	580 (32,22)	668 (37,11)	0,86
			Mai 2007	3TC, Kaletra, EFV	Abr2007	19.757	4,296	543	1.107	0,49
			Out 2007	3TC, Kaletra, EFV	Jun 2007	80.891	4,908	652	1.644	0,40
			Fev 2008	AZT, Kaletra, ABC	Jan 2008	-	-	355	704	0,50
3	10	C3	Mai 2005	AZT, 3TC, NFV	Fev 2005	530.000	5,724	78 (4,0)	1.299 (66,9)	0,06
			Jul 2005	ABC, 3TC, Kaletra	Ago2005	3.400	3,531	165 (6,6)	1.741 (69,6)	0,09
			2006 Jan	ABC, AZT, Kaletra	Fev 2006	73.000	4,863	457 (13,7)	2.359 (70,6)	0,19
			2006 Mai	ABC, AZT, Kaletra	Jun 2006	190.000	5,279	376 (16,3)	1.516 (65,9)	0,24
5	11	C3	Ago2005	AZT, 3TC, NFV	Ago2005	24.000	4,380	485 (18,0)	1.826 (69,0)	0,26
			Out 2005	AZT, 3TC, NFV	Out 2005	14.000	4,146	596 (23,0)	1.602 (63,0)	0,37
			Dez 2005	AZT, 3TC, NFV	Dez2005	19.000	4,278	439 (17,0)	1.626 (66,0)	0,26
			Mar 2006	AZT, ddl, Kaletra	Abr 2006	110	2,041	567 (20,2)	1.758 (62,8)	0,32
			Ago 2006	AZT, ddl, Kaletra	Set 2006	580	2,763	711	2.036	0,34
			Set 2007	AZT, 3TC, Kaletra	Ago2007	183	2,262	864 (30,0)	877 (47,0)	0,99
			Nov 2007	AZT, 3TC, Kaletra	Out 2007	81	1,908	651 (27,0)	1.199 (51,0)	0,54
			Mar 2008	AZT, 3TC, Kaletra	Mai 2008	<50	<1,698	708 (24,0)	1.565 (54,0)	0,45
6	4	C3	Out 2005	3TC, d4T, NFV	Set 2005	22.000	4,342	787 (38,0)	899 (43,0)	0,87
			Mar 2006	3TC, d4T, NFV	Jan 2006	20.000	4,301	895 (32,0)	1.318 (47,0)	0,67
			Ago 2006	3TC, d4T, Kaletra	Mar 2006	21.000	4,322	1.081(38,2)	1.262 (44,6)	0,85
			Out 2006	3TC, d4T, Kaletra	Out 2006	<80	<1,903	1.132	1.554	0,72
8	10	B1	Dez 2005	AZT, 3TC, ABC	Ago2005	18.000	4,255	667 (37,0)	783 (44,0)	0,85
			Jan 2006	AZT, 3TC, ABC	Nov2005	16.000	4,204	417 (25,7)	518 (31,9)	0,80
			Mar 2006	AZT, 3TC, ABC	Fev 2006	11.000	4,041	628 (29,9)	935 (44,5)	0,67
			Ago 2006	AZT, 3TC, Kaletra	Jun 2006	<80	<1,903	1.074	1.372	0,78
			Out 2006	AZT, 3TC, Kaletra	Set 2006	<80	<1,903	979	1.144	0,85
9	10	C3	Dez 2005	AZT, 3TC, NFV	Set 2005	2.000	3,301	474 (22,0)	1.205 (57,0)	0,39
			Fev 2006	AZT, 3TC, NFV	Jan 2006	1.400	3,146	452 (21,0)	1.147 (54,0)	0,39
			Jun 2006	AZT, 3TC, Kaletra	Jun 2006	<80	<1,903	531	1.423	0,37
			Ago 2006	AZT, 3TC, Kaletra	Ago2006	140	2,146	520 (19,3)	1.514 (56,1)	0,34
			Out 2006	AZT, 3TC, Kaletra	Out 2006	100	2,000	624	1.381	0,45

Tabela 9 - Dados clínicos e laboratoriais referentes às crianças em terapia HAART, apresentando modificações no regime terapêutico (continuação).

Id.	Idade (anos)	Categ. clínica	Regime terapêutico		Carga viral			CD4	CD8	CD4/CD8
			Data	Regime	Data	Cópias/mL	Log	(cels/μL) (%)	(cels/μL) (%)	
10	7	B3	Dez 2005	AZT, 3TC, ABC	Nov 2005	5.400	3,732	902 (38,5)	1.160 (49,6)	0,77
			Abr 2006	AZT, 3TC, ABC	Fev 2006	5.700	3,756	861 (35,9)	1.058 (44,1)	0,81
			Jun 2006	AZT, 3TC, ABC	Mar 2006	12.000	4,079	941 (35,5)	1.274 (48,1)	0,73
			Out 2006	AZT, 3TC, ABC	Ago 2006	15.000	4,176	851 (38,7)	965 (43,9)	0,88
			Jan 2007	AZT, 3TC, Kaletra	Mai 2007	<50	<1,698	1.107	1.209	0,92
			Ago 2007	AZT, 3TC, Kaletra	Ago 2007	<50	<1,698	1.232	2.335	0,53
			Dez 2007	AZT, 3TC, Kaletra	Dez 2007	<50	<1,698	1.502 (42,0)	1.080 (34,0)	1,39
			Abr 2008	AZT, 3TC, Kaletra	Abr 2008	81	1,908	1.560 (44,0)	1.108 (33,0)	1,41
13	5	A2	Jun 2006	AZT, 3TC	Fev 2006	4.300	3,633	1.419 (47,8)	952 (32,1)	1,49
			Out 2006	AZT, 3TC	Set 2006	1.200	3,079	703	640	1,10
			Jul 2007	AZT, 3TC, EFV	Ago 2007	<50	<1,698	1.097 (51,0)	535 (28,0)	2,05
14	8	C3	Ago 2005	EFV,TDF,3TC,RTV	Out 2005	620.000	5,792	347 (16,0)	1.265 (61,0)	0,29
			Dez 2005	AZT,TDF,3TC,RTV	Jul 2006	72.000	4,857	40 (4,4)	541 (60,1)	0,07
			Out 2006	TDF, 3TC, Kaletra	Set 2006	190.000	5,279	43	949	0,05
15	10	C2	Mar 2006	AZT, 3TC, NFV	Mar 2006	13.000	4,114	578 (30,3)	935 (48,9)	0,61
			Jul 2006	AZT, 3TC, NFV	Jun 2006	9.000	3,954	415 (24,9)	1.011 (60,5)	0,41
			Nov 2006	AZT, 3TC, NFV	Dez 2006	9.000	3,954	509	1.169	0,44
			Mar 2007	AZT, 3TC, Kaletra	Abr 2007	<50	<1,698	451	977	0,46
			Jul 2007	AZT, 3TC, Kaletra	Set 2007	<50	<1,698	656 (26,0)	818 (42,0)	0,80
17	4	C1	Mar 2006	3TC, d4T, NFV	Fev 2006	220.000	5,342	939 (18,5)	2.031 (39,9)	0,46
			Ago 2006	3TC, d4T, NFV	Set 2006	100.000	5,000	1.086	2.358	0,46
			Fev 2007	3TC, d4T, NFV	Mar 2007	30.234	4,480	781	2.775	0,28
			Abr 2007	3TC, d4T, NFV	Mai 2007	212.779	5,328	829	1.785	0,46
			Out 2007	AZT, 3TC, EFV	Fev 2008	44.564	4,649	678 (16,0)	2.672 (63,0)	0,25
20	11	N3	Ago 2006	AZT, 3TC, EFV	Abr 2006	57.000	4,756	473 (11,7)	3.180 (78,5)	0,15
			Nov 2006	AZT, 3TC, EFV	Mai 2006	60.000	4,778	464	3.201	0,14
			Ago 2007	AZT, 3TC, Kaletra	Ago 2007	105.708	5,024	264 (12,0)	1.400 (63,0)	0,19
			Fev 2008	AZT, 3TC, Kaletra	Jan 2008	38.359	4,584	468 (14,0)	2.249 (67,0)	0,21
23	12	C2	Mai 2007	AZT, 3TC, RTV	Mai 2007	3.569	3,553	962	1.642	0,59
			Set 2007	TDF, 3TC, NFV	Ago 2007	<50	<1,698	877 (32,0)	960 (38,0)	0,91
			Dez 2007	AZT, 3TC, RTV	Abr 2008	253	2,403	1.504 (35,0)	1.728 (37,0)	0,87
			Mar 2008	TFV, 3TC, NFV	Ago 2008	-	-	1.074	1.184	0,91
24	10	B2	Mai 2007	AZT, 3TC, NVP	Mai 2007	3.786	3,578	802	1.465	0,55
			Set 2007	AZT, 3TC, Kaletra	Fev 2008	<50	<1,698	1.308 (33,0)	1.693 (46,0)	0,77
			Mar 2008	AZT, 3TC, Kaletra	Jul 2008	-	-	1.158	1.604	0,72
25	4	B2	Jun 2007	AZT, ddl, NVP	Jul 2007	5.036	3,702	650 (34,0)	1.097 (57,0)	0,59
			Set 2007	ABC, 3TC, Kaletra	Nov 2007	< 50	<1,698	635 (26,0)	972 (35,0)	0,65
			Fev 2008	ABC, 3TC, Kaletra	Jul 2008	-	-	774 (36,8)	607 (30,1)	1,28
27	6	B1	Ago 2007	AZT, ddl	Ago 2007	1.960	3,292	944	1.281	0,74
			Out 2007	AZT, ddl	Nov 2007	<50	<1,698	785 (29,0)	1.559 (40,0)	0,50
			Dez 2007	AZT, 3TC, EFV	Mai 2008	<50	<1,698	1.083 (30,0)	1.649 (39,0)	0,66

Id = nº de identificação da criança; Categ. clínica = categoria clínica

Tabela 10 - Parâmetros clínicos e laboratoriais referentes às crianças em tratamento HAART, sem alteração do esquema terapêutico.

Id.	Idade (anos)	Cat. clín.	Regime terapêutico		Carga viral			CD4	CD8	CD4/ CD8
			Data	Regime	Data	Cópias/mL	Log	(cels/ μ L) (%)	(cels/ μ L) (%)	
7	8	C3	Out 2005	d4T, 3TC, APV	Jul 2005	38.000	4,580	1.053 (22,4)	2.607 (55,5)	0,40
			Dez 2005	d4T, 3TC, APV	Nov 2005	34.000	4,531	1.061 (23,0)	2.624 (58,0)	0,40
			Mar 2006	d4T, 3TC, APV	Fev 2006	24.000	4,380	1.228 (22,8)	2.958 (54,9)	0,41
			Mai 2006	d4T, 3TC, APV	Jul 2006	17.000	4,230	1.466 (25,7)	3.134 (54,9)	0,46
11	10	C3	Dez 2005	AZT, 3TC, RTV	Out 2005	1.500	3,176	546 (26,3)	1.076 (51,7)	0,50
			Abr 2006	AZT, 3TC, RTV	Fev 2006	11.000	4,041	499 (20,3)	1.541 (62,6)	0,32
			Out 2006	AZT, 3TC, RTV	Set 2006	20.000	4,301	413	1.122	0,37
			Mai 2007	AZT, 3TC, RTV	Mai 2007	15.134	4,180	523	1.472	0,36
			Jul 2007	AZT, 3TC, RTV	Jul 2007	49.220	4,692	423	1.033	0,41
12	5	C1	Fev 2006	AZT, 3TC, NFV	Fev 2006	8.700	3,940	1.343 (49,4)	982 (36,1)	1,37
			Ago 2006	AZT, 3TC, NFV	Set 2006	2.400	3,380	967	961	1,01
			Jun 2007	AZT, 3TC, NFV	Ago2007	<50	<1,698	1.084 (53,0)	551 (25,0)	1,97
18	1	C3	Mai 2006	AZT, ddl, Kaletra	Mar 2006	2.000.000	6.301	435 (10,6)	3.001 (72,8)	0,14
			Jun 2006	AZT, ddl, Kaletra	Jun 2006	160.000	5.204	958	4.411	0,21
19	2	C3	Jun 2006	AZT, ddl, NVP	Mai 2006	830.000	5,919	171	2.428	0,07
			Ago 2006	AZT, ddl, NVP	Jul 2006	99	1,996	563 (9,7)	2.933 (50,6)	0,19
			Nov 2006	AZT, ddl, NVP	Ago 2006	570	2,756	591 (12,9)	2.517 (54,7)	0,23
			Fev 2007	AZT, ddl, NVP	Jan 2007	<50	<1,698	969	1.573	0,62
			Abr 2007	AZT, ddl, NVP	Mai 2007	<50	<1,698	856	1.724	0,50
			Set 2007	AZT, ddl, NVP	Ago 2007	<50	<1,698	1.397 (15,0)	2.807 (40,0)	0,50
			Nov 2007	AZT, ddl, NVP	Dez 2007	<50	<1,698	658 (15,0)	1.628 (35,0)	0,40
21	5	B2	Out 2006	Sem terapia	Jun 2006	<80	<1,903	353 (14,1)	1.294 (51,8)	0,27
			Jan 2007	Sem terapia	Jul 2006	350	2,544	585 (17,2)	2.379 (69,9)	0,25
			Jun 2007	AZT, 3TC, EFV	Mai 2007	<50	<1,698	326	1.129	0,29
			Out 2007	AZT, 3TC, EFV	Jul 2007	<50	<1,698	298 (16,0)	591 (44,0)	0,50
			Fev 2008	AZT, 3TC, EFV	Fev 2008	-	-	367 (20,0)	695 (33,0)	0,53
26	16	C3	Ago 2007	AZT, 3TC, Kaletra	Jul 2007	313.000	5,495	140 (15,0)	538 (57,0)	0,26
			Dez 2007	AZT, 3TC, Kaletra	Mar 2008	33.400	4,520	108 (9,0)	-	-
			Ago 2008	AZT, 3TC, Kaletra	Ago 2008	188.000	5,270	29 (7,0)	269 (64,0)	0,11
30	1	B1	Jan 2008	AZT, 3TC, NVP	Ago 2007	>500.000	>5,698	1.961 (27,0)	2.534 (32,0)	0,77
			Fev 2008	AZT, 3TC, NVP	Out 2007	-	-	1.440 (18,0)	3.361 (39,0)	0,43
			Abr 2008	AZT, 3TC, NVP	Jan 2008	482	2,683	1.866 (32,0)	2.206 (38,0)	0,85
			Mai 2008	AZT, 3TC, NVP	Mai 2008	<50	<1,698	2.051 (42,0)	1.240 (28,0)	1,65

Id = nº de identificação da criança; Cat. clín. = categoria clínica.

No grupo das 17 crianças com alterações do regime terapêutico, feitas em função dos resultados do teste de genotipagem, o manuseio da terapia HAART resultou em decréscimos da carga viral observados tão precocemente quanto quatro semanas após a modificação terapêutica.

Dentre elas, 16 apresentaram valores significantes, com quedas da carga viral variando entre 0,513 a 2,439 \log_{10} (média 1,752 \log_{10}). A taxa mais baixa registrada neste grupo (0,513 \log_{10}) foi reportada em uma criança com oito anos de idade, classificada na categoria clínica C3 com evolução clínica desfavorável e que foi a óbito. Esta criança apresentou um importante perfil de resistência viral a múltiplas drogas, elevados níveis de RNA viral, e contagens muito baixas de CD4, com valores da relação CD4/CD8 tão ínfimos como 0,05.

Um paciente dentre os 17, classificado na categoria clínica N3 e acompanhado por um período de 20 meses, mostrou o menor declínio da carga viral (0,172 \log_{10}), abaixo do limite estabelecido em 0,5 \log_{10} .

Doze das 16 crianças com queda da carga viral apresentaram importantes declínios, atingindo níveis de RNA viral abaixo do limite mínimo de detecção do teste e duas crianças apresentaram retorno da carga viral aos níveis iniciais, após estarem recebendo terapia antiretroviral durante onze meses.

Cinco crianças, dentre as oito sem alteração do esquema terapêutico, apresentaram decréscimos da carga viral superiores a 0,5 \log_{10} (média 2,481 \log_{10}) e, em uma criança, o decréscimo não foi significativo (0,225 \log_{10}). Nestas seis crianças foram detectados somente polimorfismos ou mutações não relevantes para os genes da transcriptase reversa e protease do HIV-1.

Dentre as duas crianças restantes, com resistência aos antiretrovirais, uma apresentou queda não significativa da carga viral (0,350 \log_{10}) e a outra criança apresentou aumento da carga viral, com diferença da taxa de RNA HIV-1 de 1,516 \log_{10} .

Observamos, portanto, que no grupo de crianças sem alteração do esquema terapêutico, o início ou a manutenção do regime antiretroviral permitiu uma redução da carga viral em sete das oito crianças incluídas. Além disto, os níveis plasmáticos de RNA viral alcançaram valores significativamente baixos, abaixo do limite mínimo de detecção do teste em quatro destas crianças, durante o período de observação do estudo.

12.7 Linfócitos T CD4+ e imunodeficiência associada ao HIV

Os valores de linfócitos T CD4+, utilizados para a classificação da imunodeficiência associada ao HIV, mostraram que, independente da idade da criança, oito em 25 apresentaram percentuais de CD4 abaixo de 15%, caracterizando grave imunodeficiência.

Sete crianças relataram estes baixos índices no momento de sua primeira avaliação laboratorial, referente à sua inclusão no estudo, e percentagens decrescentes de CD4 foram observadas em uma criança durante o período de acompanhamento clínico e laboratorial.

Modificações do regime terapêutico ou a sua manutenção promoveram aumentos nos percentuais de CD4 em quatro de oito crianças e, nas quatro restantes, observamos os seguintes resultados: uma queda importante de CD4 atingindo 4,44% foi observada na criança que foi a óbito no decorrer do estudo; em outra criança, acompanhada por um período de três meses, só foi possível o registro de uma avaliação do percentual de CD4, não permitindo a comparação de dados e em duas crianças foram observados percentuais de CD4 abaixo de 15% durante todo o período de acompanhamento, coincidentes com elevados níveis da carga viral.

Nas 17 crianças restantes, a avaliação de CD4 foi feita de acordo com a faixa etária, utilizando-se percentuais de CD4 para crianças com idades entre 12 a 59 meses e contagens de células T CD4+/mL para crianças a partir dos cinco anos de idade.

Quatro crianças foram incluídas no grupo com idade variando entre 12 a 59 meses, apresentando nível de imunodeficiência associado ao HIV descrito a seguir: leve (uma criança), avançado (uma criança) e não-significativo (duas crianças).

Neste grupo, alterações ou a manutenção do regime antiretroviral resultaram em aumento dos percentuais de CD4 nas três crianças com níveis de imunodeficiência leve ou não-significativo, promovendo a alteração do nível leve para não-significativo ou a manutenção do nível não-significativo, durante o período total de acompanhamento.

A quarta criança, com percentuais de CD4 iguais a 18,48 e 16,00, compatíveis com avançada imunodeficiência associada ao HIV, apresentou

decréscimos mínimos ou elevações nas taxas de carga viral, com valores flutuantes entre 4,480 log₁₀ a 5,342 log₁₀.

No grupo de 13 crianças com idade igual ou superior a cinco anos, a distribuição do nível de imunodeficiência associada ao HIV, de acordo com a contagem de células T CD4+, foi observada como descrito: avançado (uma criança), leve (três crianças) e não-significativo (nove crianças).

Nas quatro crianças com imunodeficiência leve ou avançada, alterações ou a manutenção do regime antiretroviral resultaram em troca para o nível não-significativo, com aumento nas contagens de células T CD4+.

Sete dentre as nove crianças que apresentaram nível de imunodeficiência não-significativo mantiveram o mesmo grau, demonstrando elevações nas contagens de células ou flutuações mínimas. Entretanto, duas crianças com nível não-significativo de imunodeficiência associado ao HIV evoluíram ao grau leve. Uma delas, para a qual foram introduzidas modificações no regime terapêutico, demonstrou decréscimos da carga viral, atingindo níveis indetectáveis e a segunda criança, que não teve alterações do esquema terapêutico, apresentou elevações da carga viral.

Embora as contagens ou percentuais de células T CD4+ tenham indicado, na maioria das crianças analisadas, uma melhoria no nível de imunodeficiência associado ao HIV, as contagens de linfócitos T CD8+ permaneceram constantemente elevadas ou apresentaram discretas flutuações, resultando em valores da relação CD4/CD8 abaixo de um em 20 das 25 crianças incluídas no estudo.

13 DISCUSSÃO

O advento da terapia antiretroviral altamente potente (HAART) em crianças e adultos infectados por HIV tem resultado em significativo aumento da expectativa de vida, com importante retardo na progressão da doença (Gortmaker et al., 2001) e relevante recuperação imune (Larrú et al., 2008).

A disponibilidade e uso de HAART têm promovido declínios marcantes nas taxas de mortalidade e morbidade (Gona et al., 2006; McConnell et al., 2005) e reduções importantes dos níveis da carga viral por períodos prolongados (Prendergast et al., 2008).

Entretanto, é ainda extremamente difícil obter a completa supressão viral em indivíduos infectados, devido a múltiplos fatores tais como: fraca ou incompleta aderência à medicação, intolerância à droga, interações medicamentosas ou administração em níveis inadequados.

A resposta virológica depende, fortemente, do histórico prévio medicamentoso, refletindo a seleção de linhagens virais mutantes resistentes aos antiretrovirais, como resultado de terapias sub-otimizadas.

A despeito de resultados iniciais promissores, que podem perdurar por muitos anos em várias crianças, a falha terapêutica tem sido frequentemente reportada, requerendo a reavaliação das opções de tratamento.

Determinações da resistência genotípica do HIV podem ser úteis, monitorando a resistência às drogas no momento da falha terapêutica ou previamente ao início da terapia (Hirsch et al., 2000).

A informação referente aos padrões de resistência é importante para decisões sobre a associação de drogas para a obtenção de um ótimo efeito antiviral (Jiménez et al., 2005; Viganò et al., 2008).

No presente trabalho, observamos um importante declínio da carga viral em 17 crianças, sendo 11 delas com resistência viral a múltiplas drogas, que tiveram opções terapêuticas alternativas baseadas nos resultados de testes de resistência genotípica para HIV-1.

Níveis indetectáveis da carga viral foram alcançados em 13 das 17 crianças. Em sete das oito crianças restantes, com seis sem evidência de resistência às drogas, a introdução da terapia HAART ou a manutenção do regime prévio da terapia antiretroviral resultou em redução significativa da carga viral, principalmente

para aqueles pacientes pediátricos virgens de tratamento, que deram início à terapia conforme foram incluídos no estudo.

Em relação às células T CD4+ vírus-específicas, está bem estabelecido o seu papel crítico na imunidade antiviral, mantendo as respostas efetivas de linfócitos T citotóxicos (Janssen et al., 2003; Sherdlock & Shen, 2003).

Em indivíduos infectados por HIV, não tratados, a infecção viral desenvolve-se com maciça e precoce depleção destas células (Douek et al., 2002; Wahren et al., 1987), o que pode contribuir para a ausência de efetivo controle imune da replicação viral e para a progressão da doença associada ao HIV, uma vez que o estado de ativação imune crônica poderia contribuir para a exaustão das funções imunes e para a perda de linfócitos T CD4+, levando à progressão da doença (Derdeyn & Silvestri, 2005; Giorgi et al., 1999).

Em pacientes pediátricos infectados por HIV, abaixo dos cinco anos de idade, o percentual de células T CD4+ reproduz o monitoramento mais consistente da doença, uma vez que este parâmetro tende a mostrar menor variabilidade relacionada à idade quando comparado à contagem de células. Assim, definições têm sido formuladas com base na faixa etária da população pediátrica para a supressão imune, provendo orientações para o monitoramento da progressão da doença (Ministério da Saúde, 2004).

O manuseio da terapia HAART de acordo com a resistência viral, no grupo de pacientes pediátricos avaliados neste estudo, permitiu observar um aumento nas contagens e/ou percentuais de células T CD4+ em 12 das 25 crianças, demonstrando melhorias nos níveis de imunodeficiência associada ao HIV. Entretanto, 20 entre as 25 crianças infectadas por HIV apresentaram taxas elevadas de linfócitos T CD8+, independente do sucesso da terapia HAART.

A população de células T CD8+ apresenta uma capacidade constitutiva antiviral, que poderia responder pelo controle da replicação viral em raros adultos infectados por HIV que, persistentemente, apresentam cargas virais plasmáticas indetectáveis na ausência de terapia antiretroviral, referidos como “HIV controllers” (Sáez-Cirión et al., 2007). Está bem estabelecido, também, que a infecção por HIV influencia a expressão de células T CD8+, causando sua ativação imune e expansão celular (Paul et al., 2005). Assim, uma vez que a doença causada pelo HIV caracteriza-se pela ativação imune crônica, a persistência da carga viral, mesmo em níveis baixos ou não detectáveis, poderia atuar constantemente como estímulo

antigênico, resultando em níveis sustentados de células T CD8+ (Derdeyn & Silvestri, 2005).

Em relação aos tópicos relacionados à biologia molecular observamos, no presente estudo, que todas as 25 crianças infectadas por HIV-1 apresentaram linhagens virais carreando, no mínimo, uma mutação polimórfica ou mutação de resistência antiretroviral nos genes da protease ou da transcriptase reversa.

Linhagens virais resistentes aos inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeo, inibidores não-análogos e inibidores de protease foram, respectivamente, observadas em 18, 7 e 13 crianças. Esta distribuição apresentou uma pequena diferença em relação àquela observada em um estudo prévio conduzido por nós, na análise de uma população semelhante (Simonetti et al., 2003).

Dentre as 18 crianças apresentando resistência viral aos NRTIs, mutações no gene RT foram detectadas com maior frequência nos códons T215F/Y (14 crianças), M41L (13 crianças) e M184V (13 crianças).

Mutações nos códons 41 e 215, juntamente a outras mutações em RT, nos códons 67, 70, 210 e 219 são denominadas mutações de resistência aos análogos de timidina (TAMs).

Elas ocorrem gradualmente sob a pressão seletiva de análogos de timidina, tanto zidovudina como estavudina, e podem promover resistência a quase todos os análogos de nucleosídeo e nucleotídeo, dificultando o manuseio de regimes antiretrovirais (Shafer et al., 2000; Hu et al., 2006).

No presente estudo, 17 dentre as 18 crianças apresentando resistência viral aos NRTIs estavam em tratamento com regimes contendo zidovudina ou estavudina, no momento da avaliação da resistência genotípica.

Vários estudos têm sugerido que as TAMs dividem-se em dois grupos distintos: o grupo TAM-1 engloba mutações que ocorrem juntamente com T215Y, incluindo M41L e L210W, enquanto que mutações que ocorrem juntamente com T215F, incluindo D67N, K70R e K219Q constituem o grupo TAM-2 (Hanna et al., 2000; Marcelin et al., 2004).

A divisão destas mutações em dois grupos tem importante significado clínico. Linhagens virais resistentes à zidovudina, carreando mutações do padrão TAM-1 apresentam, comumente, resistência cruzada a didanosina e tenofovir, enquanto

que aquelas carreando mutações TAM-2 são, geralmente, suscetíveis a eles (Marcelin et al., 2005; Miller et al., 2000).

No presente estudo, as oito crianças agrupadas em TAM-1 apresentaram resistência cruzada a didanosina e tenofovir. Entretanto, para as cinco crianças agrupadas como TAM-2, os resultados mostraram que apenas uma era suscetível a didanosina e tenofovir. Dentre as quatro crianças restantes, apresentando resistência a didanosina e tenofovir, três estavam em terapia com regimes contendo estas drogas, atuando como pressão seletiva na emergência de linhagens virais resistentes.

A mutação de hipersuscetibilidade M184V foi frequentemente observada dentre os pacientes pediátricos incluídos neste estudo.

Ela aumenta a suscetibilidade viral a zidovudina, tenofovir e estavudina, parcialmente revertendo a resistência mediada por T215Y (Shafer et al., 2000; Whitcomb et al., 2003).

Entretanto, esta mutação causa, “in vitro”, alto nível de resistência a lamivudina (acima de 100 vezes) e emtricitabina. Ela é, geralmente, selecionada em regimes terapêuticos contendo abacavir (Miller et al., 2000) e menos comumente com ddl (Winters et al., 1997) causando baixo nível de resistência “in vitro” (cerca de duas vezes) a cada um destes compostos.

As mutações acessórias V118I, E44D e H208Y, detectadas em 12 crianças neste estudo, ocorrem com mutações do padrão TAM e estão associadas com reduções da suscetibilidade a múltiplos NRTIs.

Em particular, a mutação V118I ocorre com frequência aumentada em indivíduos em tratamento com múltiplos NRTIs, causando resistência em baixo nível à lamivudina e a outros NRTIs quando presente com a mutação E44AD e outras TAMs.

Em relação à mutação H208Y, dados da literatura indicam a existência de forte associação entre esta mutação e a experiência com NRTIs, principalmente em indivíduos com linhagens HIV-1 subtipo B, carreando múltiplas mutações de resistência aos NRTIs (Nebbia et al., 2007).

Todas as 12 crianças que exibiram estas mutações acessórias demonstraram um perfil de resistência viral compatível com o que foi mencionado, com exceção de uma criança (número 13), que estava em tratamento terapêutico com regime

incluindo zidovudina e lamivudina, na ocasião da avaliação genotípica, e apresentou uma única mutação, V118I, que não conferiu evidências de resistência viral.

Esta criança era um dos gêmeos que apresentaram cepas HIV-1 subtipadas como F1 e ambos estavam em contínua terapia antiretroviral por um período de tempo equivalente a cinco anos.

A outra criança (número 12) também apresentou um perfil singular. Ela estava em tratamento antiretroviral com regime terapêutico que incluía zidovudina, lamivudina e nelfinavir, durante a realização do teste de resistência genotípica, e apresentou somente a mutação F77L que não conferiu evidências de resistência às drogas. Em indivíduos com isolados HIV-1 do subtipo B, a presença da mutação F77L resulta em aumento da resistência a múltiplos nucleosídeos, causada pela mutação Q151M, quando associada a V75I ou F116Y. Entretanto, o seu efeito na ausência de Q151M não é, ainda, conhecido.

Além das amostras com subtipo F1, observamos, no presente estudo, quatro amostras subtipo não-B, classificadas como recombinantes virais.

Nas duas amostras BD, o perfil de mutações seguiu o padrão observado para o subtipo B, com as mutações M41L e T215F/Y observadas em uma criança e a mutação M184V em ambas.

O recombinante B/F, detectado em uma criança, apresentou as mutações M41L, D67N, K103N, M184V e H208Y e o recombinante DF não apresentou mutações relevantes de resistência viral aos inibidores da transcriptase reversa.

O conhecimento sobre a resistência do HIV-1 às drogas antiretrovirais é baseado, principalmente, em estudos envolvendo amostras de subtipo B e, mutações conhecidas e definidas para este subtipo, também ocorrem nos demais subtipos. As evidências atuais sugerem comparável evolução da resistência às drogas em pacientes HIV-1 carreando distintos subtipos (Kantor et al., 2005; Kantor, 2006; van de Vijver et al., 2006). Entretanto, tem sido relatado também que polimorfismos naturais ocorrem, frequentemente, em isolados HIV-1 com subtipos não-B, em posições com reconhecida associação à resistência às drogas, em vírus com subtipo B (Kantor, 2006).

Estas diferenças podem modificar a suscetibilidade às drogas, afetando a interpretação de testes para a avaliação da resistência genotípica e a capacidade em aplicar estes resultados ao tratamento dos pacientes (Holguín et al., 2006; Kantor et al., 2005; Kantor, 2006; van de Vijver et al., 2006).

Em relação aos NNRTIs, observamos, no presente estudo, que sete crianças apresentaram cepas virais (seis subtipo B e um recombinante BF) carreando mutações que conferiram resistência à delavirdina (uma criança) ou às três drogas, nevirapina, delavirdina e efavirenz.

Três crianças (números 14, 20 e 24) estavam em tratamento com regimes que incluíam nevirapina ou efavirenz, no momento da avaliação do teste de genotipagem, e apresentaram mutações específicas que conferiram níveis de resistência viral, intermediários a elevados, a todas as três drogas.

Duas outras crianças (números 8 e 23) apresentaram a mutação A98G. Esta mutação ocorre em cerca de 1% de indivíduos com regimes terapêuticos que não incluem os NNRTI e causa resistência à nevirapina, em baixo nível.

As crianças que apresentaram esta mutação estavam em regime terapêutico sem NNRTIs mas, ao invés de apresentarem resistência viral à nevirapina, os resultados indicaram, em uma criança, resistência viral, em baixos níveis, às três drogas e, na outra criança, resistência somente à delavirdina.

As duas crianças restantes (números 10 e 25) também não estavam recebendo NNRTIs no momento da avaliação genotípica porém, haviam recebido regimes antiretrovirais contendo nevirapina dois a três anos antes da realização do teste.

Uma delas (número 10, recombinante BF) apresentou a mutação K103N e a outra (número 25) apresentou as mutações K101E e G190A, que conferiram resistência viral às três drogas, em ambas as crianças.

A possível explicação para o que foi observado é que as mutações de resistência aos NNRTIS, uma vez selecionadas, são geralmente detectadas no plasma de indivíduos infectados, em períodos de tempo que se estendem por meses a anos, após a descontinuidade da medicação (Joly et al., 2001; Soriano, 2006).

Dentre as 12 crianças que apresentaram resistência aos PIs, mutações no gene da protease foram observadas, mais frequentemente, nos códons M46IL (seis crianças), L90M (cinco crianças) e D30N (quatro crianças).

Mutações na posição 46 contribuem para a resistência viral a cada um dos PIs, decrescendo a suscetibilidade a IDV, NFV, FPV, LPV, ATV, TPV e, possivelmente, SQV e DRV quando presente com outras mutações. Esta mutação tem sido comumente relatada durante terapias com IDV, RTV, APV e NFV (Condra et al., 2000).

As seis crianças que apresentaram a mutação M46IL estavam em terapia com regimes contendo NFV ou RTV, no momento da avaliação do teste de genotipagem, com exceção de uma criança (número 27) que jamais havia recebido regimes terapêuticos contendo PIs. Em adição à mutação M46L, ela apresentou o polimorfismo A71V, que ocorre em 1-2% de pessoas não tratadas, mas que tem se tornado muito mais frequente em indivíduos em tratamento com PIs.

A mutação L90M confere resistência a NFV, SQV, ATV e IDV (Dronda et al., 2001). Quando presente a outras mutações, compromete adicionalmente a atividade de FPV, LPV e TPV. Todas as cinco crianças apresentando esta mutação mostraram um importante perfil de resistência viral a múltiplas drogas, variando entre cinco a doze PIs.

Resíduos não comuns foram relatados na posição 89. A mutação L89M foi observada em duas crianças em tratamento sem a inclusão de PIs, carreando linhagens virais subtipo F1 e sem evidências de resistência aos PIs. Esta mutação é uma substituição polimórfica que ocorre naturalmente em subtipos F e outros não-B, que pode levar ao desenvolvimento precoce de resistência às drogas em pacientes infectados com subtipos não-B (Sanches et al., 2007).

A mutação L89I foi detectada em duas crianças infectadas por HIV-1 subtipo B, que estavam recebendo terapia com regime contendo RTV e apresentaram resistência viral a múltiplas drogas.

Tem sido relatado que, para os subtipos C, F e G, o códon tipo selvagem em 89 é M, comparado a L para o subtipo B, e que a mutação M89I é, de maneira significativa, mais frequentemente observada em pacientes tratados com PIs do que em pacientes não tratados, apresentando mutações de resistência principais a estes antiretrovirais (Abecasis et al., 2005).

Além das amostras com subtipo F1, observamos que a presença de mutações no gene da protease, em amostras de subtipo não-B, obedeceu à seguinte distribuição: recombinantes BF e DF apresentaram as mutações acessórias polimórficas M36ILV e L63P, que não conferiram evidências de resistência aos PIs.

Nas duas amostras classificadas como recombinante BD, foram registradas mutações acessórias polimórficas e mutações principais de resistência viral aos PIs. Adicionalmente, a mutação acessória não-polimórfica T74S, provavelmente associada à resistência a múltiplos PIs, foi relatada em uma criança.

Deve ser observado que a maioria dos pacientes analisados neste estudo apresentou linhagens HIV-1 classificadas no subtipo B. Análises adicionais são requeridas para incrementar as informações relativas ao papel de substituições polimórficas e mutações incomuns sobre a resistência viral às drogas em outros subtipos não-B.

Estudos sobre a resistência viral, envolvendo crianças infectadas por HIV-1, são de particular importância e consistem em relevante contribuição aos dados disponíveis na literatura mundial.

A informação sobre os padrões de resistência é de fundamental importância em definir decisões sobre a combinação de drogas, objetivando o melhor efeito antiviral.

Além disto, a vigilância da resistência viral referente aos níveis regionais, poderá fornecer orientações básicas ao uso racional das drogas antiretrovirais em programas de tratamento.

Adicionalmente, estudos sobre a resistência viral são importantes não só para o monitoramento epidemiológico da infecção como também para o desenvolvimento de vacinas.

14 CONCLUSÕES

- As mutações de resistência viral, detectadas no grupo de pacientes pediátricos incluídos neste estudo, conferiram significativos níveis de resistência aos diferentes compostos antiretrovirais, inibidores de transcriptase reversa e de protease.
- O perfil de resistência viral caracterizou-se por relevante número de mutações em importantes codons de resistência, contribuindo para o desenvolvimento de linhagens virais resistentes a múltiplas drogas em 18 das 25 crianças analisadas.
- Importante declínio da carga viral foi observado em 17 crianças, sendo 11 delas com resistência viral a múltiplas drogas, que tiveram opções terapêuticas alternativas, baseadas nos resultados de testes de resistência genotípica para HIV-1. Níveis indetectáveis da carga viral foram alcançados em 13 das 17 crianças.
- Além do declínio da carga viral, observou-se aumento nas contagens e/ou percentuais de células T CD4+ em 12 crianças, após alteração do esquema antiretroviral, demonstrando melhorias nos níveis de imunodeficiência associada ao HIV.
- A detecção de mutações no genoma viral, através da genotipagem, é importante em estabelecer o significado clínico de isolados resistentes e a associação desta metodologia à carga viral e contagens de células CD4 poderá orientar na introdução e alterações do esquema terapêutico, contribuindo para a melhoria da qualidade de vida dos pacientes.

REFERÊNCIAS

Abecasis AB, Deforche K, Bacheler LT, McKenna P, Carvalho AP, Gomes P et al. Investigation of baseline susceptibility to protease inhibitors in HIV-1 subtypes C,F,G and CRF02_AG. *Antivir Ther.* 2006;11:581-9.

Abecasis AB, Deforche K, Snoeck J, Bacheler LT, McKenna P, Carvalho AP et al. Protease mutation M89I/V is linked to therapy failure in patients infected with the HIV-1 non-B subtypes C, F or G. *AIDS.* 2005;19:1799-806.

Aiken C, Konner J, Landau NR, Lenburg ME, Trono D. Nef induces CD4 endocytosis: requirement for a critical dileucine motif in the membrane-proximal CD4 cytoplasmic domain. *Cell.* 1994;76:853-64.

Alencastro C. AIDS: país fará drogas para criança. *O Globo.* 11 de janeiro de 2009; *Ciência/Saúde*:35 (col.1).

Arthur LO, Bess JW, Sowder RC, Benveniste RE, Mann DL, Chermann JC et al. Cellular proteins bound to immunodeficiency viruses: implications for pathogenesis and vaccines. *Science.* 1992;258:1935-8.

Ayouba A, Souquieres B, Njinku B, Martin PM, Muller-Trutwin MC, Roques P et al. HIV-1 group N among HIV-1-seropositive individuals in Cameroon. *AIDS.* 2000;14:2623-5.

Azzoni L, Rutstein RM, Chehimi J, Farabaugh MA, Nowmos A, Montaner LJ. Dendritic and natural killer cell subsets associated with stable or declining CD4+ cell counts in treated HIV-1 infected children. *J Infect Dis.* 2005;191:1451-9.

Baba M, Shigeta S, Yuasa S, Takashima H, Sekiya K, Ubasawa M et al. Preclinical evaluation of MKC-442, a highly potent and specific inhibitor of human immunodeficiency virus type 1 *in vitro*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1994;38:688-92.

Baba M, Tanaka H, De Clercq E, Pauwels R, Balzarini J, Schols D et al. Highly specific inhibition of human immunodeficiency virus type 1 by a novel 6-substituted acyclouridine derivative. *Biochem Biophys Res Commun.* 1989;165:1375-81.

Banda NK, Bernier J, Kurahara DK, Kurrle R, Haigwood N, Sekaly RP et al. Cross-linking CD4 by HIV gp 120 primers T cells for activation induced apoptosis. *J Exp Med.* 1992;176:1099-1106.

Barré-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugevre MT, Chamaret S, Gruest J et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science.* 1983;220:868-71.

Barreto CC, Nishyia A, Araujo LV, Ferreira JE, Busch MP, Sabino EC. Trends in antiretroviral drug resistance and clade distributions among HIV-1 infected blood donors in São Paulo, Brazil. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2006;41:338-431.

Baur AS, Sawai ET, Dazin P, Fantl WJ, Cheng-Mayer C, Peterlin BM. HIV-1 nef leads to inhibition or activation of T cells depending on its intracellular localization. *Immunity*. 1994;1:373-84.

Beerenwinkel N, Daumer M, Sing T, Rahnenfuhrer J, Lengauer T, Selbig J et al. Estimating HIV evolutionary pathways and the genetic barrier to drug resistance. *J Infect Dis*. 2005;191:1953-60.

Bello G, Casado C, Sandonis V, Alonso-Nieto M, Vicario JL, García S et al. A subset of human immunodeficiency virus type 1 long-term non-progressors is characterized by the unique presence of ancestral sequences in the viral population. *J Gen Virol*. 2005;86:355-64.

Bocket L, Cheret A, Deulfic-Burban S, Choisy P, Gerard Y, de la Tribonnière X et al. Impact of human immunodeficiency virus type 1 subtype on first-line antiretroviral therapy effectiveness. *Antivir Ther*. 2005;10:247-54.

BRASIL. Ministério da Saúde. Critérios de definição de casos de AIDS em adultos e crianças. Série Manuais nº 60, PN DST-AIDS, 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Guia de tratamento clínico da infecção pelo HIV em crianças. Série Manuais nº 18 SVS, PN DST-AIDS, 3ª ed., 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Guia de tratamento clínico da infecção pelo HIV em pediatria. Ministério da Saúde, Brasília. 2007. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/data/documents/storedDocuments/Consenso%20pediatria%202007%20-20final.pdf>

Brenner BG, Routy JP, Petrella M, Moisi D, Oliveira M, Detorio M et al. Persistence and fitness of multidrug-resistant human immunodeficiency virus type 1 acquired in primary infection. *J Virol*. 2002;76:1753-61.

Brillant J, Klumpp K, Swallow S, Cammack N, Heilek-Snyder G. In vitro resistance development for a second-generation NNRTI: TMC125. *Antivir Ther*. 2004;9:S20.

Brown PO. Integration. In: Coffin JM, editor. *Retroviruses*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1997. p.161-203.

Buchbinder SP, Katz MH, Hessel NA, O'Malley PM, Holmberg SD. Long-term HIV-1 infection without immunologic progression. *AIDS*. 1994;8:1123-8

Bukrinsky MI, Stanwick TL, Dempsey MP, Stevenson M. Quiescent lymphocytes as an inducible virus reservoir in HIV-1 infection. *Science*. 1991;254:423-7.

Bukrinsky M, Adzhubei A. Viral protein R of HIV-1. *Rev Med Virol*. 1999;9:39-49.

Burns DPW, Desrosiers RC. Envelope sequence variation, neutralizing antibodies and primate lentivirus persistence. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1994;188:185-219.

Caride E, Brindeiro R, Hertogs K, Larder B, Dehertogh P, Machado E et al. Drug-resistant reverse transcriptase genotyping and phenotyping B and non-B subtypes (F

and A) of human immunodeficiency virus type 1 found in Brazilian patients failing HAART. *Virology*. 2001;275:107-15.

Chakraborty R, Morel AS, Sutton JK, Appay V, Ripley RM, Dong T et al. Correlates of delayed disease progression in HIV-1-infected Kenyan children. *J Immunol* 2005;174:8191-9.

Chen Z, Li Y, Chen E, Hall DL, Darke PL, Culberson C et al. Crystal structure at 1.9-Å resolution of human immunodeficiency virus (HIV) II protease complexed with L-735,524, an orally bioavailable inhibitor of the HIV proteases. *J Biol Chem*. 1994; 269:26344-8.

Clements JE, Wong-Staal F. Molecular biology of lentiviruses. *Semin Virol*. 1992;3:137-46.

Coffin JM. HIV population dynamics in vivo: implications for genetic variation, pathogenesis, and therapy. *Science*. 1995;267:483-9.

Collins KL, Chen BK, Walker BD, Baltimore D. HIV-1 nef protein protects infected primary cells against killing by cytotoxic T lymphocytes. *Nature*. 1998;391:397-401.

Condra JH, Petropoulos CJ, Ziermann R, Schleif WA, Shivaprakash M, Emini EA. Drug resistance and predicted virologic responses to human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitor therapy. *J Infect Dis*. 2000;182:758-65.

Couto-Fernandez JC, Silva-de-Jesus C, Veloso VG, Rachid M, Gracie RS, Chequer-Fernandez SL et al. Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) genotyping in Rio de Janeiro, Brazil: assessing subtype and drug-resistance associated mutations in HIV-1 infected individuals failing highly active antiretroviral therapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2005;100:73-8.

D'Aquila RT, Hughes MD, Johnson VA, Fischl MA, Sommadossi JP, Liou SH et al. Nevirapine, zidovudine, and didanosine compared with zidovudine and didanosine in patients with HIV-1 infection. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. National Institute of Allergy and Infectious Diseases AIDS Clinical Trials Group Protocol 241 Investigators. *Ann Intern Med*. 1996;124:1019-30.

Darke PL, Nutt RF, Brady SF, Garsky VM, Ciccarone TM, Leu C-T et al. HIV-1 protease specificity of peptide cleavage is sufficient for processing of gag and pol polyproteins. *Biochem Biophys Res Commun*. 1988;156:297-303.

De Clercq E. Non nucleoside reverse transcriptase inhibitors: An overview in insights in HIV disease management. *Meniscus Health Care Commun*. 1997;6:2-9.

De Clercq E, Field HJ. Antiviral chemistry and chemotherapy's current antiviral agents FactFile (2nd edition): retroviruses and hepadnaviruses. *Antivir Chem Chemother*. 2008;19:75-105.

Deng H, Liu R, Ellmeier W, Choe S, Unutmaz D, Burkhart M et al. Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature*. 1996;381:661-6.

Denissen JF, Grabowski BA, Johnson MK, Buko AM, Kempf DJ, Thomas SB et al. Metabolism and disposition of the HIV-1 protease inhibitor ritonavir (ABT-538) in rats, dogs, and humans. *Drug Metab Dispos* 1997;25:489-501.

Derdeyn CA, Silvestri G. Viral and host factors in the pathogenesis of HIV infection. *Curr Opin Immunol*. 2005;17:366-73.

De Sá Filho DJ, Sucupira MC, Caseiro MM, Sabino EC, Diaz RS, Janini LM. Identification of two HIV type 1 circulating recombinant forms in Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2006;22:1-13.

de Wolf F, Lange JM, Houweling JT, Coutinho RA, Schellekens PT, van der Noordaa J et al. Numbers of CD4+ cells and the levels of core antigens of and antibodies to the human immunodeficiency virus as predictors of AIDS among seropositive homosexual men. *J Infect Dis*. 1988;158:615-22.

Doranz BJ, Rucker J, Yi Y, Smyth RJ, Samson M, Peiper SC et al. A dual-tropic primary HIV-1 isolate that uses fusin and the β -chemokine receptors CKR-5, CKR-3, and CKR-2b as fusion cofactors. *Cell*.1996;85:1149-58.

Douek DC, Brenchley JM, Betts MR, Ambrozak DR, Hill BJ, Okamoto Y et al. HIV preferentially infects HIV-specific CD4+ T cells. *Nature*. 2002;417:95-8.

Dragic T, Litwin V, Allaway GP, Martin SR, Huang Y, Nagashima KA et al. HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CK5-5. *Nature*.1996;381:667-73.

Drona F, Casado JL, Moreno S, Hertogs K, Garcia-Arata I, Antela A et al. Phenotypic cross-resistance to nelfinavir: the role of prior antiretroviral therapy and the number of mutations in the protease gene. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2001;17:211-5.

Embretson J, Zupancic M, Ribas JL, Burke A, Racz P, Tenner-Racz K et al. Massive covert infection of helper T lymphocytes and macrophages by HIV during the incubation period of AIDS. *Nature*. 1993;362:359-62

Eshleman SH, Becker-Pergola G, Deseyve M, Guay LA, Mracna M, Fleming T et al. Impact of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) subtype on women receiving single-dose nevirapine prophylaxis to prevent HIV-1 vertical transmission. *J Infect Dis*. 2001;184:914-7.

Feng Y, Broder CC, Kennedy PE, Berger EA. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science*. 1996;272:872-7.

Flexner C. HIV-protease inhibitors. *N Engl J Med* 1998;338:1281-92.

Franke, EK, Yuan HEH, Bossolt, KL, Goff SP, Luban J. Specificity and sequence requirements for interactions between various retroviral gag proteins. *J Virol*. 1994;68:5300-5.

Frederick T, Mascola L, Eller A, O'Neil L, Byers B. Progression of human immunodeficiency virus disease among infants and children infected perinatally with human immunodeficiency virus or through neonatal blood transfusion. *Pediatr Infect Dis J*. 1994;13:1091-7.

Freed EO. HIV-1 and the host cell: an intimate association. *Trends in Microbiology*. 2004;12:170-7.

Furman PA, Fyfe JA, St Clair MH, Weinhold K, Rideout JL, Freeman GA et al. Phosphorylation of 3'-azido-3'-deoxythymidine and selective interaction of the 5'-triphosphate with human immunodeficiency virus reverse transcriptase. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1986;83:8333-7.

Gallo RC, Salahuddin SZ, Popovic M, Shearer GM, Kaplan M, Haynes BF et al. Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science*. 1984;4:500-3.

Gao F, Morrison SG, Robertson DL, Thornton CL, Craig S, Karisson G et al. Molecular cloning and analysis of functional envelope genes from human immunodeficiency virus type 1 sequence subtypes A through G. *J Virol*. 1996;70:1651-67.

Gao F, Vidal N, Li Y, Trask SA, Chen Y, Kostrikis LG et al. Evidence of two distinct subsubtypes within the HIV-1 subtype A radiation. *AIDS Res Hum Retrovir*. 2001;17:675-88.

Gao Q, Yue L, Robertson DL. Genetic diversity of human immunodeficiency virus type 2: evidence for distinct sequence subtypes with differences in virus biology. *J Virol*. 1994;68:7433-47.

Gelderblom HR. Assembly and morphology of HIV potential effect of structure on viral function. *AIDS*. 1991;5:617-38.

Giorgi JV, Hultin LE, McKeating JA, Johnson TD, Owens B, Jacobson LP et al. Shorter survival in advanced human immunodeficiency virus type 1 infection is more closely associated with T lymphocyte activation than with plasma virus burden or virus chemokine coreceptor usage. *J Infect Dis*. 1999;179:859-70.

Goff S. Retroviridae: the retroviruses and their replication. In: Knipe DM and Howley PM, eds. *New York: Lippincott Williams and Wilkins*; 2001.p. 1871-1940.

Goff SP. Genetics of retroviral integration. *Annu Rev Genet*. 1992;26:527-44.

Gona P, van Dyke R, Williams PL, Dankner WM, Chernoff MC, Nachman AS et al. Incidence of opportunistic and other infections in HIV-infected children in HAART era. *JAMA*. 2006;296:292-300.

Gonzalez LMF, Brindeiro RM, Aguiar RS, Pereira HS, Abreu CM, Soares MA et al. Impact of nelfinavir resistance mutations on in vitro phenotype, fitness, and replication capacity of human immunodeficiency virus type 1 with subtype B and C

proteases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48:3552-5.

Gortmaker SL, Highes M, Cervia J, Brady M, Johnson GM, Seage GR 3rd et al. Effect of combination therapy including protease inhibitors on mortality among children and adolescents infected with HIV-1. *N Engl J Med.* 2001;345:1522-8.

Gulick RM, Mellors JW, Havlir D, Eron JJ, Gonzalez C, McMahon D et al. Treatment with indinavir, zidovudine, and lamivudine in adults with human immunodeficiency virus infection and prior antiretroviral therapy. *N. Engl J Med.* 1997;337:734-9.

Gutler L, Eberle J, von Brunn A, Knapp S, Hauser HP, Zekeng L et al. A new subtype of human immunodeficiency virus type 1 (MPV 5180) from Cameroon. *J Virol.* 1994;68:1581-5.

Hanna G, Johnson VA, Kuritzkes DR, Richman DD, Leigh-Brown A, Savara A et al. Patterns of resistance mutations selected by treatment of human immunodeficiency virus type 1 infection with zidovudine, didanosine, and nevirapine. *J Infect Dis.* 2000;181:904-11.

Hanna GJ, Hirsch MS. Antiretroviral therapy of human immunodeficiency virus Infection. In: Mandell GL, Dolin JE, Bennett K, eds. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2000. p. 1479-1500.

Hemelaar J, Gouws E, Ghys PD, Osmanov S. Global and regional distribution of HIV-1 genetic subtypes and recombinants in 2004. *AIDS.* 2006;20:13-23.

Herschhorn A, Lerman L, Weitman M, Gleenberg IO, Nudelman A, Hizi A. De novo parallel design, synthesis and evaluation of inhibitors against the reverse transcriptase of human immunodeficiency virus type-1 and drug-resistant variants. *J Med Chem.* 2007;50:2370-84.

Hirsch MS, Brun-Vézinet F, D'Aquila RT, Hammer SM, Johnson VA, Kuritzkes DR et al. Antiretroviral drug resistance testing in adult HIV-1 infection: recommendations of an International AIDS Society-USA panel. *JAMA.* 2000;283:2417-26.

Ho DD, Neumann AU, Perelson AS, Chen J, Leonard JM, Markowitz M. Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature.* 1995;373:123-6.

Ho DD, Tarsem M, Alam M. Quantitation of human immunodeficiency virus type 1 in the blood of infected persons. *N Engl J Med.* 1989;321:1621-5.

Höglund S, Ofverstedt L-G, Nilsson A, Lundquist P, Gelderblom H, Ozel M et al. Spatial visualization of the maturing HIV-1 core and its linkage to the envelope. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 1992;8:1-7.

Holguín A, Ramirez de Arellano E, Rivas P, Soriano V. Efficacy of antiretroviral therapy in individuals infected with HIV-1 non-B subtypes. *AIDS Rev.* 2006;8:98-107.

Hu Z, Giguel F, Hatano H, Reid P, Lu J, Kuritzkes DR. Fitness comparison of thymidine analog resistance pathways in Human Immunodeficiency Virus type 1. *J Virol*. 2006;80:7020-7.

Janssen EM, Lemmens EE, Wolfe T, Christen U, von Herrath MG, Schoenberger SP. CD4+ T cells are required for secondary expansion and memory in CD8+ T lymphocytes. *Nature*. 2003;421:852-6.

Janssens W, Heyndrickx L, Franssen K, Motte J, Peeters M, Nkengasong JN et al. Genetic and phylogenetic analysis of *env* subtypes G and H in Central Africa. *AIDS Res Hum Retrovir*. 1994;10:877-9.

Joly V, Descamps D, Zeng F. Evolution of HIV-1 resistance mutations to non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTI) following withdrawal. The 1st IAS Conference on HIV Pathogenesis and Treatment; July 8-11, 2001; Buenos Aires, Argentina. Abstract 123.

Kantor R. Impact of HIV-1 pol diversity on drug resistance and its clinical implications. *Curr Opin Infect Dis*. 2006;19:594-606.

Kantor R, Katzenstein DA, Efron B, Carvalho AP, Wynhoven B, Cane P et al. Impact of HIV-1 subtype and antiretroviral therapy on protease and reverse transcriptase genotype: results of a global collaboration. *PLoS Med*. 2005;2:325-37.

Kempf DJ, Marsh KC, Kumar G, Rodrigues AD, Denissen JF, McDonald E et al. Pharmacokinetic enhancement of inhibitors of the human immunodeficiency virus protease by coadministration with ritonavir. *Antimicrob Agents Chemother*. 1997;41:654-60.

Klimkait T, Strebel K, Hoggan MD, Martin MA, Orenstein JM. The human immunodeficiency virus type 1 - specific protein vpu is required for efficient virus maturation and release. *J Virol*. 1990;64:621-9.

Kilby JM, Hopkins S, Venetta TM, DiMassimo B, Cloud GA, Lee JY et al. Potent suppression of HIV-1 replication in humans by T-20, a peptide inhibitor of gp41-mediated virus entry. *Nat Med*. 1998;4:1302-7.

Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol*. 1980;16:111-20.

Kirchhoff F, Greenough TC, Brettler DB, Sullivan JL, Desrosiers RC. Brief report: absence of intact nef sequences in a long-term survivor with nonprogressive HIV-1 infection. *N Engl J Med*. 1995;332:228-32.

Kostrikis LG, Bagdades E, Cao Y, Zhang L, Dimitriou D, Ho DD. Genetic analysis of human immunodeficiency virus type 1 strains from patients in Cyprus: identification of a new subtype designated subtype I. *J Virol*. 1995;69:6122-30.

Kroeger Smith MB, Rouzer CA, Taneyhill LA, Smith NA, Hughes SH, Boyer PL et al. Molecular modeling studies of HIV-1 reverse transcriptase nonnucleoside inhibitors:

Total energy of complexation as a predictor of drug placement and activity. *Protein Sci.* 1995;4:2203-22.

Lalezari JP, Eron JJ, Carlson M, Cohen C, DeJesus E, Arduino RC et al. A phase II clinical study of the long-term safety and antiviral activity of enfuvirtide-based antiretroviral therapy. *AIDS.* 2003;17:691-8.

Larrú B, Resino S, Bellón JM, de José MI, Fortuny C, Navarro ML et al. Long-term response to highly active antiretroviral therapy with lopinavir/ritonavir in pre-treated vertically HIV-infected children. *J Antimicrob Chemother.* 2008;61:183-90.

Lefrère J-J, Morand-Joubert L, Mariotti M, Bludau H, Burghoffer B, Petit J-C et al. Even individuals considered as long-term nonprogressors show biological signs of progression after 10 years of human immunodeficiency virus infection. *Blood.* 1997;90:1133-40.

Leigh-Brown AJ. Sequence variability of human immunodeficiency viruses: pattern and process in viral evolution. *AIDS.* 1991;supp.5s:35-42.

Levy JA, Hoffman AD, Kramer SM, Landis JA, Shimabukuro JM, Oshiro LS. Isolation of lymphocytopathic retroviruses from San Francisco patients with AIDS. *Science.* 1984;225:840-2.

Lifson JD, Feinberg MB, Reyes GR, Rabin L, Banapour B, Chakrabarti S et al. Induction of CD4-dependent cell fusion by the HTLV-III/LAV envelope glycoprotein. *Nature.* 1986;323:725-8.

Liu SL, Schacker T, Musey L, Shriner D, McElrath MJ, Corey L et al. Divergent patterns of progression to AIDS after infection from the same source: human immunodeficiency virus type 1 evolution and antiviral responses. *J Virol.* 1997;71:4284-95.

Louwagie J, McCutchan FE, Peeters M, Brennan TP, Sanders-Buel E, Eddy GA et al. Phylogenetic analysis of *gag* genes from 70 international HIV-1 isolates provides evidence for multiple genotypes. *AIDS.* 1993;7:769-80.

Marcelin AG, Delaugerre C, Wirden M, Viegas P, Simon A, Katlama C et al. Thymidine analogue reverse transcriptase inhibitors resistance mutations profiles and association to other nucleoside reverse transcriptase inhibitors resistance mutations observed in the context of virological failure. *J Med Virol.* 2004;72:162-5.

Marcelin AG, Flandre P, Pavie J, Schmidely N, Wirden M, Lada O et al. Clinically relevant genotype interpretation of resistance to didanosine. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49:1739-44.

Mariani R, Chen D, Schröfelbauer B, Navarro F, Köning R, Bollman B et al. Species-specific exclusion of APOBEC3G from HIV-1 virions by vif. *Cell.* 2003;114:21-31.

McConnell MS, Byers RH, Frederick T, Peters VB, Dominguez KL, Sukalac T et al. Trends in antiretroviral therapy use and survival rates for a large cohort of HIV-

infected children and adolescents in the United States, 1989-2001. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2005;38:488-94.

McCutchan FE. Global epidemiology of HIV. *J Med Virol.* 2006;78:S7-S12.

Menzo S, Castagna A, Monchetti A, Hasson H, Danise A, Carini E et al. Resistance and replicative capacity of HIV-1 strains selected in vivo by long-term enfuvirtide treatment. *New Microbiol.* 2004;27:51-61.

Michael NL. Host genetic influences on HIV-1 pathogenesis. *Curr Opin Immunol.* 1999;11:466-74

Miller CJ, Alexander NJ, Gettie A, Hendrickx AG, Marx PA. The effect of contraceptives containing nonxynol-9 on the genital transmission of simian immunodeficiency virus in rhesus macaques. *Fertil Steril.* 1992;57:1126-228.

Miller V, Ait-Khaled M, Stone C, Griffin P, Mesogiti D, Cutrell A et al. HIV-1 reverse transcriptase (RT) genotype and susceptibility to RT inhibitors during abacavir monotherapy and combination therapy. *AIDS.* 2000;14:163-71.

Mofenson L. Challenges in pediatric and adolescent HIV care. Program and abstracts of the 15th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections; Boston, Massachusetts; February 3-6, 2008. Abstract 47LB.

Montaner JS, Reiss P, Cooper D, Vella S, Harris M, Conway B et al. A randomized, double-blind trial comparing combinations of nevirapine, didanosine, and zidovudine for HIV-infected patients: The INCAS Trial. Italy, The Netherlands, Canada and Australia Study. *JAMA.* 1998;279:930-7.

Montavon C, Toure-Kane C, Lieggeois F, Mpoudi E, Bourgeois A, Vergne L et al. Most *env* and *gag* subtype A HIV-1 viruses circulating in West and West Central Africa are similar to the prototype AG recombinant virus IBNG. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2000;23:363-74.

Morgado MG, Guimarães ML, Gripp CBG, Neves Jr I, Costa CI, Santos VGV et al. High prevalence of HIV-1 subtype B and identification of an HIV-1 subtype D infection in the City of Rio de Janeiro, Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 1998;18:488-94.

Morgado MG, Sabino EC, Shpaer EG, Bongertz V, Brigido L, Guimarães MD et al. V3 region polymorphisms in HIV-1 from Brazil: prevalence of subtype B strains divergent from North American/European prototype and detection of subtype F. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 1994;10:569-76.

Motomura K, Kusagawa S, Kato K, Nohtomi K, Lwin HH, Tun KM et al. Emergence of new forms of human immunodeficiency virus type 1 intersubtype recombinants in central Myanmar. *AIDS Res Hum Retrovir.* 2000;17:1831-43.

Munn R, Marx PA, Yamamoto JK, Gardner MB. Ultrastructural comparison of the retroviruses associated with human and simian acquired immunodeficiency syndromes. *Lab Invest.* 1985;53:194-9.

Muthumani K, Choo AY, Zong WX, Madesh M, Hwang DS, Premkumar A et al. The HIV-1 Vpr and glucocorticoid receptor complex is a gain-of-function interaction that prevents the nuclear localization of PARP-1. *Nat Cell Biol.* 2006;8:170-9.

Myers G, Korber B, Wain-Hobson S. Human retroviruses and AIDS. A compilation and analysis of nucleic acid and amino acid sequences. Los Alamos, NM: Los Alamos National Laboratory, 1994.

Myers G, Macinnes K, Korber B. The emergence of simian/human immunodeficiency viruses. *AIDS Res Hum Retrovir.* 1992;8:373-86.

Myers G, Pavlakis GN. Evolutionary potential of complex retroviruses. In: Levy JA, editor. *The Retroviridae.* New York: Plenum Press; 1992. p.51-105.

Nájera I, Holguín A, Quiñones-Mateu ME, Munoz-Fernandez MA, Nájera R, López-Galíndez C et al. Pol gene quasispecies of human immunodeficiency virus: mutations associated with drug resistance in virus from patients undergoing no drug therapy. *J Virol.* 1995;69:23-31.

Nebbia G, Sabin CA, Dunn DT, Geretti AM. Emergence of the H208Y mutation in the reverse transcriptase (RT) of HIV-1 in association with nucleoside RT inhibitor therapy. *J Antimicrob Chemother.* 2007;59:1013-6.

Niehues T, Lyall H. Antiretroviral therapy in children. In: Hoffmann C, Rockstroh JK, Kamps BS editors. *HIV Medicine 2007.* Paris: Flying Publisher; 2007. p. 369-86. Disponível em <http://www.HIVMedicine.com>.

Osmanov S, Pattou C, Walker N, Schwardlander B, Esparza J, WHO-UNAIDS Network for HIV Isolation and Characterization. Estimated global distribution and regional spread of HIV-1 genetic subtypes in the year 2000. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2002;29:184-90.

Palella FJ Jr, Delaney KM, Moorman AC, Loveless MO, Fuhrer J, Satten GA et al. Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigators. *N Engl J Med.* 1998;338:853-60.

Pantaleo G, Graziosi C, Demarest JF, Butini L, Montroni M, Fox CH et al. HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinically latent stage of disease. *Nature.* 1993;362:355-8.

Parikh UM, Zelina S, Sluis-Cremer N, Mellors JW. Molecular mechanisms of bidirectional antagonism between K65R and thymidine analog mutations in HIV-1 reverse transcriptase. *AIDS.* 2007;21:1405-14.

Parslow TG. Post-transcriptional regulation of human retroviral gene expression. In:

- Cullen BR, editor. Human Retroviruses. Oxford: IRL Press; 1993. p.101-36.
- Paul ME, Mao C, Charurat M, Serchuck L, Foca M, Hayani K et al. Predictors of immunologic long-term nonprogression in HIV-infected children: implications for initiating therapy. *J Allergy Clin Immunol.* 2005;115:848-55.
- Peterlin BM, Adams M, Alonso A. Tat trans-activator. In: Cullen BR, editor. Human Retroviruses. Oxford: IRL Press; 1993.p.75-100.
- Pieniazek D, Rayfield M, Hu DJ, Nkengasong J, Wiktor SZ, Downing R et al. 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.* 2000;14:1489-95.
- Pliner V, Weedon J, Thomas PA, Steketee RW, Abrams EJ, Lambert G et al. Incubation period of HIV-1 in perinatally infected children. New York City Perinatal HIV Transmission Collaborative Study Group. *AIDS* 1998;12:759-66.
- Prasad VR, Goff SP. Linker insertion mutagenesis of human immunodeficiency virus reverse transcriptase expressed in bacteria: definition of the minimal polymerase domain. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1989;86:3104-8.
- Pomerantz RJ, Horn DL. Twenty years of therapy for HIV-1 infection. *Nat Med.* 2003;9:867-73.
- Quiñonez-Mateu ME, Albright JL, Mas A, Soriano V, Arts EJ. Analysis of *pol* gene heterogeneity, viral quasispecies, and drug resistance in individuals infected with group O strains of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol.* 1998;72:9002-15
- Richman DD, Guatelli JC, Grimes J, Tsiatis A, Gingeras TR. Detection of mutations associated with zidovudine resistance in human immunodeficiency virus by use of the polymerase chain reaction. *J Infect Dis.* 1991;164:1075-81.
- Roberts JD, Bebenek K, Kunkel TA. The accuracy of reverse transcriptase from HIV-1. *Science.* 1988;242:1171-3.
- Robertson DL, Anderson JP, Bradac JA, Carr JK, Foley B, Funkhouser RK et al. HIV-1 nomenclature proposal. *Science* 2000;288:55-6.
- Rubbert A, Behrens G, Ostrowski M. Pathogenesis of HIV-1 infection. In: Hoffmann C, Rockstroh JK, Kamps BS editors. *HIV Medicine* 2007. Paris: Flying Publisher; 2007. p. 59-86. Disponível em <http://www.HIVMedicine.com>.
- Saag MS, Emini EA, Laskin OL, Douglas J, Lapidus WI, Schleif WA et al. A short-term clinical evaluation of L-697,661, a non-nucleoside inhibitor of HIV-1 reverse transcriptase. L-697,661 Working Group. *N Engl J Med.* 1993;329:1065-72.
- Sabino EC, Shpaer EG, Morgado MG, Korber BT, Diaz RS, Bongertz V et al. Identification of human immunodeficiency virus type 1 envelope genes recombinant

between subtypes B and F in two epidemiologically linked individuals from Brazil. *J Virol.* 1994;68:6340-6.

Sáez-Ciri3n A, Lacabaratz C, Lambotte O, Versmisse P, Urrutia A, Boufassa F et al. HIV controllers exhibit potent CD8 T cell capacity to suppress HIV infection ex vivo and peculiar cytotoxic T lymphocyte activation phenotype. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007;104:6776-81.

Sanches M, Krauchenco S, Martins NH, Gustchina A, Wlodawer A, Polikarpov I. Structural characterization of B and non-B subtypes of HIV-protease: insights into the natural susceptibility to drug resistance development. *J Mol Biol.* 2007;369:1029-40.

Sandberg JK, Fast NM, Palacios EH, Fennelly G, Dobroszycki J, Palumbo P et al. Selective loss of innate CD4(+) V alpha 24 natural killer T cells in human immunodeficiency virus infection. *J Virol* 2002;76:7528-34.

Schinazi RF. Competitive inhibitors of human immunodeficiency virus reverse transcriptase. *Perspect Drug Dev Design.* 1993;1:151-80.

Schr3der AR, Shinn P, Chen H, Berry C, Ecker JR, Bushman F. HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots. *Cell.* 2002;110:521-9.

Scott-Algara D, Buseyne F, Porrot F, Corre B, Bellal N, Rouzioux C et al. Not all tetramer binding CD8+ T cells can produce cytokines and chemokines involved in the effector functions of virus-specific CD8+ T lymphocytes in HIV-1 infected children. *J Clin Immunol* 2005;25:57-67.

Shafer RW, Kantor R, Gonzales MJ. The genetic basis of HIV-1 resistance to reverse transcriptase and protease inhibitors. *AIDS Rev.* 2000;2:211-28.

Shafer RW, Rhee S-Y, Pillay D, Miller V, Sandstrom P, Schapiro JM et al. HIV-1 protease and reverse transcriptase mutations for drug resistance surveillance. *AIDS.* 2007;21:215-23.

Shearer WT, Quinn TC, LaRussa P, Lew JF, Mofenson L, Almy S et al. Viral load and disease progression in infants infected with human immunodeficiency virus type 1: Women and Infants Transmission Study Group. *N Engl J Med.* 1997;336:1337-42.

Sheehy AM, Gaddis NC, Choi JD, Malim MH. Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral vif protein. *Nature.* 2002;418:646-50.

Sherdlock DJ, Shen H. Requirement for CD4 T cell help in generating functional CD8 T cell memory. *Science.* 2003;300:337-9.

Simon F, Mauclore P, Roques P, Loussert-Ajaka I, M3ller-Trutwin C, Saragosti S et al. Identification of a new human immunodeficiency virus type 1 distinct from group M and group O. *Nat Med.* 1998;4:1032-7.

Simonetti SRR, Schatzmayr HG, Simonetti JP. Human Immunodeficiency Virus type 1: drug resistance in treated and untreated Brazilian children. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2003;98:831-7.

Soares EA, Martinez AM, Souza TM, Santos AF, Da Hora V, Silveira J et al. HIV-1 subtype C dissemination in southern Brazil. *AIDS*. 2005;19:81-6.

Soriano V. HIV drug resistance. XV International HIV Drug Resistance Workshop. June 13-17, 2006, Sitges, Spain.

Spira S, Wainberg MA, Loemba H, Turner D, Brenner BG. Impact of clade diversity on HIV-1 virulence, antiretroviral drug sensitivity and drug resistance. *J Antimicrob Chemother*. 2003;51:229-40.

Strebel K, Daugherty D, Clouse K, Cohen D, Folks T, Martin MA. The HIV "A" (sor) gene product is essential for virus infectivity. *Nature*. 1987;328:728-30.

Tantillo C, Ding J, Jacobo-Molina A, Nanni RG, Boyer PL, Hughes SH et al. 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* 1994;243:369-87.

Telesnitsky A, Goff SP. Reverse transcriptase and the generation of retroviral DNA. In: Coffin JM, editor. *Retroviruses*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1997.p.121-60.

Temin HM. Retrovirus variation and reverse transcription: abnormal strand transfers result in retrovirus genetic variation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993;90:6900-3.

The European Collaborative Study. Natural history of vertically acquired human immunodeficiency virus-1 infection. *Pediatrics*. 1994;94:815-9.

Tiemessen CT & Kuhn L. Immune pathogenesis of pediatric HIV-1 infection. *Curr HIV/AIDS Rep*. 2006;3:13-9.

Triques K, Bourgeois A, Vidal N, Mpoudi-Ngole E, Mulanga-Kabeya C, Nzilambi N et al. Near-full-length genome sequencing of divergent African HIV-1 subtype F viruses leads to the identification of a new HIV-1 subtype designated K. *AIDS Res Hum Retrovir*. 2000;16:139-51.

van de Vijver DA, Wensing AM, Angarano G, Asjo B, Balotta C, Boeri E et al. The calculated genetic barrier for antiretroviral drug resistance substitutions is largely similar for different HIV-1 subtypes. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2006;41:352-60.

van der Vliet HJ, von Blomberg BM, Hazenberg MD, et al. Selective decrease in circulating V alpha 24+ V beta 11+ NKT cells during HIV type 1 infection. *J Immunol*. 2002;168:1490-5.

Viganò A, Meroni L, Marchetti G, Vanzulli A, Giacomet V, Fasan S et al. Successful rescue therapy with a darunavir/ritonavir and etravirine antiretroviral regimen in a

child with vertically acquired multidrug-resistant HIV-1. *Antivir Ther.* 2008;13:839-43.

Yu OC, Matsuda Z, Yu X, Ito S, Essex M, Lee TH. An electron-lucent region within the virion distinguishes HIV-1 from HIV-2 and simian immunodeficiency viruses. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 1994;10:757-61.

Wahren B, Morfeldt-Mansson L, Biberfeld G, Moberg L, Sonnerborg A, Ljungman P et al. Characteristics of the specific cell-mediated immune response in human immunodeficiency virus infection. *J Virol.* 1987;61:2017-23.

Wain-Hobson S. Human immunodeficiency virus type 1 quasispecies in vivo and ex vivo. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1992;176:181-93.

Wang FX, Kimura T, Niihara K, Yoshimura K, Koito A, Matsushita S. Emergence of autologous neutralization-resistant variants from preexisting human immunodeficiency virus (HIV) quasi species during virus rebound in HIV type 1-infected patients undergoing highly active antiretroviral therapy. *J Infect Dis.* 2002;185:608-17.

Weller I, Costagliola D, Ledergerber B, Lundgren J, Chene G, Touloumi G et al. Response to combination antiretroviral therapy: variation by age. *AIDS.* 2008;22:1463-73.

Whitcomb JM, Parkin NT, Chappey C, Hellmann NS, Petropoulos CJ. Broad nucleoside reverse-transcriptase inhibitor cross-resistance in human immunodeficiency virus type 1 clinical isolates. *J Infect Dis.* 2003;188:992-1000.

WHO Network for Isolation and Characterization. HIV type 1 variation in World Health Organization-sponsored vaccine evaluation sites: genetic screening, sequence analysis, and preliminary biological characterization of selected viral strains. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 1994;10:1327-43.

Winters MA, Shafer RW, Jellinger RA, Mmtora G, Gingeras T, Merigan TC. 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.* 1997;41:757-62.

Wong-Staal F. HIVs and their replication. In: Fields BN, Knipe DM, editors. *Fundamental Virology.* New York: Raven Press; 1991.

Zhang H, Dornadula G, Wu Y, Havlir D, Richman DD, Pomerantz RJ. Kinetic analyses of intravirion reverse transcription in the blood plasma of human immunodeficiency virus type 1-infected individuals: Direct assessment of resistance to reverse transcriptase inhibitors in vivo. *J Virol.* 1996;70:628-34.

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](#)