

PAULA MORENA DE SOUZA GUIMARÃES

Avaliação do perfil de resistência aos antirretrovirais em
crianças e adolescentes infectados pelo HIV-1

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós- Graduação em
Ciências da Coordenadoria de
Controle de Doenças da Secretaria
de Estado da Saúde de São Paulo,
para a obtenção do Título de Mestre
em Ciências.

Área de Concentração: Pesquisas
Laboratoriais em Saúde Pública

Orientador: Prof. Dr. Luis Fernando
de Macedo Brígido

São Paulo

2015

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pelo Centro de Documentação – Coordenadoria de Controle de Doenças/SES-SP

©reprodução autorizada pelo autor, desde que citada a fonte

Guimarães, Paula Morena de Souza.

Avaliação do perfil de resistência aos antirretrovirais em crianças e adolescentes infectados pelo HIV-1 / Paula Morena de Souza Guimarães. – 2015.

Dissertação (Mestrado em Ciências) - Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças, São Paulo, 2015.

Área de concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública.

Orientação: Prof. Dr. Luis Fernando de Macedo Brígido.

1. HIV-1/classificação. 2. Terapia Antirretroviral de Alta Atividade/tendências. 3. Resistência Viral a Fármacos/genética. 4. Crianças. 5. Adolescentes. 6. Mutação/efeitos de drogas

SES/CCD/CD-319/2015

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Ana Maria e José Luiz, por todo o carinho, paciência, apoio, compreensão e incentivo.

À minha irmã Talita Guimarães, pelo carinho, conselhos e pelo companheirismo.

Ao meu orientador Prof. Luis Fernando de Macedo Brígido, pelos ensinamentos, compreensão e incentivo.

Ao Dr. Alexandre Ely Campeas, do Instituto de Infectologia Emílio Ribas, pela colaboração, dedicação e pelos ensinamentos.

À Jaqueline Cavalcanti e Gabriela Cabral, pela amizade, paciência, companheirismo e apoio nas horas difíceis, além do auxílio com as correções e sugestões.

A todo o grupo do Laboratório de Retrovírus do Instituto Adolfo Lutz, pela paciência, compreensão e pelo auxílio na realização deste trabalho.

RESUMO

Crianças e adolescentes em uso de terapia antirretroviral de alta atividade (HAART) caracterizam um grupo especialmente vulnerável no contexto da epidemia pelo HIV-1. Isso se deve a questões biológicas e a diferentes aspectos sócio-comportamentais, como os relacionados à adesão à HAART. Estas limitações podem levar à falha a terapia, sendo os testes de genotipagem de potencial utilidade para subsidiar a conduta clínica na troca da medicação. O presente estudo tem como objetivo avaliar os genes da protease e transcriptase reversa em crianças e adolescentes vivendo com HIV/aids. Foi realizada uma análise retrospectiva, no período de 2010 a 2014, de amostras de pacientes *naives* e de pacientes expostos aos antirretrovirais (ARV) e em falha virológica. A resistência genotípica foi definida a partir dos algoritmos de Stanford. Os dados clínicos e laboratoriais foram obtidos através de ficha clínica ou pelos médicos dos pacientes. A taxa de resistência transmitida entre os pacientes *naives* (n=46) foi de 8,6%, de acordo com algoritmo CPR, e de 37% considerando as mutações analisadas pelo GRI-HIVdb. Entre os pacientes em falha virológica (n=160), foi observada uma elevada prevalência (28%) de resistência às três classes de ARV, inclusive para os ARV de segunda geração como o tipranavir (17%), darunavir (37%) e etravirina (30%). Na região da protease, foi observada uma prevalência de resistência significativamente maior aos IP de primeira geração no subtipo F em comparação ao subtipo B ($p < 0,05$). Entre pacientes com mais de uma genotipagem em nosso laboratório (n=59), a maioria (61%) apresentou declínio de células TCD4⁺ e apenas uma parte destes (30%) conseguiu uma redução na carga viral acima de 1 log₁₀. Entre os pacientes expostos às três classes com mais de uma entrada (n=27), não houve aumento de mutação para essas classes em relação a genotipagem imediatamente anterior. A alta proporção de resistência aos IP em subtipos F observada nesse estudo sugere que o uso dos IP deve ser avaliado levando em consideração o possível impacto na resposta terapêutica. Os dados desse estudo demonstram uma taxa intermediária de resistência transmitida

e uma elevada proporção de casos com resistência entre os pacientes em falha, embasa a noção de que esta população representa um segmento de risco para a evolução da doença.

Palavras chave: HIV-1, terapia antirretroviral de alta atividade, mutação, resistência viral a fármacos, crianças, adolescentes.

ABSTRACT

Children and adolescents on highly active antiretroviral therapy (HAART) represents a vulnerable group in the context of the HIV-1 epidemic, due to biological issues and different socio-behavioral aspects such as those related to adherence to HAART. Those limitations may favor the therapy failure, and genotyping test may be useful to support clinical management. This study aims to evaluate the protease and reverse transcriptase genes in children and adolescents living with HIV/aids. A retrospective analysis was made, in samples collected from naïve patients and patients exposed to antiretrovirals (ART) with virological failure, during the period of 2010 to 2014. Genotypic resistance was evaluated using Stanford algorithms. Clinical and laboratorial data were obtained from clinical records or by the patient clinician. The rate of transmitted resistance among naïve patients (n=46) was 8.6% according to CPR algorithm, and of 37% considering mutations of GRI-HIVdb analysis. Among patients exposed to ARV with virological failure, a high prevalence (28%) of resistance to the three ART classes was observed, including for second generation ART, such as tipranavir (17%), darunavir (37%) and etravirina (30%). In the protease region, we observed a higher prevalence of resistance to first generation IP class ART in subtype F samples, when compared to subtype B ($p < 0.05$). Among patients with more than one genotyping test in our laboratory (n=59), most of them (61%) showed decline on T CD4⁺ cells values, and a small (30%) proportion reached viral load above 1 log₁₀. Among patients exposed to the three ART classes with more than one genotyping test (n=27), mutations prevalence seemed to not increase when we compared with the previous genotyping test, however most of patients samples showed resistance to the main ART available for use. The high proportion of resistance to IP among subtype F suggests that in these cases, the IP administration should be evaluated considering a possible impact on therapeutic response. Our results showed an intermediate rate of transmitted resistance e a high proportion of resistance among

patients with virological failure, supporting the fact that this population represents more risk to disease progression.

Keywords: HIV-1, highly active antiretroviral therapy, mutation, antiviral drug resistance, children, adolescents

LISTA DE ABREVIATURAS

µg	Micrograma (10^{-6} Grama)
µL	Microlitro (10^{-6} Litro)
3TC	Lamivudina
ABC	Abacavir
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
ARV	Antirretroviral
ATV	Atazanavir
AZT	Zidovudina
T CD4 ⁺	Linfócito T auxiliar
CDC	Centro de Controle de Doenças e Prevenção
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
cel/mm ³	Células por milímetro cúbico
CPR	Calibrated Population Resistance
CRF	Circulant Recombinant Form
D4T	Estavudina
DDI	Didanosina
ddNTP	Dideoxirribonucleosídeo trifosfatado
DNA	Ácido desoxirribonucléico

DNase	Desoxirribonuclease
dNTP	Deoxirribonucleosídeo trifosfatado
ddNTP	Dideoxirribonucleosídeo trifosfatados
DRV	Darunavir
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ácido etilenediaminetetracético
EFV	Efavirenz
ENV	Envelope viral
ETV	Etravirina
FTC	Emtricitabina
gp	Glicoproteína
GRI-HIVdb	<i>Genotype Resistance Interpretation – HIV Drug Resistance database</i>
HAART	<i>Highly active antiretroviral therapy - Terapia Antirretroviral de Alta Atividade</i>
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IP	Inibidor de Protease
LPV	Lopinavir
LTR	Long Terminal Repeats
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio

mL	Mililitro (10^{-3} Litro)
NCBI	Centro Nacional para Informação Biotecnológica
NEF	Fator de regulação negativa
NFV	Nelfinavir
nm	Nanômetro
ITRNN	Inibidor de Transcriptase Reversa Não-análogo de Nucleosídeo
ITRN	Inibidor de Transcriptase Reversa Análogo de Nucleosídeo
NVP	Nevirapina
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico
PCR	Reação em cadeia da polimerase
POL	Polimerase
PT	Protease
REV	Regulador da expressão de proteínas virais
RNA	Ácido ribonucléico
RNAse	Ribonuclease
RT	Transcriptase Reversa
RT-PCR	Retrotranscrição e Reação em Cadeia da Polimerase
SQV	Saquinavir
TAT	<i>Trans-ativador</i> transcricional

TAM	<i>Thymidine Analogue Mutations</i>
T-20	Enfuvirtide
TBE	Tris, Ácido Bórico, EDTA
TDF	Tenofovir
TPV	Tipranavir
U	Unidade
URF	Unique Recombinant Form
V	Volts
VIF	Fator de infectividade viral
VPR	Proteína viral R
VPU	Proteína viral U
Vírus R5	Vírus com tropismo pelo co-receptor CCR5
Vírus X4	Vírus com tropismo pelo co-receptor CXCR4

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura esquemática do HIV	19
Figura 2: Organização genômica do HIV	20
Figura 3: Etapas da replicação do HIV mostrando as enzimas envolvidas durante este processo	22
Figura 4: Distribuição global dos subtipos e formas recombinantes do HIV-1	25
Figura 5: Estudos de resistência aos antirretrovirais em populações pediátricas infectadas pelo HIV-1, categorizados de acordo com o tamanho da amostragem	37
Figura 6: Representação esquemática da população de estudo	51
Figura 7: Frequência de resistência à classe dos ITRNs, corrigida por exposição, em amostras de pacientes em falha virológica	55
Figura 8: Frequência de resistência à classe dos ITRNNs, corrigida por exposição, em amostras de pacientes em falha virológica	56
Figura 9: Frequência de resistência à classe dos IPs, corrigida por exposição, em amostras de pacientes em falha virológica	56
Figura 10: Relação entre a redução da carga viral e do aumento ou declínio de células TCD4 ⁺ observado entre a amostra desfecho e a primeira amostra de 59 pacientes em falha virológica	57
Figura 11: Frequência de resistência à classe dos ITRNs, corrigida por exposição, na primeira amostra de pacientes em falha virológica	58
Figura 12: Frequência de resistência à classe dos ITRNNs, corrigida por exposição, na primeira amostra de pacientes em falha virológica	59

Figura 13: Frequência de resistência à classe dos IPs, corrigida por 59
exposição, na primeira amostra de pacientes em falha virológica

Figura 14: Frequência das mutações associadas aos ITRNs em 61
amostras de pacientes expostos aos ITRNs, ITRNNs e IPs em falha
viroológica

Figura 15: Frequência das mutações associadas aos ITRNNs em 62
amostras de pacientes expostos aos ITRNs, ITRNNs e IPs em falha
viroológica

Figura 16: Frequência das mutações associadas aos IPs em amostras 62
de pacientes expostos aos ITRNs, ITRNNs e IPs em falha virológica

Figura 17: Frequência de resistência aos IPs entre os subtipos virais B 63
e F de amostras de pacientes em falha virológica

Figura 18: Frequência das mutações principais associadas aos IPs 65
entre os subtipos virais B e F na região da protease de amostras de
pacientes em falha virológica

Figura 19: Frequência das mutações secundárias associadas aos IPs 65
entre os subtipos virais B e F na região da protease de amostras de
pacientes em falha virológica

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** *Primers* utilizados para a amplificação e sequenciamento do gene da protease e transcriptase reversa 47
- Tabela 2.** Sequências de pacientes *naives* com presença de mutações associadas à resistência aos ITRNs, ITRNNs e IPs, de acordo com os algoritmos de Stanford: Calibrated Population Resistance (CPR) e Genotype Resistance Interpretation (GRI-HIVdb) 53
- Tabela 3.** Dados clínicos e laboratoriais de pacientes em falha virológica, classificados de acordo com o subtipo viral da amostra 64

ÍNDICE

1. Introdução	18
1.1. Epidemia	18
1.2. O vírus e o ciclo replicativo	19
1.3. Epidemiologia molecular do HIV	23
1.4. Transmissão do HIV-1 em crianças	25
1.5. Curso da infecção pelo HIV-1 e progressão da doença	26
1.6. Terapia antirretroviral	28
1.6.1. Terapia antirretroviral em crianças	34
1.6.2. Resistência transmitida e adquirida	36
1.6.3. Adesão	39
2. Objetivos	42
2.1. Objetivo geral	
2.2. Objetivos Específicos	42
3. Material e Métodos	43
3.1. População do estudo	43

3.1.1. Pacientes <i>naives</i> aos ARV	43
3.1.2. Pacientes expostos aos ARV e em falha virológica	43
3.1.2.1. Avaliação da evolução imunológica e virológica	44
3.1.2.2. Avaliação do perfil mutacional	44
3.1.4. Aspectos Éticos	44
3.2. Técnicas Laboratoriais	45
3.2.1. Coleta e processamento amostras	45
3.2.2. Extração do RNA e DNA viral	45
3.2.3. Quantificação da carga viral e células T CD4 ⁺	46
3.2.4. Retrotranscrição e amplificação dos genes da protease e transcriptase reversa	46
3.2.5. Reação de sequenciamento genético	48
3.3. Análise molecular	49
3.4. Análises estatísticas	50
4. Resultados	50
4.1. População de estudo	50
4.2. Pacientes <i>naives</i> aos ARV	51
4.3. Pacientes expostos aos ARV e em falha virológica	54

4.3.1. Susceptibilidade aos antirretrovirais	54
4.3.2. Evolução imunológica e virológica	56
4.3.3. Mutações associadas à resistência aos ARV	58
4.3.4. Perfis de resistência no gene da protease em subtipos B e F	63
5. Discussão	66
6. Conclusão	74
7. Referências Bibliográficas	75
Anexos	

1. INTRODUÇÃO

1.1. Epidemia

O Vírus da Imunodeficiência Adquirida (HIV), agente etiológico da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (aids), é considerado como um dos maiores problemas em saúde pública devido à sua grande disseminação pelo mundo, e ao impacto na saúde decorrente da imunossupressão que pode ser causada pela aids.

Apesar da cura ainda não ter sido descoberta, a ampliação do acesso à terapia antirretroviral altamente ativa (HAART, do inglês Highly Active Anti-Retroviral Therapy), em conjunto com os programas de prevenção e conscientização permitiram com que a infecção pelo HIV-1 se tornasse controlável, de forma que os números de casos de aids e de óbitos relacionados à doença decaíssem ao longo do tempo.

Estima-se que até dezembro 2012 aproximadamente 35 milhões de pessoas conviviam com HIV no mundo e 2,3 milhões foram infectados pelo vírus, o que representa um declínio de 33% em relação aos 3,4 milhões de casos novos notificados em 2001. Também se observa um decréscimo no número de óbitos relacionados à aids, de 2,3 milhões em 2005 para 1,6 milhões em 2012. Em crianças a prevalência de novos casos reduziu em 52% desde 2001, chegando a 260 mil casos em 2012 (UNAIDS/WHO, 2013).

No Brasil, desde 2002 verifica-se um declínio dos casos de aids em menores de 15 anos, sendo que nos últimos anos têm sido observado uma tendência de estabilização, ocorrendo em torno de 500 casos/ano em menores de 5 anos de idade e em média de 200 casos/ano em crianças na faixa etária de 5 a 14 anos (Brasil, 2014a).

A implantação de medidas de prevenção da transmissão vertical foi primordial para alcançar um patamar estável na epidemia do HIV na população pediátrica (Brasil, 2014b).

1.2. O vírus e o ciclo replicativo

O HIV é um retrovírus, pertencente à família Retroviridae e ao gênero Lentivirus (WHO, 2002). Possui aproximadamente 100 – 120 nm de diâmetro, e é envolvido por uma bicamada lipídica derivada das proteínas celulares do hospedeiro (Sierra et al., 2005). Este envoltório contém cerca de 70 espículas, sendo que cada espícula é constituída por duas glicoproteínas do envelope viral: a gp120 e a gp41 (McCune et al., 1988).

O nucleocapsídeo (p24) contém o material genético (constituído por duas fitas simples de RNA de aproximadamente 9,8 Kb cada), proteínas (p7, p9) e as enzimas virais protease (p10), transcriptase reversa (p64) e integrase (p32) (Sierra et al., 2005) (Figura 1).

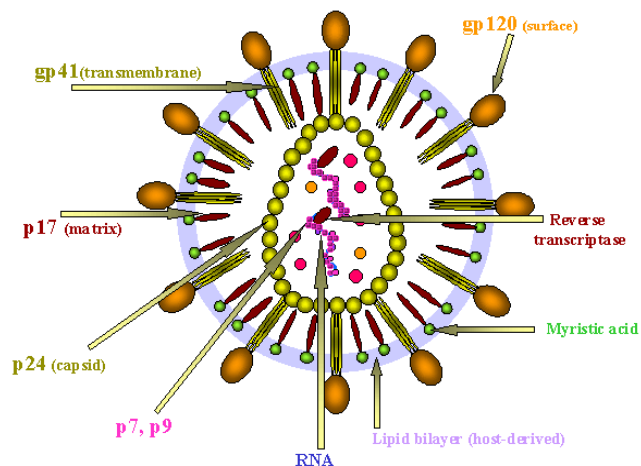


Figura 1: Estrutura esquemática do HIV-1, demonstrando as glicoproteínas de superfície (gp120) e transmembrana (gp41), as proteínas do nucleocapsídeo (p7, p9), do capsídeo (p24), da matriz (p17), e as enzimas virais transcriptase reversa associadas com o RNA viral.

Fonte: Microbiology and Immunology on line – University of South Carolina – School of Medicine. Virology – Chapter 7 – Part 9 – Human Immunodeficiency Virus and AIDS.

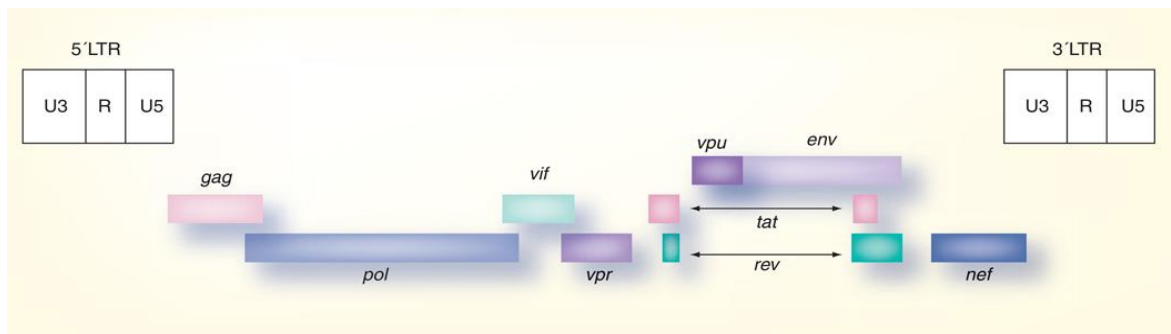


Figura 2: Organização genômica do HIV, demonstrando os genes estruturais (*gag*, *pol* e *env*), os genes acessórios (*nef*, *vpr*, *vif* e *vpu*), os genes regulatórios (*tat* e *rev*) e as regiões de Long Terminal Repeats (LTRs) nas posições 5' e 3'. Fonte: McBurney & Ross, 2008.

O genoma do HIV-1 é composto por três genes estruturais (*gag*, *pol*, *env*), quatro genes acessórios (*nef*, *vpr*, *vif*, *vpu*) e dois regulatórios (*tat* e *rev*) (Figura 2). Os genes estruturais são responsáveis por codificar proteínas envolvidas na formação do core viral, na etapa de ligação e fusão do vírus na célula hospedeira. Além disso, estão envolvidos na produção de enzimas responsáveis pela transcrição do RNA viral em DNA, integração no genoma do hospedeiro, maturação do vírion e pela replicação viral (WHO, 2002).

Os genes acessórios e regulatórios apresentam funções relacionadas com a replicação viral como, por exemplo, estimular ativamente a transcrição do RNA, regular negativamente as respostas de células T e macrófagos, promover a infectividade viral e aumentar a liberação de partículas virais da célula infectada (WHO, 2002).

Além dos nove genes que compreendem o genoma do HIV-1, existem regiões localizadas nas extremidades 5' e 3' das moléculas de RNA, denominadas "Long Terminal Repeats (LTRs)". Estas regiões constituem sítios de ligação para a síntese de RNA viral e também são necessárias para a integração viral no genoma do hospedeiro (Levinson & Jawetz, 2005).

A primeira etapa da infecção viral consiste na ligação da gp120 com o receptor celular T CD4⁺, presente em grande maioria nos linfócitos T auxiliares, mas também encontrado nas células dendríticas e nos macrófagos (Clapham & McKnight, 2001). Nesse processo, a glicoproteína de superfície pode ter sua configuração alterada, o que possibilita sua ligação com o co-receptor celular CCR5 ou CXCR4 (Rizzuto et al., 1998). Essa interação é seguida por mudanças conformacionais que permitem a exposição da gp41 (domínio transmembrana), iniciando o processo de fusão do envelope viral com a membrana celular (Doms & Moore, 2000).

Com a fusão do vírion, o core viral é introduzido no citoplasma celular, e tem início a etapa de retrotranscrição do RNA viral em DNA proviral, pela ação da enzima transcriptase reversa. O DNA proviral fita dupla é transportado para o núcleo celular, e inserido no genoma da célula hospedeira por meio da enzima integrase. Após a integração, o DNA proviral é transcrito pela RNA polimerase II, e as poliproteínas virais precursoras *gag-pol* são clivadas pela enzima protease, e transportadas juntamente com o RNA viral para a membrana celular, originando uma nova partícula viral. (Sierra et al., 2005). A partir de então, as partículas virais passam a ser produzidas ativamente, podendo ser geradas mais de 10⁹ partículas por dia (WHO, 2002).

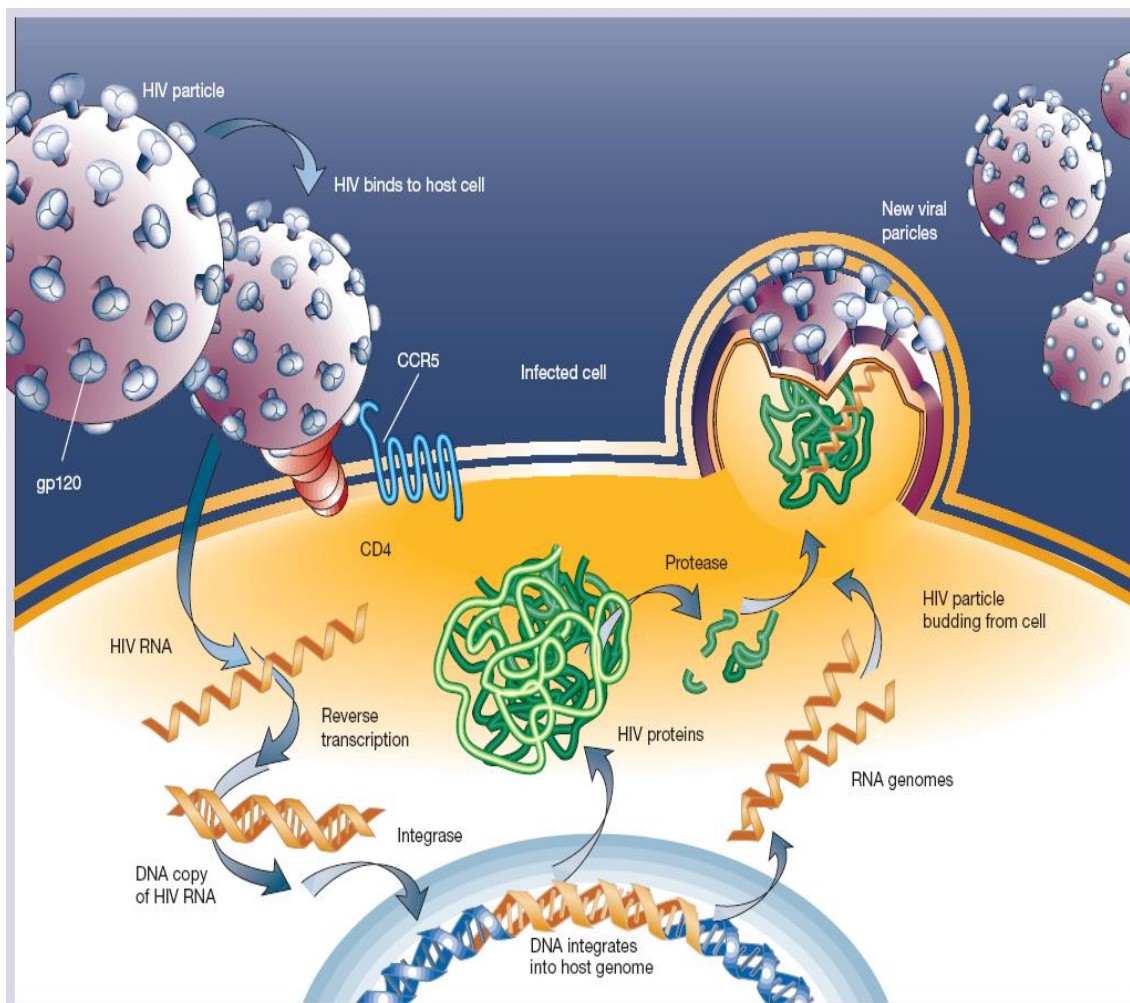


Figura 3. Etapas da replicação do HIV mostrando as enzimas envolvidas durante este processo (Weiss, 2001)

Além de apresentar uma alta infectividade e capacidade replicativa, o HIV é caracterizado pela capacidade de produzir variantes virais com grande diversidade genética e potencial de recombinação. Essas características são conduzidas principalmente pela enzima Transcriptase Reversa, que não apresenta ação corretiva e gera erros durante a etapa de transcrição, conferindo uma alta taxa de mutação ao vírus (WHO, 2002).

1.3. Epidemiologia molecular do HIV

O HIV é classificado em dois grandes grupos, o HIV-1 e HIV-2. O HIV-1 é o responsável pela pandemia global, enquanto a circulação do HIV-2 é mais restrita à África Ocidental. Dentre os quatro diferentes subgrupos (M, N, O e P) descritos do HIV-1, o subgrupo M é o que predomina na circulação global. (Los Alamos HIV Sequence Database; URL: <http://www.hiv.lanl.gov/>)

O grupo M é dividido em nove subtipos geneticamente distintos (A-D, F-H, J e K) e mais de 70 formas recombinantes circulantes (do inglês CRF – *Circulating Recombinant Form*) (Los Alamos HIV Sequence Database; URL: <http://www.hiv.lanl.gov/>). A variação genética dentro do mesmo subtipo pode variar de 15 a 20%, e de 25 a 35% entre subtipos (Korber et al., 2001).

Com as técnicas atuais de sequenciamento genético é possível classificar os subtipos e CRFs do HIV-1 considerando todas as regiões genômicas do vírus, permitindo também a identificação de formas recombinantes únicas (do inglês URF – *Unique Recombinant Form*). As URFs são definidas dessa forma quando ainda não foram estabelecidas na circulação, sendo necessário três ou mais indivíduos não relacionados epidemiologicamente, para a variante viral ser classificada como uma CRF. (Lau & Wong, 2013; Taylor et al., 2008)

Globalmente, CRFs e URFs constituem aproximadamente 20% dos casos de infecção pelo HIV-1 e grande maioria se encontra representada na África Central, destacando-se o CRF01_AE, CRF_02AG e CRF_07BC (Hemelaar et al., 2011; Lau & Wong, 2013). O subtipo C predomina na epidemia e corresponde a aproximadamente 50% dos casos, com ampla distribuição nas regiões leste e sul da África e também na Índia. Na Europa oriental e na Ásia central predomina o subtipo A (12%), enquanto que na América do norte, América latina, Austrália, e na Europa central e ocidental a prevalência é do subtipo B (11%) (Hemelaar et al., 2011) (Figura 3)

Assim como em países da Europa e da América do norte, no Brasil predomina a circulação dos subtipos B, mas também se observa os subtipos

F e C e as CRFs BF e BC (Morgado et al., 1994, Sabino et al., 1994; Bongertz et al., 2000, Vicente et al., 2000, Brígido et al., 2005; Brígido et al., 2007).

Em crianças e adolescentes poucos estudos foram realizados para determinar a distribuição dos subtipos do HIV-1 e avaliar a influência desta diversidade genética na resposta clínica e no desenvolvimento de resistência aos ARV. Embora a prevalência de subtipos e CRFs descrita na população pediátrica seja similar à observada em adultos, alguns estudos demonstram que recombinantes BF são encontrados em maior frequência quando duas ou mais regiões genômicas são analisadas em conjunto. (Brindeiro et al., 2002; Machado et al., 2004; de Oliveira et al., 2008; Taylor et al., 2008, Sanabani et al., 2013)

A relação entre diferentes subtipos com a progressão para aids e com a seleção de polimorfismos associados à resistência são questões que não estão completamente elucidadas (Lessells et al., 2012; Taylor et al., 2008).

O constante aparecimento de novas variantes virais torna a compreensão dessa dinâmica cada vez mais complexa e ao mesmo tempo necessária para o monitoramento da resistência aos ARV, desenvolvimento de novas drogas e estratégias de tratamento.

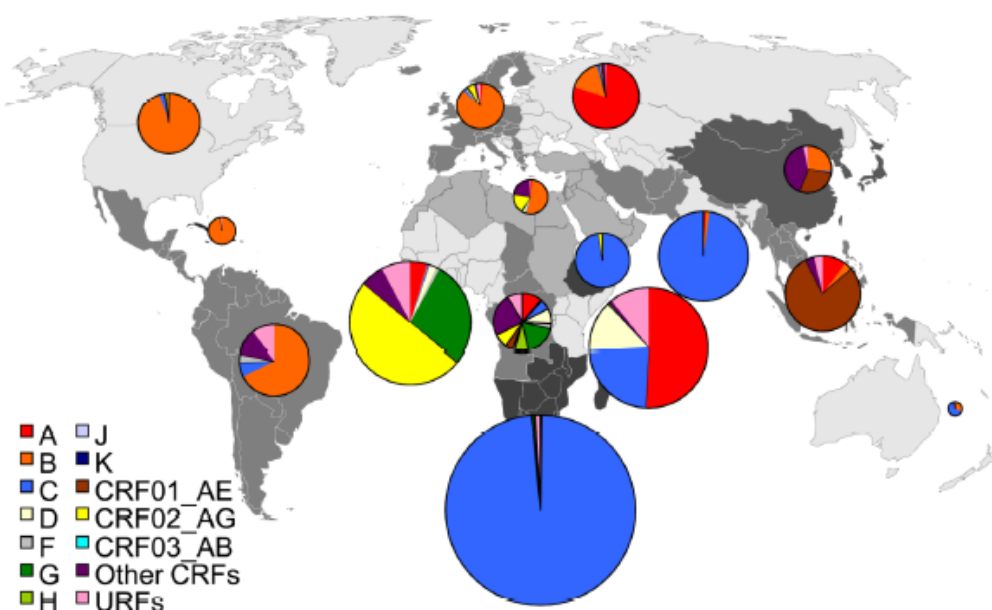


Figura 4. Distribuição global dos subtipos e formas recombinantes do HIV-1 no período de 2004 a 2007 (Hemelaar et al., 2011).

1.4. Transmissão do HIV em crianças

O HIV pode ser transmitido por via sexual, transfusão sanguínea, compartilhamento de agulhas contaminadas (usuários de drogas injetáveis) e em populações pediátricas, a principal via de transmissão é a vertical (Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. Disponível em: <http://www.aids.gov.br>)

A transmissão vertical do HIV é considerada a principal via de transmissão em crianças menores de 13 anos, onde aproximadamente 75% dos casos sem intervenção terapêutica ocorrem no momento do parto e 25% durante a gestação (intra-utero), com um risco adicional variando de 14 a 22% por meio da amamentação (Brasil, 2010).

Com o objetivo de reduzir os índices de transmissão vertical, o uso da HAART e de outras medidas profiláticas passaram a ser recomendadas para a gestante e ao recém-nascido, tais como: o diagnóstico precoce no pré-

natal, a programação da melhor via de parto, a introdução de testes rápidos para detecção do HIV nas maternidades e a contra-indicação do aleitamento materno. Essas medidas permitiram alcançar um controle nas taxas de transmissão vertical, considerada atualmente como 98% prevenível (Brasil, 2014b)

1.5. Curso da infecção pelo HIV e progressão da doença

Em adultos, o curso da infecção pelo HIV pode ser dividido em quatro fases: fase aguda, fase assintomática (latência clínica), fase sintomática e aids.

A fase aguda da infecção é caracterizada por um pico de viremia plasmática devido à intensa replicação viral e ao rápido declínio de células T CD4⁺, porém transitório. Após um período de incubação de aproximadamente 14 dias, cerca de 50 a 90% dos indivíduos infectados apresentam sintomas leves derivados da Síndrome Retroviral Aguda, como febre, mialgia e mal estar, que podem ser confundidos com uma gripe comum e dificultar o diagnóstico precoce do HIV. (Schacker et al., 1996; Pilcher et al., 2004; Brasil, 2013).

A fase assintomática (latência clínica), se inicia um ou dois meses após a infecção, período que pode durar em média de 8 a 10 anos (Pizzo et al., 1995) e no qual se observa a formação de resposta imune específica e um decréscimo de 100 a 1000 vezes nos valores da viremia plasmática, atingindo níveis estáveis (Bagnarelli et al., 1994). Contudo, a replicação viral se mantém constante nos linfonodos e a contagem de células T CD4⁺ decresce continuamente, comprometendo o sistema imunológico do paciente e facilitando o aparecimento de doenças infecciosas (fase sintomática) (Sierra et al., 2005). Com a diminuição expressiva das células T

CD4⁺ a fase definidora da aids se estabelece, sendo caracterizada por doenças oportunistas e neoplasias malignas (Brasil, 2013).

Em crianças infectadas pelo HIV por transmissão vertical, a história natural da infecção apresenta diferenças em relação ao observado em adultos. Na fase aguda, a viremia plasmática aumenta rapidamente, atingindo um pico virêmico de 10⁵ a 10⁷ cópias/mL de RNA nas primeiras semanas de vida que decresce lentamente (de 10 a 100 vezes) até os 24 meses, devido à imaturidade do sistema imunológico em controlar a infecção (De Rossi et al., 1996; Shearer et al., 1997; Tiemessen et al., 2006). Além disso, a fase de latência é mais curta, durando em média de 2 a 4 anos (Pizzo et al., 1995).

Aproximadamente 20% das crianças infectadas desenvolvem sintomas relacionados à aids nos primeiros dois anos de vida e apresentam uma menor sobrevida (Pizzo et al., 1995; Ortigão-de-Sampaio et al., 1997). Alguns estudos demonstram que os níveis de viremia nos primeiros meses de vida (De Rossi et al., 1996) e o momento da infecção (Luzuriaga et al., 1993) podem prever a progressão da doença. Recém-nascidos infectados durante o período de gestação (intra-útero) apresentam níveis de viremia significativamente maiores nos primeiros meses de vida do que recém-nascidos infectados durante o parto (no momento do parto ou na amamentação) (Pizzo et al., 1995; Shearer et al., 1997).

De Rossi e colaboradores (1996) observaram diferentes padrões de replicação viral em progressores rápidos e lentos. Crianças com severa imunodepressão ou sintomas relacionados à aids nos primeiros 6 meses de vida, tiveram um rápido aumento da viremia plasmática no primeiro mês, seguido de uma estabilização em níveis elevados após o terceiro mês, e um declínio dramático de células T CD4⁺, sendo definidos como progressores rápidos. Em progressores lentos foram observados padrões distintos de replicação, apresentando menores níveis de viremia, rápida estabilização e recuperação de células T CD4⁺.

Shearer e colaboradores (1997) demonstraram que crianças que apresentaram nos primeiros 18 meses de vida, um ou mais sinais/sintomas clínicos descritos como categoria C do CDC (Anexo 1), tiveram uma viremia significativamente mais alta em todas as mensurações realizadas nos primeiros 24 meses de vida, quando comparado ao grupo controle. Esse dado demonstra que crianças que permanecem com carga viral alta nos primeiros dois anos de vida, progredem mais rapidamente para a aids.

Um outro fator relacionado com a progressão da doença é o fenótipo viral. Sabe-se que as cepas virais com tropismo CCR5 não são indutoras de sincício (NSI) e predominam no início da infecção viral, independente da via de transmissão e do perfil fenotípico viral adquirido (Van't Wout et al., 1994), enquanto que variantes virais com tropismo CXCR4 são indutoras de sincício (IS) e estão associadas à depleção de células T CD4⁺ e uma progressão mais rápida da doença (Koot et al., 1993). Segundo Kopka e colaboradores (2002), existe uma associação significativa entre a presença de variantes indutoras de sincício (CXCR4) e uma menor contagem de células T CD4⁺, maior taxa de replicação viral e progressão mais rápida para a aids em crianças no primeiro ano de vida. Em um estudo recente de Almeida e colaboradores (2014), baseado em predição genotípica do tropismo viral, também se observou uma forte associação entre variantes com tropismo X4, com uma menor contagem de células T CD4⁺ (abaixo de 200 céls/mm³) e estágios mais avançados da doença.

1.6. Terapia antirretroviral

Em 1987, foi aprovado para uso clínico o primeiro antirretroviral (ARV) para o tratamento do HIV, o AZT (Fischl et al., 1987). Com o desenvolvimento de novos antirretrovirais (ARV) nos anos seguintes, o tratamento passou a ser composto por dois medicamentos (terapia dupla) (Potthoff & Brockmeyer, 2009).

A partir de 1995, com a introdução de medicamentos de novas classes farmacológicas foi estabelecida a terapia HAART, que possibilitou alcançar a supressão viral e uma melhora do estado clínico e imunológico dos pacientes (Potthoff & Brockmeyer, 2009). Em 1996, os medicamentos ARV passaram a ser oferecidos gratuitamente no Brasil, quando foi publicada a lei nº 9.313/96 (Brasil, 1996).

Atualmente, há pelo menos 25 medicamentos ARV aprovados pela Food and Drug Administration (FDA) para o tratamento do HIV. As classes farmacológicas mais utilizadas são os Inibidores de Transcriptase Reversa análogos de Nucleosídeos ou Nucleotídeos (ITRN), Inibidores de Transcriptase Reversa Não-análogos de Nucleosídeos (ITRNN) e os Inibidores de Protease (IP), indicados para uso em esquemas de primeira e segunda linha.

Contudo, um dos grandes problemas enfrentados no tratamento do HIV é a falha virológica, caracterizada pela presença de carga viral detectável (Brasil, 2013). Existem diversos fatores associados à falha virológica, dentre eles estão:

- A baixa adesão decorrente de reações adversas aos medicamentos ou da complexidade dos esquemas terapêuticos;
- Potência insuficiente do esquema terapêutico em casos onde poucos ARV estão completamente ativos
- Fatores farmacológicos como má-absorção do medicamento ou rápida absorção;
- A resistência aos ARV, que pode ser identificada em até 90% dos casos de falha virológica (Sucupira et al., 2001)

Em vista disso, há um crescente desenvolvimento de ARV de segunda geração e de novas classes farmacológicas que apresentem eficácia contra variantes resistentes aos ARV mais utilizados. A classe dos inibidores de

fusão, antagonistas de CCR5 e inibidores de integrase compreendem medicamentos de novas classes (Potthoff & Brockmeyer, 2009). Devido ao alto custo anual desses medicamentos no Brasil, estes somente são indicados para compor esquemas de resgate terapêutico em pacientes que apresentem falha virológica e resistência a pelo menos um ARV de cada uma das três classes (ITRN, ITRNN e IP) (Brasil, 2013).

- **Inibidores de Transcriptase Reversa análogos de Nucleosídeos ou Nucleotídeos (ITRN)**

Os ITRN possuem estrutura química similar à dos desoxirribonucleotídeos presentes na célula, porém com ausência do grupo hidroxila na posição 3', o que impede a incorporação de novos nucleotídeos na etapa de transcrição do RNA viral em DNA proviral, e interrompe a extensão da fita (Shafer et al., 2003).

Até o momento foram aprovados para uso pelo FDA sete análogos de nucleosídeos (zidovudina - AZT, didanosina - DDI, zalcitabina -ddC, estavudina - D4T, lamivudina - 3TC, abacavir - ABC e emtricitabina - FTC) e um análogo de nucleotídeo (tenofovir - TDF). A zalcitabina foi retirada do mercado em 2006. Dentro dessa classe farmacológica, todos os medicamentos foram aprovados para uso clínico em população pediátrica.

A resistência aos ITRN pode ocorrer de duas formas:

- Mutações na TR que impedem a ligação dos ITRN

As principais mutações associadas com esse mecanismo são a M184V, a K65R e as envolvidas no complexo Q151M. A mutação M184V ocorre no sítio ativo da enzima e induz alto grau de resistência à lamivudina e à emtricitabina, enquanto que a K65R confere resistência à todos os NRTI, com exceção da zidovudina. As mutações associadas ao complexo Q151M são selecionadas pelo uso de estavudina e didanosina, e conferem resistência a todos os NRTI, exceto para o

tenofovir. A primeira mutação selecionada nessa via mutacional é a Q151M, contudo, essa via não ocorre com frequência no HIV-1 (Clavel & Hence, 2004).

- mutações na RT que permitem a remoção dos os ITRN incorporados na fita de DNA.

O grupo de mutações que permitem a remoção dos ITRN são denominadas *Thymidine Analogue Mutations* (TAMs) e representam mutações nos códons 41, 67, 70, 210, 215 e 219 da *transcriptase reversa*. As TAMs podem emergir gradualmente, sendo selecionadas pelo uso de análogos de timidina, como a zidovudina e a stavudina. Entretanto, podem gerar resistência para todos os ITRN, incluindo o tenofovir. A presença dessas mutações facilita a entrada de ATP e pirofosfato dentro da célula, que se ligam aos NRTI e promovem sua remoção. No entanto esse processo pode ser dificultado pela presença da mutação M184V, que aumenta a susceptibilidade para a zidovudina, stavudina e o tenofovir (Clavel & Hence, 2004).

- **Inibidores de Transcriptase Reversa Não-análogos de Nucleosídeos ou Nucleotídeos (ITRNN)**

Os ITRNN apresentam uma alta afinidade de ligação ao bolsão hidrofóbico localizado próximo ao sítio catalítico da enzima TR. A ligação dos ITRNN reduz a flexibilidade da enzima e interfere na atividade de transcrição do RNA viral em DNA (Clavel & Hence, 2004).

Os primeiros medicamentos desenvolvidos e aprovados para uso foram a nevirapina (NVP), o efavirenz (EFV) e a delavirdina (DLV), sendo os dois primeiros amplamente utilizados na população pediátrica. No entanto, uma única mutação no sítio alvo dos ITRNN pode resultar em perda completa de susceptibilidade para esses medicamentos (Bachelier, 2000; Delaugerre, 2001). Como alternativa, foram desenvolvidos os ITRNN de

segunda geração, Etravirina (ETV) e Rilpivirina (RPV), que apresentam maior barreira genética e são eficientes contra cepas virais resistentes à NVP ou EFV (Adries et al., 2004; Azijn et al., 2010). Até o momento, somente a ETV foi disponibilizada para uso no Brasil, sendo indicada para compor esquemas de resgate em adultos e crianças.

- **Inibidores de Protease (IP)**

A estrutura química dos IP mimetiza peptídeos de poliproteínas virais precursoras, que normalmente são reconhecidas e clivadas pela enzima Protease. Dessa forma, os IP inibem o sítio ativo da enzima e impedem a liberação de proteínas e enzimas estruturais responsáveis pela formação das partículas virais, resultando em partículas virais imaturas e não infecciosas (Clave & Hence, 2004; Shafer et al., 2003).

As mutações para os IP podem ser classificadas como principais e secundárias. As principais ocorrem nos sítios de ligação da enzima com os inibidores, alterando a conformação da enzima e dificultando a ação dos IP. As secundárias emergem em demais regiões da protease para compensar a perda de fitness viral ou interferir na dinâmica de ligação dos IP (Miller et al., 2001).

Os IP apresentam uma ampla barreira genética em comparação à classe dos NRTI a ITRNN, sendo necessária uma maior quantidade de mutações para resultar em perda completa de susceptibilidade à essa classe de medicamentos. Além disso, os IP são prescritos ou formulados com ritonavir, o que permite um aumento nos níveis de concentração da droga (efeito “booster”) e dessa forma aumenta a barreira genética e reduz a chance de rebote virológico (Molla et al., 1996; Wensing et al., 2014).

Pacientes que possuem poucas opções terapêuticas da classe dos NRTI e ITRNN, e variantes virais resistentes aos IP de primeira geração, podem fazer uso dos IP de segunda geração, Darunavir (DRV) ou Tipranavir (TPV) (Cahn et al., 2006; Neely & Kovacs, 2009; Talbot et al., 2010) .

- **Inibidores de fusão**

Os inibidores de fusão são peptídeos sintéticos que atuam no domínio HR1 da glicoproteína GP41, responsável pela fusão da membrana viral com a célula (Figura 2) (Zdanowicz, 2006). O enfuvirtide (T-20) é o único inibidor licenciado para uso clínico pela FDA e aprovado para uso em crianças a partir dos 6 anos. Com uma estrutura molecular composta por 36 aminoácidos (Clavel & Hence, 2004), a administração desse medicamento é feita por via subcutânea, o que dificulta a adesão em adultos e principalmente em crianças (Church et al., 2004; Palladino et al., 2011) .

A falha virológica ao enfuvirtide pode estar relacionada com a presença de mutações nos códons 36, 37, 38, 40, 42, 43, 44 e 45 do domínio HR1 da gp41 (Wensing et al., 2014). Apesar dos inibidores de fusão atuarem nessa região, alguns estudos demonstraram que mutações no domínio HR2 podem emergir e estão associadas com compensação de fitness viral (Derdeyn et al., 2000).

- **Antagonistas de CCR5**

A classe dos antagonistas de CCR5 atua bloqueando o co-receptor celular CCR5, impedindo a entrada de variantes virais com tropismo R5. O Maraviroc® é o único medicamento da classe aprovado para uso pela FDA. (MacArthur & Novak, 2008)

A prescrição do Maraviroc requer a realização prévia de um teste fenotípico ou genotípico para determinar o tropismo viral, tendo em vista que o uso do medicamento é restrito para indivíduos que apresentem variantes virais R5-trópicas (MacArthur & Novak, 2008). Esse medicamento ainda não foi aprovado para uso em crianças.

- **Inibidores de integrase**

Os inibidores de integrase podem atuar impedindo a formação do complexo de pré-integração do DNA viral, ou a integração do complexo no genoma do hospedeiro (Markowitz, 2008). Atualmente, o único medicamento licenciado para uso clínico no Brasil é o raltegravir (Markowitz, 2008). Apesar de também ter sido aprovado para uso em crianças, no Brasil esse fármaco é indicado somente para compor esquemas de resgate terapêutico (Brasil, 2013).

O dolutegravir é um fármaco de segunda geração da classe dos inibidores de integrase, eficaz contra variantes virais resistentes ao raltegravir e ao elvitegravir (Canduci et al., 2011; Underwood et al., 2012). Contudo, foi aprovado para uso no Brasil recentemente e ainda não está disponível na rede pública.

1.6.1. Terapia antirretroviral em crianças

No Brasil, os critérios de recomendação (Brasil, 2014a) para início da terapia em crianças baseiam-se na contagem de células T CD4⁺, carga viral e classificação de sintomatologia clínica de acordo com CDC (Anexo 1), podendo variar com a idade da criança:

- Em todos os menores de 12 meses, deve-se iniciar a HAART independente da sintomatologia clínica, classificação imunológica ou carga viral.
- Em crianças entre 1 e 4 anos, recomenda-se iniciar em: 1) pacientes sintomáticos, classificados nas categorias B do CDC (exceto aqueles com um único episódio de pneumonia bacteriana) ou C; 2) pacientes com percentual de células T CD4⁺ <25% ou 3) pacientes com carga viral >100.000 cópias/ml.

- Em pacientes acima de 5 anos: 1) sintomáticos, nas categorias B do CDC (exceto aqueles com um único episódio de pneumonia bacteriana) ou C, 2) pacientes com percentual de células T CD4⁺ <500 células/mm³ ou 3) pacientes com carga viral >100.000 cópias/ml.

O sucesso terapêutico é verificado pela carga viral e pela contagem de células T CD4⁺. Nos primeiros 5 anos de vida, os valores percentuais de células T CD4⁺ são mais estáveis quando comparados a contagem absoluta. Por essa razão, nessa faixa etária os percentuais de células T CD4⁺ são preferencialmente utilizados como parâmetro para avaliar a progressão da doença ou como critério para início de terapia (Brasil, 2014a).

Após 12 meses de tratamento, espera-se obter um aumento de 5% na contagem de células T CD4⁺ em crianças menores de cinco anos com nível basal menor que 15%, e de 50 células/mm³ em crianças maiores de cinco anos. Com relação à carga viral, deve ser observado um decréscimo maior que 1 log₁₀ depois de 8 a 12 semanas de tratamento, atingindo níveis indetectáveis após 6 meses (Brasil, 2014a). O sucesso virológico pode demorar mais tempo para ser alcançado em crianças, porém em alguns casos, pode se observar resposta imunológica mesmo em casos com supressão parcial menor que 1log₁₀ (Chiappini et al., 2003; Machado et al., 2004).

A probabilidade de sucesso terapêutico depende da adesão ao tratamento e de condutas que visem minimizar o risco de falha virológica e manter a eficácia dos medicamentos de primeira e segunda linha por mais tempo. Como por exemplo, são necessários ajustes na posologia dos medicamentos dependendo da idade e do peso do paciente, devido à ocorrência de alterações na farmacocinética dos ARV ao longo do crescimento e desenvolvimento da criança. Também devem ser consideradas características farmacológicas como a durabilidade, eficácia, e os potenciais efeitos adversos do tratamento escolhido (Brasil, 2014a; Hazra et al., 2010).

Com a finalidade de detectar mutações associadas à resistência e subsidiar a elaboração de um esquema terapêutico que possibilite a supressão viral, são realizados os testes de genotipagem (Hanna et al., 2001; Dehority et al., 2013). Os testes de genotipagem devem ser solicitados para todos os pacientes em uso de HAART e em falha virológica. Atualmente, o Ministério da Saúde também preconiza o teste para pacientes *naïves* (não expostos aos ARV), porém apenas em situações especiais (Brasil, 2013). No caso de pacientes *naïves*, as mutações são de origem primária (transmitida) e podem ser transmitidas por indivíduos em uso atual ou prévio de antirretrovirais. Em pacientes expostos aos ARV, as mutações de resistência são de origem secundária (adquirida) e emergem por pressão de seleção dos medicamentos.

1.6.2. Resistência transmitida e adquirida

Estudos que avaliam a prevalência de resistência aos ARV em crianças e adolescentes são limitados (Figura 4). No Brasil, apesar de alguns estudos apresentarem uma maior amostragem de pacientes, são pouco comparáveis devido a diferentes metodologias utilizadas, o que dificulta estabelecer uma vigilância adequada.

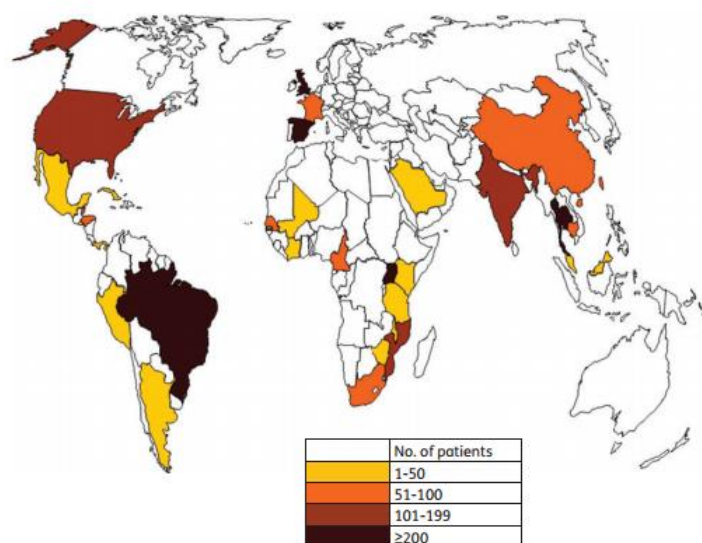


Figura 5. Estudos de resistência aos antirretrovirais em populações pediátricas infectadas pelo HIV-1, categorizados de acordo com o tamanho da amostragem (Sánchez et al., 2014).

De acordo com a OMS, a taxa de resistência transmitida pode ser classificada como baixa (<5%), moderada (5-15%) ou alta (>15%) (Bennett et al., 2008). Almeida e colaboradores (2012) observaram uma taxa de resistência transmitida moderada (12,8%) em uma coorte pediátrica de São Paulo, com pacientes *naives* de terapia ARV, recrutados no período de 2000 a 2011. Em contrapartida, em um estudo anterior conduzido pelo mesmo grupo, no período de 2000 a 2004, não foram observados casos com resistência transmitida (Almeida et al., 2009). Machado e colaboradores (2004), também não encontraram evidências de resistência transmitida em amostras de crianças *naives* do Rio de Janeiro, no período de 1999 a 2003.

Em um estudo mais recente abrangendo crianças e adultos atendidos em diferentes serviços no estado de São Paulo, no período de 2012 a 2014, foi relatada uma prevalência de 9,2%, com apenas um caso de resistência transmitida entre os pacientes pediátricos (Guimarães et al., 2015).

Em outras regiões do Brasil, as taxas de resistência transmitida na população pediátrica variam de 9,5% a 11% (Ferreira et al., 2010; Soto-Ramirez et al., 2010; Arruda et al., 2011). A maior taxa de resistência

transmitida observada em crianças e adolescentes foi reportada na região nordeste (26,9%), porém a metodologia utilizada neste estudo limita a comparação com demais estimativas (Pedroso et al., 2007).

A maioria dos estudos que avaliam resistência secundária em crianças e adolescentes tratados incluem pacientes em uso de terapia dupla com NRTI e terapia HAART, visto as recomendações do Ministério da Saúde vigentes no ano de 2002. Até o ano de 2004, a terapia dupla era indicada para pacientes nos estágios N2, A2, B1 e B2 do CDC, e a terapia tripla (HAART) deveria ser reservada para pacientes em estados avançados de doença, enquadrados na categoria N3, A3, B3, C1-C3 e B2 (se apresentasse idade menor que um ano) (Brasil, 2002).

Machado e colaboradores (2004) avaliaram a frequência de resistência aos ARV em dois grupos de pacientes; o primeiro em uso de terapia mono/dupla e o segundo em uso de terapia HAART. Ambos os grupos apresentaram alta prevalência de mutações de resistência para a classe dos ITRN (75 a 80%), a qual foi mais utilizada. Para a classe dos ITRNN e IP, o segundo grupo apresentou resistência em 56% e 63% dos casos, respectivamente. Embora o alcance de níveis indetectáveis de carga viral tenha sido obtido em poucos casos no grupo tratado com HAART, o ganho na contagem de células T CD4⁺ foi verificado nos dois grupos.

Em um estudo envolvendo crianças de São Paulo, foram avaliados indivíduos expostos à terapia HAART por um tempo médio de 12 meses. No entanto, a maioria dos casos havia utilizado terapia dupla no esquema terapêutico inicial, o que facilitou o desenvolvimento de resistência para a classe dos ITRN, reduzindo a potência dos medicamentos dessa classe no uso de terapia HAART. A porcentagem de casos com resistência foi de 57% para os ITRN, 54% para ITRNN e 67% para IP (Machado et al., 2005).

Em uma análise mais recente descrita por Oliveira e colaboradores (2008), foram avaliadas características genéticas do HIV-1 em pacientes pediátricos, no período de 2000 a 2006. Também foi observada uma alta

prevalência de resistência para a classe dos ITRN (80%), ITRNN (70%) e IP (55%), reforçando a necessidade de mais opções terapêuticas para essa população.

1.6.3. Adesão

O tratamento ARV promove a supressão virológica, possibilita a resposta imune e a melhora do estado clínico do paciente. No entanto, sabe-se que em adultos, o sucesso terapêutico depende de no mínimo 95% de adesão ao tratamento (Paterson et al., 2000). Estudos realizados em crianças e adolescentes reportam taxas de adesão variando de 50 a 80% (Van Dyke et al., 2002; Filho et al., 2008; Rudy et al., 2010, Mellins et al., 2011; Buchanan et al., 2012; Ernesto et al., 2012; Cruz et al., 2014). A adesão ao tratamento é uma das maiores dificuldades enfrentadas no manejo da população pediátrica, e envolve uma série de fatores clínicos, sociais e comportamentais.

Alguns ARV não possuem formulação adequada para crianças e muitas vezes apresentam reações adversas, o que influencia na tolerabilidade e podem implicar em falha virológica (Hazra et al., 2010). Em crianças, a taxa de falha virológica às classes do ITRN, ITRNN e IP, é cerca de 2 vezes maior do que em adultos heterossexuais infectados por via sexual, após cinco anos de tratamento (PLATO II, 2011). O risco de falha se torna mais acentuado devido à baixa adesão ao tratamento e à farmacocinética dos ARV ser diferente da observada em adultos, o que dificulta a manutenção de níveis adequados de ARV para promover a supressão viral (PLATO II, 2011; Heidari et al., 2012).

Um estudo prospectivo de corte transversal realizado na Tanzânia avaliou a durabilidade da HAART e os preditores de falha virológica em uma população pediátrica. Indivíduos com 12 anos de idade ou mais demonstraram 4 vezes mais baixa adesão quando comparados com indivíduos menores de 12 anos. (Dow et al., 2014)

A transição para a adolescência caracteriza um período de maior vulnerabilidade em função do aparecimento de comorbidades relacionadas ao estado avançado de doença, mudanças físicas decorrentes de efeitos adversos dos medicamentos, alterações comportamentais devido a muitas vezes, falta de suporte familiar, e também ao surgimento de preocupações como a de revelar o diagnóstico dentro do círculo social (Agwu et al., 2013).

Como consequência da baixa adesão, do uso de terapia dupla no primeiro esquema terapêutico e do longo tempo de exposição aos tratamentos ARV, é comum observar resistência viral a três ou mais classes de ARV em pacientes infectados por transmissão vertical quando adolescentes, tornando os esquemas terapêuticos cada vez mais complexos (PLATO II, 2011, Van Dyke et al., 2002).

Wong e colaboradores (2012) avaliaram adolescentes tratados com esquemas sub-ótimos, com menos de duas drogas ativas, e otimizados, com pelo menos duas drogas ativas. Todos os pacientes eram multi-experimentados e mais de 50% apresentavam histórico de não-adesão. O grupo de pacientes tratados com esquemas otimizados tiveram um ganho de aproximadamente 50 céls/mm³ na semana 48 em relação ao grupo com esquemas sub-ótimos, sugerindo que um esquema sub-ótimo pode ser mantido até 24 semanas, no entanto continuar o uso por mais de 48 semanas pode aumentar o risco de deterioração imunológica.

A decisão do clínico no manejo da população pediátrica deve ser cautelosa em relação aos benefícios e limitações da terapia ARV. Diante desse cenário, o teste de genotipagem se faz importante para guiar na escolha do tratamento.

Em crianças e adolescentes expostos à múltiplos ARV, devem ser considerados todos os testes realizados, pois as mutações se acumulam ao longo do tempo na população viral. Porém, a troca do tratamento ARV ou a baixa adesão implicam em uma diminuição na pressão seletiva, e as variantes virais com mutações de resistência podem desaparecer ou circular

em menor quantidade no plasma sanguíneo, não sendo detectadas em testes de genotipagem mais recentes. No entanto, as variantes virais com mutações de resistência continuam circulando nos reservatórios latentes e emergem novamente quando submetidas à pressão seletiva por uma droga com o mesmo perfil mutacional.

A população pediátrica representa um grupo característico de pacientes, em sua maioria com baixa adesão, multi-experimentado e com resistência a três ou mais classes de ARV. Essas limitações reforçam a importância da manutenção da adesão nessa população e do monitoramento pelos testes de genotipagem para prevenir o acúmulo de mutações de resistência e garantir a eficácia do arsenal terapêutico disponível assim como de opções futuras, tendo em vista que nessa população o tratamento é iniciado cedo e deve ser mantido ao longo da vida.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar as mutações associadas à resistência aos ITRN, ITRNN e IP em amostras de crianças e adolescentes vivendo com HIV/aids.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar a proporção de casos com resistência transmitida em pacientes *naives*;
- Avaliar a susceptibilidade aos ARV em pacientes em falha virológica;
- Avaliar a evolução de parâmetros laboratoriais (carga viral e contagem de células T CD4⁺);
- Avaliar a evolução do perfil mutacional em amostras de pacientes expostos às três classes de ARV;
- Comparar os perfis de resistência no gene da protease em subtipos B e não-B.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. População do estudo

Neste estudo retrospectivo, foram incluídas crianças e adolescentes naives e expostos à terapia ARV, em acompanhamento em Serviços de Assistência Especializada em HIV/aids na região metropolitana de São Paulo, no período de janeiro de 2010 a dezembro de 2014. As amostras biológicas foram encaminhadas para o Laboratório de Genotipagem de HIV do Instituto Adolfo Lutz, que compõe a Rede Nacional de Genotipagem do HIV (RENAGENO) como laboratório executor no Estado de São Paulo.

3.1.1. Pacientes *naives* aos ARV

Foi realizada uma análise retrospectiva onde foram incluídos pacientes sem histórico de exposição aos ARV, e que apresentavam sequências genéticas da região da PT e RT do HIV-1 em nosso laboratório, no período de 2010 a 2014. Os dados clínicos e laboratoriais foram obtidos através do preenchimento da ficha clínica pelo médico do paciente.

3.1.2. Pacientes expostos aos ARV e em falha virológica

Foi realizada uma análise retrospectiva onde foram incluídos pacientes expostos à terapia ARV e em falha virológica, que apresentavam sequências genéticas da região da PT e RT do HIV-1 em nosso laboratório. O grupo foi composto por todos os pacientes com entrada no período de 2010 a 2014 (amostra desfecho) para realização de teste de genotipagem. As informações clínicas e laboratoriais foram obtidas através do preenchimento da ficha clínica pelo médico do paciente.

3.1.2.1. Avaliação da evolução imunológica e virológica

Para essa análise, foram incluídos pacientes que apresentavam pelo menos uma entrada anterior a da amostra desfecho (2010-2014). Foram consideradas as informações de carga viral e células T CD4⁺ da primeira amostra do paciente disponível em nosso laboratório e da amostra desfecho.

O aumento ou declínio da contagem de células T CD4⁺ (delta T CD4⁺) foi avaliado através da subtração do valor de T CD4⁺ da amostra desfecho pelo obtido na primeira amostra do paciente. O valor mediano de delta T CD4⁺ foi dividido pela mediana de tempo entre as coletas das amostras para determinar o aumento ou o declínio médio anual.

O declínio na carga viral (delta CV) foi avaliado através da subtração do valor de carga viral do desfecho, pelo obtido na primeira amostra do paciente. O delta CV foi categorizado em três faixas: maior que $2 \log_{10}$, $1 \log_{10}$ e $0,5 \log_{10}$.

3.1.2.2. Avaliação do perfil mutacional

Para avaliar a evolução do perfil mutacional, foram incluídos os pacientes que tinham uma amostra anterior mais próxima do desfecho e que estavam expostos às três classes de ARV nas duas coletas. Nesta análise foi avaliado somente o ganho de mutações para ITRN, ITRNN e IP obtido entre a genotipagem da amostra desfecho e da amostra anterior. As mutações foram determinadas de acordo com o algoritmo GRI-HIVdb, detalhado no item 3.3.

3.1.3 Aspectos éticos

Todos os responsáveis pelos pacientes menores de 18 anos assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), e os menores com condições de compreender o procedimento assinaram o termo

de assentimento (Anexo 2). Este estudo foi aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa do Instituto Adolfo Lutz – CEPIAL e do Instituto de Infectologia Emilio Ribas (Anexo 3).

3.2. Técnicas laboratoriais

3.2.1. Coleta e processamento das amostras

As amostras foram coletadas em dois tubos de sangue total com EDTA (ácido etileno diamino tetra-acético) e encaminhadas para o Laboratório de Genotipagem do HIV do Instituto Adolfo Lutz no prazo máximo de seis horas após a coleta. O material biológico foi centrifugado a 2000 rpm por 20 minutos para a separação do plasma e das células mononucleares do sangue periférico (do inglês *Peripheral Blood Mononuclear Cell – PBMC*), alíquotado em tubos de 500 µl e armazenados a temperatura de -70°C até o processamento.

Para amostras com carga viral plasmática abaixo de 2000 cópias, duas alíquotas de 1mL de plasma separadas no momento da chegada no laboratório foram centrifugadas a 18000 rpm por 60 minutos a 4°C . Após a centrifugação foi retirado 930 µl do sobrenadante de ambos os tubos restando 70 µl de plasma concentrado em cada tubo.

3.2.2. Extração do RNA

A extração do RNA viral foi realizada a partir de 140 µl do plasma utilizando o QIAmp Viral RNA Mini Kit (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante. O material extraído foi armazenado a -70°C até a realização dos procedimentos laboratoriais.

3.2.3. Quantificação da carga viral e contagem de células T CD4⁺

A quantificação da carga viral foi realizada a partir do método bDNA (Versant 3,0 Siemens, Erlanged, Alemanha) até julho de 2014. Após esse período, a quantificação foi realizada a partir do método Real-time PCR (Abbott Molecular's , Illinois, EUA). A contagem de células T CD4⁺ foi realizada por citometria de fluxo (FACS Calibur, BD, San José, CA, EUA).

3.2.4. Retrotranscrição e amplificação dos genes da protease e transcriptase reversa

Os genes da PT e RT foram amplificados utilizando o TRUGENE® HIV-1 Genotyping Assayq/OpenGene® DNA System (Siemens Healthcare Diagnostics, Tarrytown, NY) ou por metodologia *in house* de *One Step RT-PCR* e *Nested PCR* descrita na literatura (Guimarães et al., 2015).

A reação de *One Step RT-PCR* foi obtida utilizando 10x PCR buffer High Fidelity (Life Technologies, USA), 50 mM MgSO₄ (Life Technologies, USA), 10mM dNTP (Life Technologies, USA), 0,1 mM DTT, 10U/μl RNase inhibitor (New Englands Biolabs, UK), 50U RT SuperScript® III (Life Technologies, USA), 1.25U/μl Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity (Life Technologies, USA), 10 μM dos primers GAG2 e RT137 e 10 μl de RNA viral extraído em um reação com volume final de 50 μl. A reação foi incubada a 50°C por 30 minutos e 94°C por 5 min, seguida de 35 ciclos de amplificação: 18 ciclos a 94°C por 30 segundos, 50°C por 30 segundos, 68°C por 2 minutos e 30 segundos; 17 ciclos a 94°C por 30 segundos, 53°C por 30 segundos, 68°C 2 minutos e 30 segundos e uma extensão final de 68°C por 10 minutos.

Para o *Nested PCR* foi utilizado um volume de 2,5 μl do produto da reação de *One Step RT-PCR* em uma reação de 25 μl contendo: Go Taq® Green Master Mix 2X (Promega Biosciences, CA) e 10 μM dos primers PR3

e RT12. A reação de *Nested PCR* foi incubada a 94°C por 3 minutos, seguido de 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos, 72°C 1 minuto e 30 segundos e uma extensão final de 72°C por 10min. Os primers utilizados na reação de *One Step RT-PCR* e *Nested PCR* estão descritos na tabela 1.

O produto do *Nested PCR* foi quantificado por gel de agarose a 1% em tampão TBE (Tris/Borato/EDTA) 0,5X corado com Sybr Safe® (Life Technologie, USA) utilizando Low DNA Mass Ladder (Life Technologie, USA) como marcador.

Tabela 1: *Primers* utilizados para a amplificação e sequenciamento das regiões da protease e transcriptase reversa do HIV-1. (Rodrigues et al., 2005; Niubó et al., 2000; Steegen et al., 2006)

Etapa	Sequência (5' → 3')	Posição
One Step RT-PCR		
GAG2 (F)	GAGGAAGCTGCAGAATGGG	1408-1426
RT137 (R)	TTCTGTATGTCATTGACAGTCCAGC	3325-3301
Nested PCR		
PR3 (F)	AGAGCCAACAGCCCCACCA	2148-2166
RT12 (R)	ATCAGGATGGAGTTCATAACCCATCCA	3260-3234
Sequenciamento		
DP10 (F)	TTTCCCCACTAACTTCTGTATGTCATTGACA	2198 - 2223
DP11 (R)	CCATTCCTGGCTTTAATTTTACTGGTA	2598 - 2572

DP16 (F)	CCTCAAATCACTCTTTGGCAAC	2253 - 2274
DP17 (R)	AAAATTTAAAGTGCAGCCAAT	2549 - 2529
F1 (F)	GTTGACTCAGATTGGTTGCAC	2519 - 2539
RT2882 (F)	GGNGAYGCATATTTTTTCARTWCC	2882-2905
RT2949 (R)	CCTGGTGTYTCAATTRTTTRYAC	2971-2950
F4 (F)	GGATGGCCCAAAGTTAAAC	2597 - 2616

Legenda: ^a Posição relativa ao HIV-1 de referência HXB2 (GenBank accession number K03455) ; F- Forward; R- Reverse.

3.2.5. Reação de sequenciamento genético

As amostras amplificadas pela metodologia *in house* foram sequenciadas utilizando oito primers (descritos na tabela 1.) com volume final de 10 µl cada reação. As reações continham 0.5µl do Kit DNA Sequencing –Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction – ABI Prism® (Life Technologies, USA), 4µl 2.5X Sequencing Buffer (Applied Biosystems, USA), 2.4µl de água DNase RNase free (Life Technologies, USA), 1.5µl (5-20ng) de produto amplificado e 1.6µl primer para cada tubo contendo DP10, DP11, DP16, DP17, F1, RT2882, RT2949 e F4.

A purificação e precipitação do produto das reações de sequenciamento foram realizadas com etanol e acetado de sódio de acordo com o protocolo recomendado pela Life Technologies. Após a etapa de precipitação adicionou-se 10 µL de HiDi Formamida (Life Technologies, USA) para cada amostra, em seguida foram denaturadas a 95°C por 3 minutos e imediatamente resfriadas em gelo para serem sequenciadas no sequenciador automático ABI 3130XL Genetic Analyzer (Life Technologies, USA). Os cromatogramas foram editados manualmente utilizando o programa software Sequencher 4.7 (GeneCodes, USA).

3.3. Análise molecular

3.3.1. Susceptibilidade e perfil de mutações associadas a resistência aos ARVs

A susceptibilidade e as mutações associadas à resistência aos ITRN, ITRNN e IP foram determinadas a partir do algoritmo de *Stanford HIV Database Genotype Resistance Interpretation* (GRI-HIVdb), disponível em: <http://hivdb.stanford.edu>). Para avaliar as mutações associadas à resistência aos ARV entre subtipos na protease, também foi considerado os critérios estabelecidos pela International AIDS Society (IAS-USA, 2014) (Wensing et al., 2014).

As sequências de pacientes *naïves* de terapia ARV foram analisadas pelos algoritmos GRI-HIVdb e *Calibrated Population Resistance Version 6.0* (CPR, *Stanford Database*, SDRM 2009). O algoritmo do CPR é uma ferramenta desenvolvida especialmente para vigilância epidemiológica de resistência primária.

Os medicamentos classificados como resistentes ou susceptíveis foram caracterizados de acordo com a classificação dada pelo algoritmo de GRI-HIVdb em: susceptíveis quando classificados *susceptible ou potential low-level resistance*; e resistentes quando classificados em *intermediate resistance ou high level resistance*.

Foi considerada resistência às três classes as sequências genéticas que apresentaram resistência (*intermediate resistance ou high level resistance*) a pelo menos um medicamento da classe dos ITRN, ITRNN e IP.

3.3.2. Subtipo viral

O subtipo viral foi determinado com REGA HIV-1 Subtyping Tool - Version 2.0 (<http://dbpartners.stanford.edu/RegaSubtyping/>) e National Center for Biotechnology Information - NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

projects/genotyping/formpagex.cgi). Todas as amostras com perfil de recombinação nas análises dos websites REGA e NCBI foram reanalisadas utilizando o programa SIMPLOT versão 3.5.

3.4. Análises estatísticas

Os dados clínicos, laboratoriais e moleculares dos pacientes incluídos neste estudo foram plotados em banco de dados EpiInfo6 (CDC).

As análises estatísticas foram realizadas utilizando os programas EpiInfo 6 (CDC) e GraphPad software, assumindo um valor de significância $p < 0,05$, bicaudal. Para análises de contingência de variáveis categóricas, foi utilizado o teste Yates corrigido ou teste de Fisher quando apropriado. Para análise de variáveis contínuas, foram utilizados testes não-paramétricos (Spearman). Para comparação entre dois grupos, foi utilizado o teste Mann-Whitney, e entre três ou mais grupos, o teste de Kruskal-Wallis. Para comparar variáveis contínuas entre um mesmo indivíduo de cada grupo foi utilizado teste t pareado. Os resultados foram expressos em medianas e percentis 25th e 75th (IQR). O intervalo de confiança (IC) considerado foi de 95%.

4. RESULTADOS

4.1. População de estudo

A população de estudo foi composta por 206 crianças e adolescentes, com idade entre 0 e 18 anos, em sua maioria atendidos no Instituto de Infectologia Emílio Ribas (54%) e na Santa Casa de Misericórdia de São Paulo (9%). Os demais pacientes eram acompanhados em Serviços de Assistência Especializada distribuídos na região metropolitana de São Paulo.

As amostras foram encaminhadas ao laboratório no período de janeiro de 2010 a dezembro de 2014.

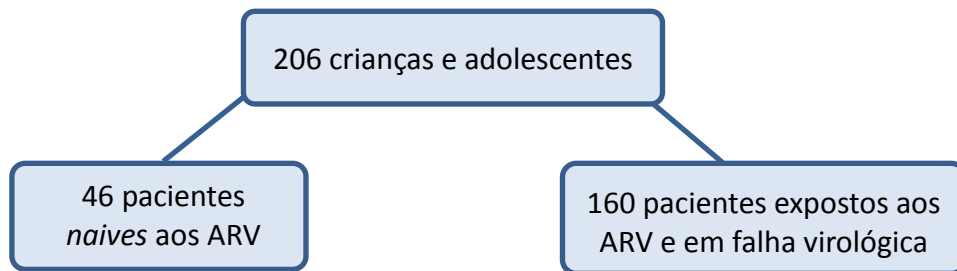


Figura 6. Representação esquemática da população de estudo.

4.2. Pacientes *naíves* aos ARV

Entre os 46 pacientes *naíves* avaliados, 57,4% eram do sexo masculino, com uma mediana de 10 anos (3-15 anos) de idade e carga viral de $4,77 \log_{10}$ ($4,49 - 5,16 \log_{10}$). Os indivíduos apresentaram uma mediana de contagem de células T CD4⁺ de 573 células/mm³ (328 – 1387 células/mm³). O subtipo viral mais prevalente foi o B em 61% das sequências, seguido de F em 26%, BF em 2% e C em 6%. Em três sequências não foi possível determinar o subtipo viral por nenhuma das ferramentas utilizadas.

Parte dos casos avaliados foram descritos no trabalho “*Transmitted Drug Resistance among recently diagnosed adults and children in São Paulo, Brazil*” (Anexo 4).

A prevalência de resistência transmitida foi de 8,6% (4/46; IC 95% 2.8%-19.6%), de acordo com a ferramenta CPR.

Para avaliar a presença de mutações de resistência adicionais e com possível impacto na susceptibilidade aos ARV, as sequências foram submetidas para o algoritmo GRI-HIVdb, utilizado para elaboração dos laudos de genotipagem.

Entre os 17 casos (37%) com presença de mutações consideradas pelo GRI-HIVdb, 47% eram do subtipo B, 30% do subtipo F e 12% do

subtipo C. Não foi observada presença de mutações principais associada à resistência aos IP, porém em 58% (10/17) dos casos apresentaram mutações secundárias, com redução de susceptibilidade somente ao NFV (Seq ID BRSP630-13 e BRSP554-14) (Tabela 2).

Para a classe dos ITRN, 29% (5/17) das amostras apresentaram mutações de resistência, sendo 23% de T69N (4/17) e 6% de T215S (1/17).

Com relação à classe dos ITRNN, 29% (5/17) das amostras apresentaram mutações de resistência. Dois casos apresentaram resistência alta para EFV e NVP devido à presença da mutação K103N, e um (Seq ID BRSP630-13) apresentou redução na susceptibilidade para o medicamento de segunda geração RPV, devido à mutação E138A.

Tabela 2. Sequências de pacientes *naives* com presença de mutações associadas à resistência aos ITRNs, ITRNNs e IPs, de acordo com os algoritmos de Stanford: Calibrated Population Resistance (CPR) e Genotype Resistance Interpretation (GRI-HIVdb).

Calibrated Population Resistance (CPR)							Stanford HIV Database (GRI-HIVdb)			
Seq ID	Idade	Gênero	Subtipo	ITRN	ITRNN	IP	ITRN	ITRNN	IP principais	IP secundárias
BRSP014-10	4 anos	Masc.	B		K103N, P225H			K103N,P225H		L10IL
BRSP039-10	15 anos	Masc.	-	T69D			T69ADNT			L10I
BRSP135-10	16 anos	Masc.	B					V90IV		
BRSP253-10	1 ano	Masc.	F	T215S			T215ST			
BRSP120-11	13 anos	Masc.	F							L10V
BRSP303-11	8 meses	Masc.	B				T69N			
BRSP001-13	2 anos	Fem.	B				T69NT			
BRSP358-13	11 anos	Masc.	F		K103N	I85V		K103N		
BRSP588-13	1 mês	Fem.	F					V106IV		
BRSP612-13	13 anos	Fem.	B							K20M,A71T
BRSP630-13	16 anos	Fem.	C					E138AE		I47L,T74S
BRSP877-13	4 anos	Masc.	B							L10V
BRSP001-14	6 anos	Masc.	B				T69N			
BRSP044-14	5 meses	Fem.	-							L10V
BRSP554-14	18 anos	Fem.	C							T74S
BRSP484-13	7 anos	Masc.	B							I47M
BRSP492-12	14 anos	Fem.	F							K20M

4.3. Pacientes expostos aos ARV e em falha virológica

Entre os 160 pacientes avaliados no período de 2010 à 2014, 42% eram do sexo masculino, com idade mediana de 14 anos (12-16 anos), carga viral de $3,87 \log_{10}$ ($3,27 - 4,65 \log_{10}$) e contagem de células T CD4⁺ de 451 células/mm³ (241 – 746 células/mm³). A mediana de tempo de exposição aos ARV foi de 10 anos (7-13 anos), sendo que cada paciente foi exposto a uma mediana de três (2-5) esquemas terapêuticos no período avaliado.

O subtipo viral mais prevalente foi o B em 68% das sequências, seguido de 12% de F, 7% de BF, 3% de C, 1% de AG e 1% de GJ. Em 9% das sequências não foi possível determinar o subtipo viral por nenhuma das ferramentas utilizadas.

Considerando a exposição para as classes de ARV, 43% dos pacientes haviam sido expostos às três classes de ARV (ITRN, ITRNN e IP) e 40% não haviam utilizado uma terceira classe de ARV (20% expostos a ITRN+IP e 20% expostos a ITRN+ITRNN). Dezesesseis pacientes (9,3%) estavam utilizando ou fizeram uso de medicamentos de novas classes (31% enfuvirtide (T-20) e 37,5% raltegravir).

Com relação ao primeiro tratamento ARV, aproximadamente 40% dos pacientes fizeram uso de terapia mono/dupla. Ao comparar o grupo de pacientes que receberam ITRN+ITRNN ou ITRN+IP no primeiro tratamento com os que receberam mono/dupla terapia, foi observado no segundo grupo valores significativamente maiores em relação à idade ($p=0,0085$), número de tratamentos ($p<0,0001$) e tempo de tratamento ($p<0,0001$).

4.3.1. Susceptibilidade aos antirretrovirais

Todos os pacientes com informação de histórico de tratamento haviam sido expostos aos ITRN e aproximadamente 70% apresentaram resistência para os medicamentos desta classe (com exceção do TDF) (Figura 6).

Entre os pacientes expostos à classe dos ITRNNs (107/160), 82% (88/107) apresentaram resistência para EFV ou NVP e 30% (32/107) para o medicamento de segunda geração ETV, sendo que apenas um paciente havia utilizado esse ARV (Figura 7).

Em relação aos pacientes expostos à classe dos IP (118/160), a proporção de casos com resistência variou de 50 a 64% para os medicamentos de primeira geração da classe dos IPs, sendo o NFV o ARV com maior perda de susceptibilidade (Figura 8). Os IPs de segunda geração apresentaram resistência importante para o DRV em 17% dos casos e para o TPV em 37%. Entre os pacientes não expostos ao DRV e TPV (102/118), observou-se uma prevalência de resistência de 9% e 29% respectivamente. Além disso, foi observado que em 14% dos pacientes não expostos ao TPV e DRV apresentaram baixa resistência a esses medicamentos.

Do total de pacientes avaliados, 28% apresentaram resistência às três classes.

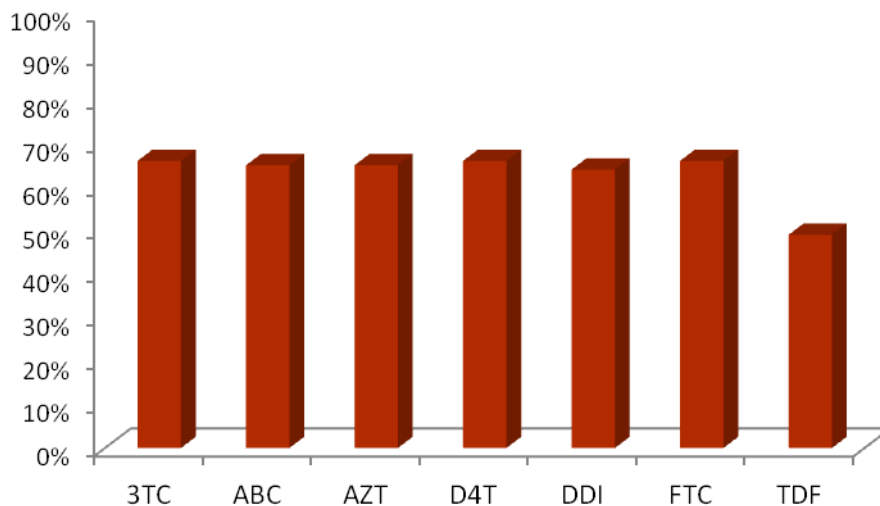


Figura 7. Frequência de resistência a classe dos ITRNs, corrigida por exposição, em amostras de pacientes em falha virológica.

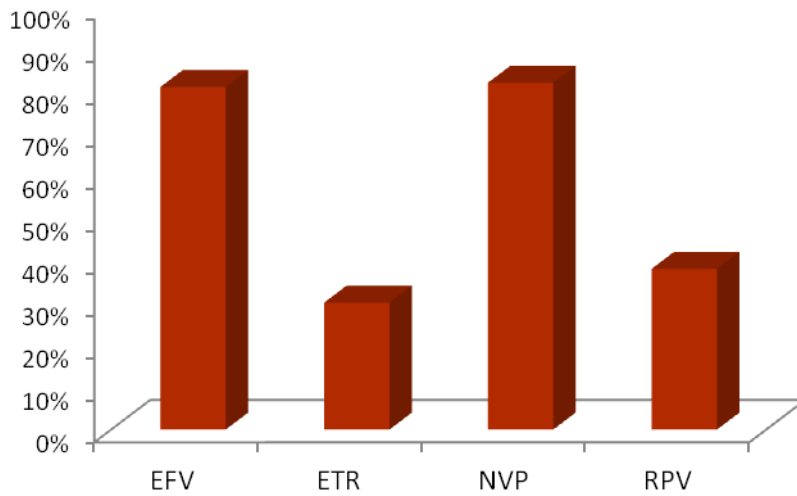


Figura 8. Frequência de resistência a classe dos ITRNNs, corrigidas por exposição, em amostras de pacientes em falha virológica.

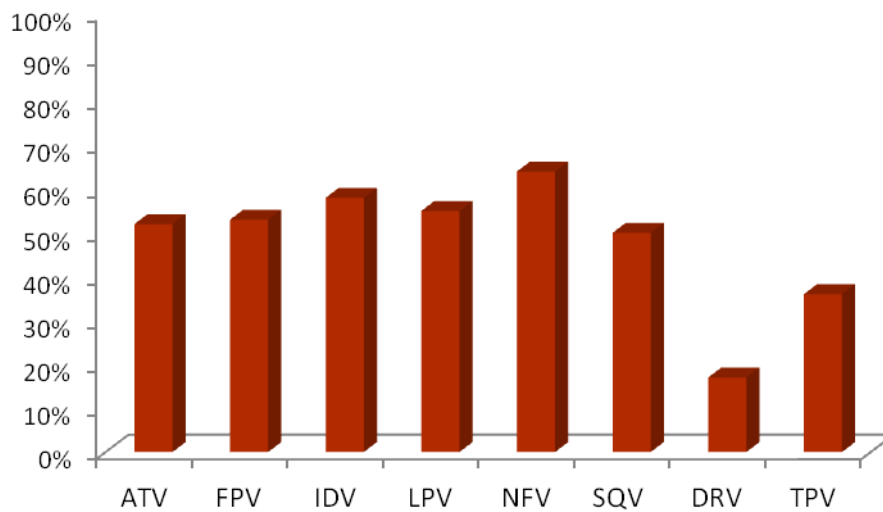


Figura 9. Frequência de resistência a classe dos IPs, corrigidas por exposição, em amostras de pacientes em falha virológica.

4.3.2. Evolução imunológica e virológica

A fim de avaliar a evolução de células TCD4⁺ (delta TCD4⁺) e de carga viral (delta CV) em um período de tempo, foram incluídos nesta análise apenas pacientes que apresentavam mais de uma entrada no

laboratório (59/160). A mediana de tempo entre a entrada da primeira amostra do paciente disponível no laboratório, e da amostra desfecho, foi de 222 semanas.

Em 61% (36/59) dos casos foi observado um declínio na contagem de células TCD4⁺ (mediana de 68 céls/mm³ por ano). Entre os pacientes que apresentaram aumento de células TCD4⁺, o ganho observado foi uma mediana de 49 céls/mm³ ao ano.

Ao avaliar o delta CV, foi observado que em 30% (18/59) dos pacientes houve uma redução igual ou maior a 1 log₁₀ na carga viral

Não houve uma correlação estatística entre os níveis de delta CV e delta T CD4⁺ ($p=0,16$) (Figura 9).

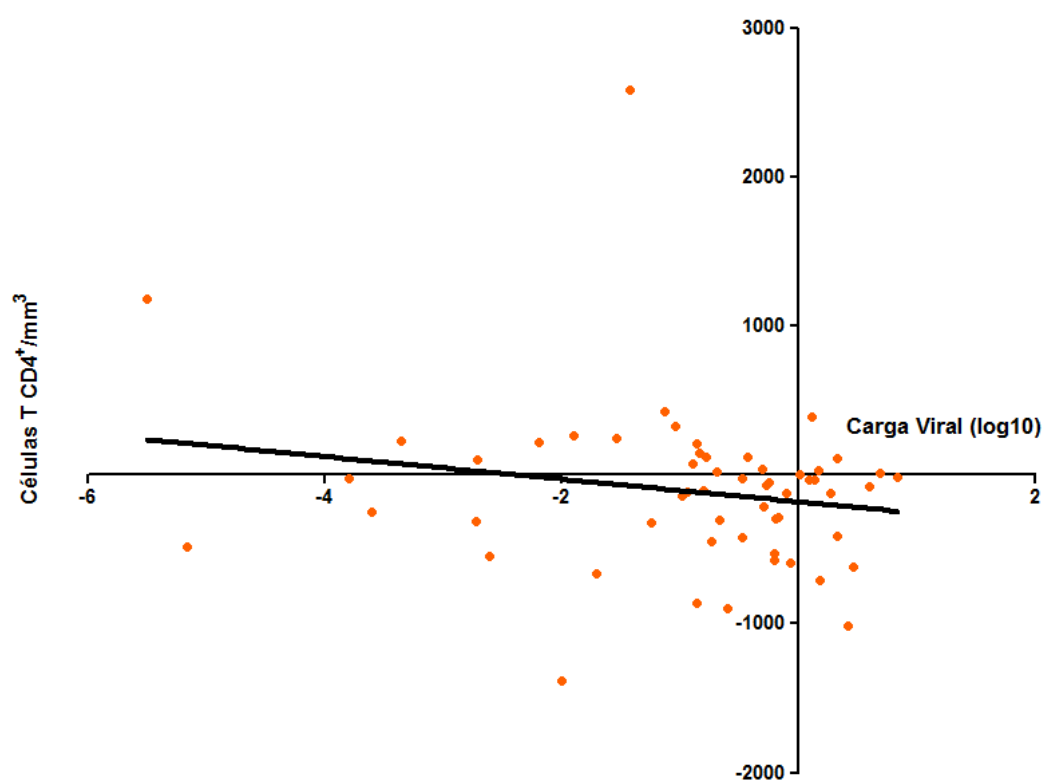


Figura 10. Relação entre a redução da carga viral e do aumento ou declínio de células T CD4+ observado entre a amostra desfecho e a primeira amostra de 59 pacientes em falha virológica.

4.3.3. Mutações associadas à resistência aos ARV

Entre os 59 casos com mais de uma amostra em nosso laboratório, foi verificado a susceptibilidade aos ARV na primeira amostra disponível.

Na primeira amostra, 40% (24/59) dos pacientes haviam sido expostos às três classes de ARV. Sete casos foram excluídos da análise de susceptibilidade por se tratarem de amostras de pacientes *naives* ou sem informação de histórico de tratamento. A susceptibilidade foi analisada de acordo com a(s) classe(s) de ARV que os pacientes foram expostos até o momento da coleta. Foi observada uma alta prevalência de resistência aos ITRN, ITRNN e IP, sendo o DRV o medicamento de segunda geração mais preservado (Figuras 10, 11 e 12).

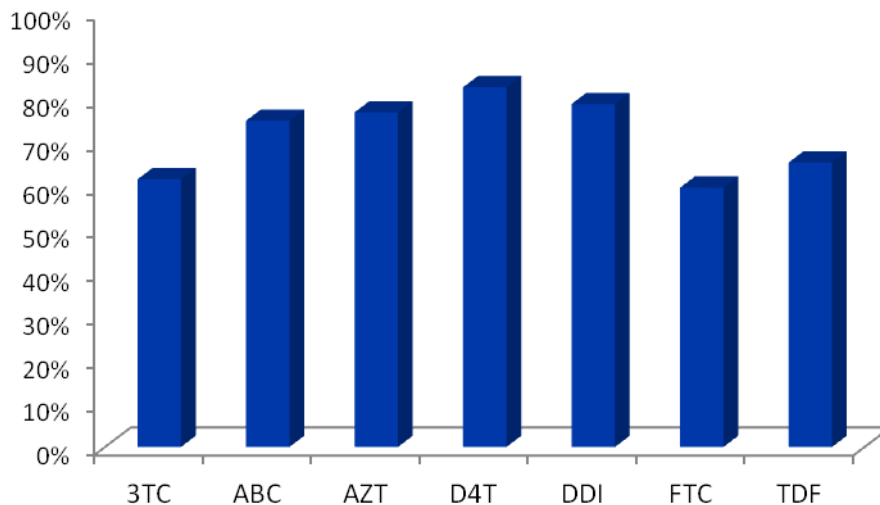


Figura 11. Frequência de resistência a classe dos ITRNs, corrigida por exposição, na primeira amostra de pacientes em falha virológica.

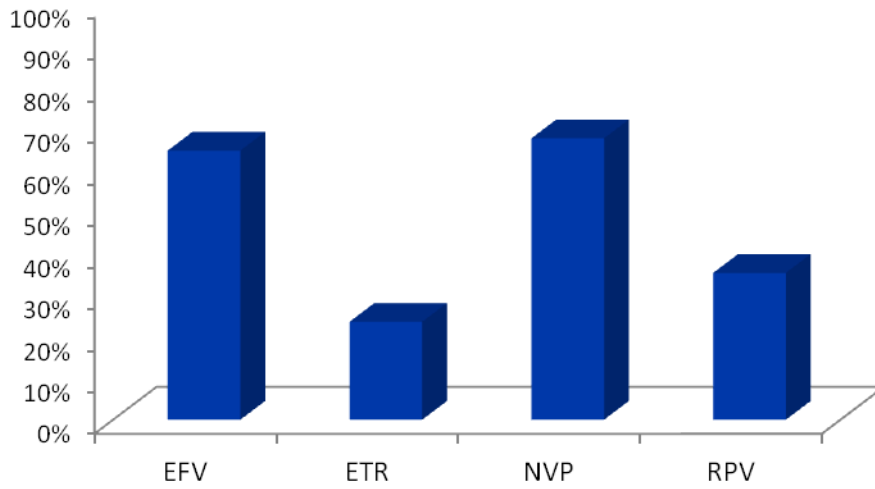


Figura 12. Frequência de resistência a classe dos ITRNNs, corrigida por exposição, na primeira amostra de pacientes em falha virológica.

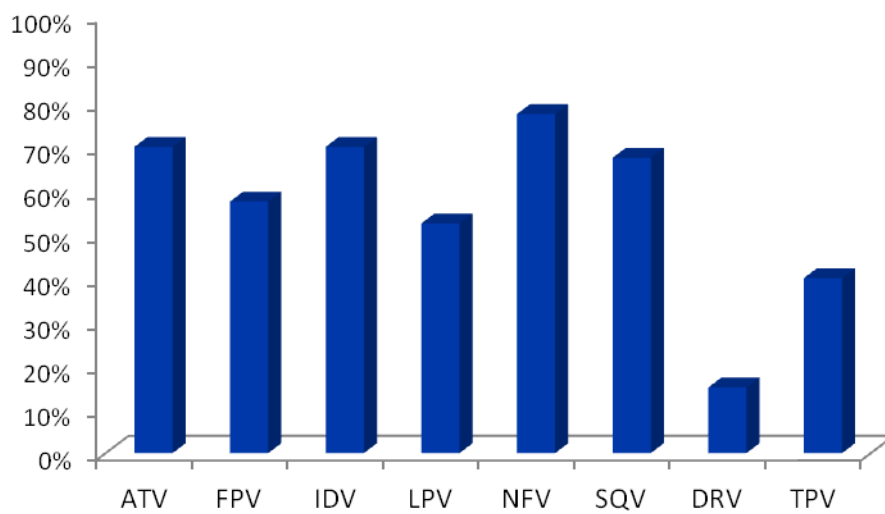


Figura 13. Frequência de resistência a classe dos IPs, corrigida por exposição, na primeira amostra de pacientes em falha virológica.

A análise da evolução do perfil mutacional foi verificada entre as duas últimas amostras disponíveis no laboratório, devido à maioria dos pacientes apresentarem várias entradas em períodos e tratamentos diversos. Para isso, foram considerados apenas os pacientes que tinham sido expostos às três classes de ARV em ambas as amostras (46%; 27/59). A mediana de tempo entre as coletas foi de 139 semanas.

Como alguns pacientes apresentavam mais de duas entradas no laboratório e foram expostos a tratamentos diferentes, para analisar o aumento de mutações associadas à resistência aos ARV foram selecionados apenas pacientes que apresentavam a amostra desfecho e uma amostra mais próxima ao desfecho, e que tinham sido expostos às três classes de ARV em ambas as amostras (46%; 27/59) do aumento. O intervalo de tempo médio entre as coletas das amostras foi de 139 semanas.

No período analisado, não foi observado ganho de mutações principais e secundárias para IP em 52% dos casos, para ITRN em 48% e para ITRNN em 70%. Nas duas amostras avaliadas, foi observada uma mediana de 3 mutações para a classe dos IP, 5 mutações para os ITRN e 2 mutações para os ITRNN.

As mutações principais mais observadas para a classe dos IP na amostra desfecho e na amostra anterior mais próxima ao desfecho foram a I54V/L (46% e 50%); M46I/L (42% e 58%) e V82A (39% e 43%). Aproximadamente 30% dos casos apresentavam a combinação das mutações I54V/L+M46I+V82A em pelo menos uma das amostras avaliadas, conferindo resistência aos medicamentos ATV, IDV, LPV, NFV, SQV e FPV. A mutação M46L foi observada em associação com as mutações I54V/L e V82A em dois casos, conferindo também resistência ao TPV, medicamento de segunda geração da classe dos IP.

Para a classe dos ITRN, mutações revertentes na posição T215 foram observadas em maior frequência (79% e 75%), seguido das mutações M184V (58% e 67%), D67N (58% e 58%), M41L (50% e 58%). Na amostra anterior ao desfecho, observou-se a presença de pelo menos uma TAM em 83% (20/24) dos casos, sendo que em cada amostra apresentou em média 3

TAMs. Não houve ganho de TAMs na amostra desfecho em 85% (17/20) dos casos.

As mutações associadas aos ITRNN foram pouco observadas nas amostras analisadas, com exceção da mutação K103N/H/R/S, que apresentou maior prevalência (52% e 48%) entre os casos.

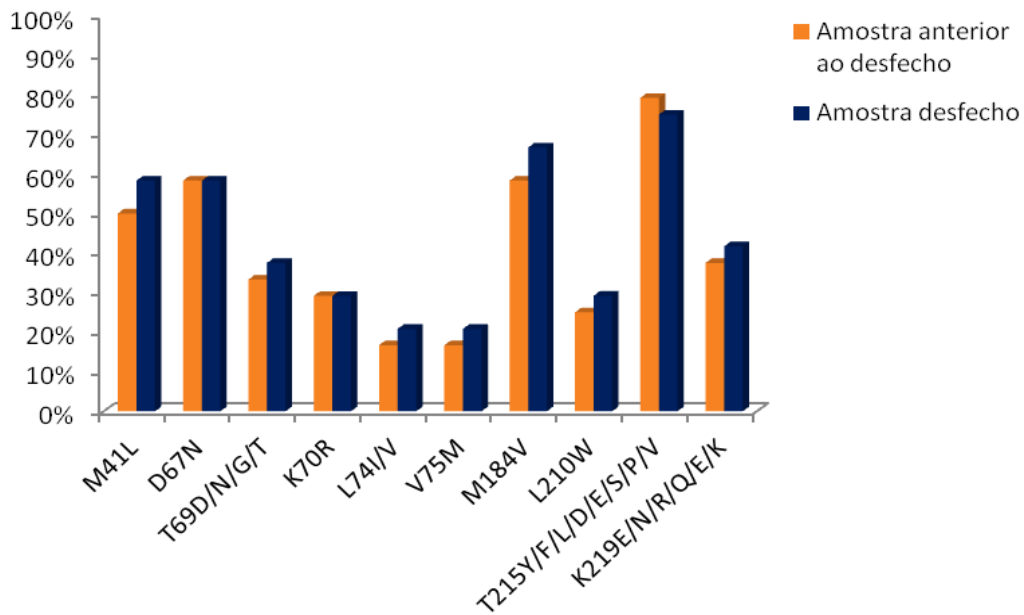


Figura 14. Frequência das mutações associadas aos ITRNs em amostras de pacientes expostos aos ITRNs, ITRNNs e IPs em falha virológica

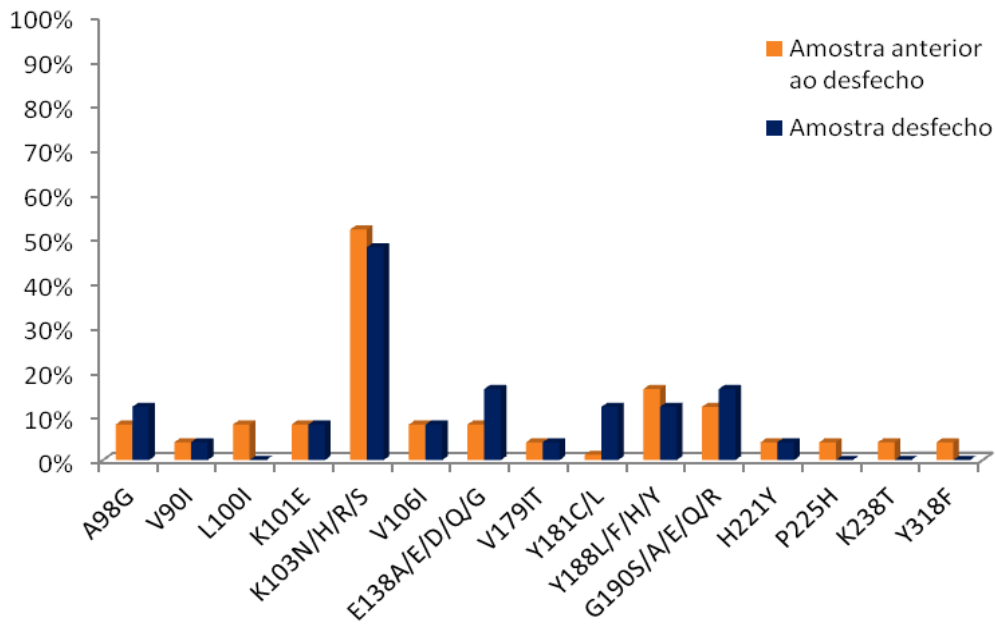


Figura 15. Frequência das mutações associadas aos ITRNN em amostras de pacientes expostos aos ITRNs, ITRNNs e IPs em falha virológica.

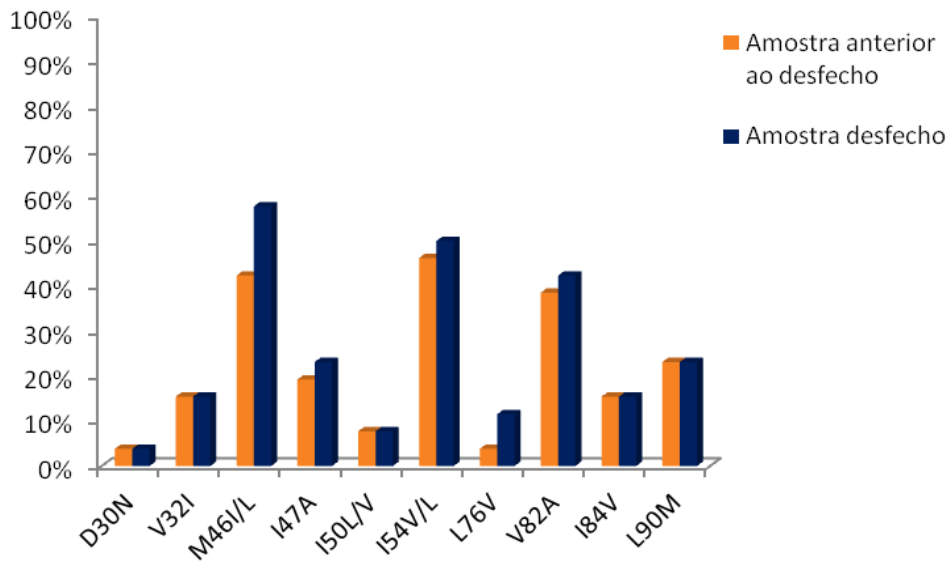


Figura 16. Frequência das mutações associadas aos IP em amostras de pacientes expostos aos ITRNs, ITRNNs e IPs em falha virológica.

4.3.4. Perfis de resistência no gene da protease em subtipos B e F

Em uma análise mais detalhada relacionando os diferentes subtipos virais e a resistência aos ARV, foi observada entre os indivíduos expostos a classe dos IP, uma frequência de resistência quase duas vezes maior em seqüências genéticas com subtipo F na região da protease, quando comparadas ao subtipo B (Figura 16). A diferença na proporção de casos com resistência entre os subtipos F e B foi significativa para todos os IP de primeira geração. Apesar de também se observar um aumento de casos com resistência entre os subtipos B e F para os IP de segunda geração DRV (13% vs. 27%) e TPV (30% vs. 50%), respectivamente, essa diferença não apresentou significância estatística.

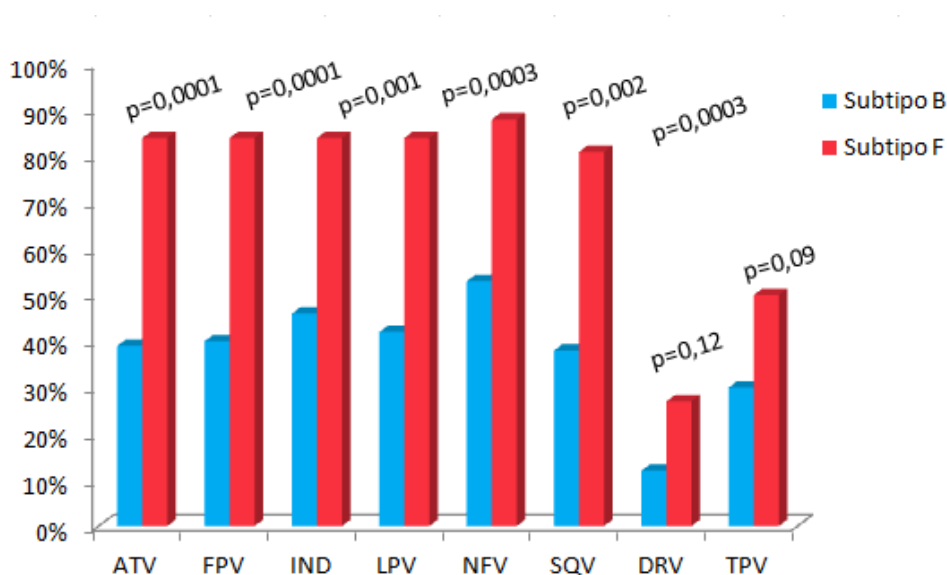


Figura 17. Frequência de resistência aos IPs entre os subtipos virais B e F na região da protease de amostras de pacientes em falha virológica.

Não houve diferenças entre os subtipos B e F em relação à idade dos indivíduos, sexo, tempo de tratamento, exposição aos IP, contagem de células T CD4⁺ céls/mm³ e carga viral (Tabela 3).

Tabela 3. Dados clínicos e laboratoriais de pacientes em falha virológica, classificados de acordo com o subtipo viral da amostra.

	Subtipo B (n=79)	Subtipo F (n=24)	p=
Gênero masculino (%)	44%	56%	0,34
Idade (IQR)	15 (12-17)	14 (12-17)	0,91
Tempo de tratamento em anos (IQR)	11 (8-13)	12 (10-13)	0,77
Número de tratamentos	4 (2-5)	4 (4-6)	0,12
Contagem de células T CD4 ⁺ (cél/s/mm ³)	439 (216-727)	373 (145-735)	0,64
Carga viral (log ₁₀)	4.14 (3.42-4.79)	3.78 (3.28-4.56)	0,26

Também foi observada uma maior porcentagem de mutações associadas aos IP em sequências do subtipo F, atingindo diferença estatística em mutações principais e secundárias (Figura 17 e 18). Devido à alta diversidade de mutações secundárias associadas à classe dos IP, foi ilustrado na figura 10 somente as mutações que apresentaram diferença estatística entre os subtipos. As mutações secundárias L63P e M36I representam polimorfismos que são frequentemente encontrados em sequências genéticas de indivíduos *naives* de ARV, infectados pelos subtipos B e F, respectivamente. As mutações principais M46I/L (B 31%; F 66%) e V82A (B 33%; F 62%) e secundárias T74P (B 1%; F 12%) e I54V (B 29%, F 52%) são associadas à resistência ao TPV e aparecem em uma frequência significativamente maior em amostras do subtipo F em comparação com amostras do subtipo B nesse estudo. Também foi observado esse padrão de aumento para as mutações associadas à resistência ao medicamento DRV: I47V (B 5%; F 8%), I50V (B 2%; F 12%), I54M/L (B 2% F 0%) e L76V (B 4%; F 8%). No entanto, essa diferença não foi significativa.

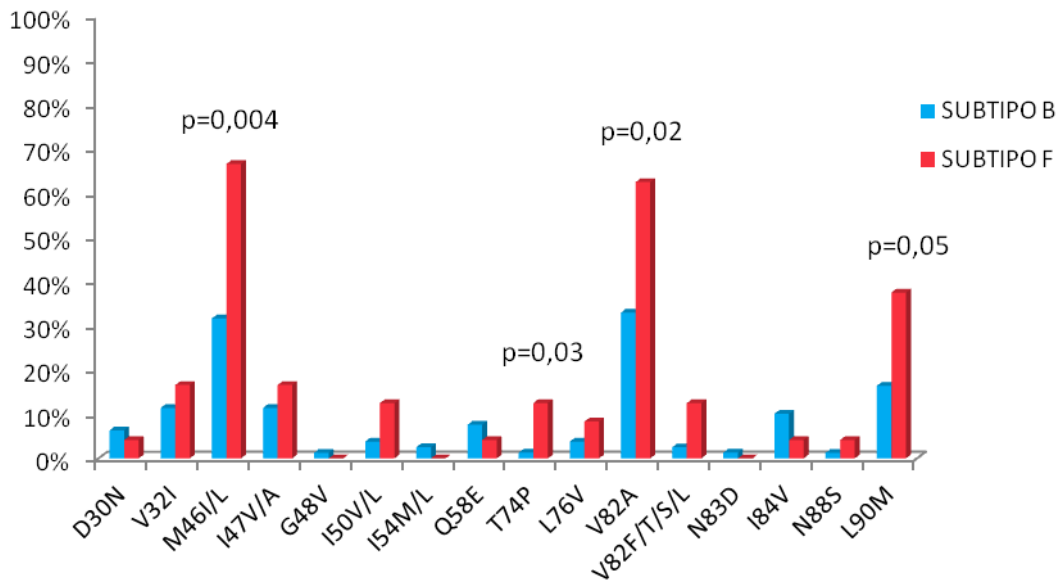


Figura 18. Frequência de mutações principais associadas aos IP entre subtipos virais B e F na região da protease de amostras de pacientes em falha virológica

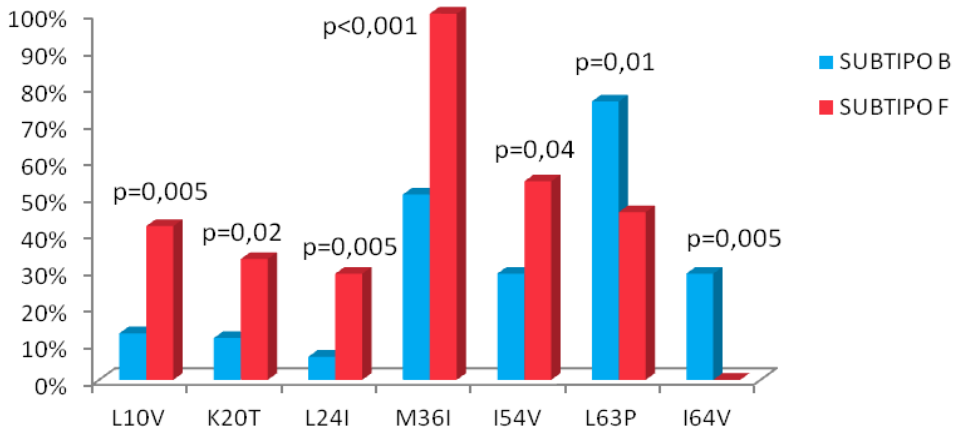


Figura 19. Frequência de mutações secundárias associadas aos IP entre subtipos virais B e F na região da protease de amostras de pacientes em falha virológica.

5. DISCUSSÃO

O amplo acesso à HAART possibilitou uma redução dos índices de mortalidade e morbidade em indivíduos infectados pelo HIV-1. No entanto, o aparecimento de vírus resistentes pode impactar a eficácia desses medicamentos, reduzindo as opções terapêuticas ao longo do tempo.

Crianças e adolescentes infectados por transmissão vertical representam uma população com baixa adesão à HAART e dificuldades em manter níveis adequados de ARV para obter supressão viral, o que favorece o desenvolvimento de resistência.

Poucos estudos foram realizados a fim de avaliar os níveis de resistência aos ARV em crianças e adolescentes *naïves* ou experimentados, assim como a relação entre a resistência com subtipos não-B. A maioria dos estudos avaliaram pacientes durante o período em que ainda era utilizada a terapia mono/dupla e a HAART era destinada a pacientes em condições clínicas mais graves. Atualmente, a HAART é preconizada a todos os pacientes, e apesar de ARVs de segunda geração e de novas classes terem sido desenvolvidos, no Brasil são indicados apenas para compor terapias de resgate. Além disso, alguns medicamentos não estão disponíveis para todas as faixas etárias. O monitoramento das mutações de resistência através do teste de genotipagem pode subsidiar a escolha e troca de esquemas terapêuticos, evitando o acúmulo de resistência e preservando o uso dos ARV, tendo em vista que nessa população as escolhas terapêuticas são limitadas.

Nesse estudo retrospectivo, foi avaliado no período de 2010 a 2014, a prevalência de resistência aos ARV em crianças e adolescentes experimentados e *naïves* à HAART.

Em relação aos indivíduos *naïves*, este estudo demonstrou que a taxa de resistência transmitida está de acordo com a taxa encontrada em publicações mais recentes, variando de 3% a 12,8% (Guimarães et al, 2015;

Soto Ramirez et al, 2010; Ferreira et al., 2010; Arruda et al., 2011; Almeida et al., 2012).

Não foi possível a obtenção de informações como o histórico de esquemas terapêuticos utilizados pela mãe antes da gestação, realização de profilaxia da transmissão vertical ou de um resultado prévio de teste de genotipagem. Essa limitação impossibilitou uma análise dos possíveis fatores de risco associados com a presença de resistência transmitida nessa população.

Considerando todas as mutações observadas pelos algoritmos utilizados em que foram avaliadas as amostras dos pacientes *naïves*, a maioria das amostras apresentou mutações secundárias associadas à classe dos IP, similar ao observado em outros estudos (Machado et al., 2004; Simonetti et al., 2003). Não se conhece ao certo o impacto dessas mutações no desenvolvimento de resistência aos ARV, mas a literatura descreve que algumas estão associadas com compensação da perda do fitness viral, e a presença de múltiplas pode reduzir a susceptibilidade aos IPs. (Mammano et al; 1998; Nijhuis et al., 1999; Chang et al., 2011; Shafer & Schapiro, 2008).

No nosso estudo, pôde ser notada uma alta proporção de amostras de subtipos não-B entre os casos *naïves* que apresentaram mutações secundárias para IP. Este resultado é esperado considerando que a maioria dessas posições são polimorfismos, ou seja, apresentam variações de acordo com o subtipo (Holguín et al., 2004; Parkin et al., 2004). Um exemplo é a mutação T74S, que ocorre em 8% das sequências com subtipo C, e é raramente vista em outros subtipos (Rhee et al., 2003). Essa mutação foi observada em duas amostras do subtipo C neste estudo.

Entre as mutações observadas para a classe dos ITRNN no grupo de pacientes *naïves*, a que demonstrou maior impacto na susceptibilidade foi a K103N. Esta mutação confere resistência aos ITRNNs de primeira geração (EFV e NVP), os quais são preconizados como primeira linha de tratamento

para compor o esquema terapêutico inicial no Brasil. Nestes casos, a identificação da mutação pela genotipagem é determinante para evitar a introdução de um medicamento com limitada eficácia terapêutica, possibilitando iniciar a HAART com a classe dos IP.

A mutação E138A, observada em uma amostra do subtipo C nesse grupo de pacientes, apesar de não causar alta resistência aos ITRNN como a K103N, reduz a susceptibilidade aos medicamentos de segunda geração (ETV e RPV) desta classe (Haddad et al., 2011; Tambuyzer et al., 2011). Essa mutação foi descrita no estudo de Guimarães e colaboradores (2015), onde foram avaliadas amostras de adultos e crianças *naïves* de terapia. No mesmo estudo, foram reanalisadas sequências de pacientes *naïves* obtidas no período de 2008 a 2009, previamente descritas por Ferreira e colaboradores (2012), e novamente foi possível verificar a presença dessa mutação (4%; 9/225), em taxas similares nos dois estudos. Nessas análises, a mutação E318A foi observada com maior frequência em amostras do subtipo B, em taxa mais elevada que a observada em estudos de outros internacionais, onde geralmente a mutação é mais frequente entre subtipos não-B (Lambert-Niclot et al., 2013; Sluis-Cremer et al., 2014). Sabendo que a ETV é indicada para tratamento de resgate, esse resultado sugere que essa mutação pode influenciar na resposta terapêutica de um resgate futuro e, portanto, seu possível impacto na terapia deve ser avaliado em mais estudos.

Para a classe dos ITRNs, foram observadas somente as mutações T69N/D e T215S, sendo que a T69N/D reduz a susceptibilidade ao AZT, DDI e/ou D4T (Naugler et al., 2002; Marcelin et al., 2005). Substituições na posição T215 são originadas pela reversão da mutação T215Y/F, a qual confere resistência ao AZT e D4T, e redução de susceptibilidade ao ABC, DDI, TDF. A presença dessas substituições, como a T215S, não está associada à redução de susceptibilidade aos ITRN, porém quando encontradas em amostras de pacientes *naïves* indicam que variantes com a mutação T215Y/F foram transmitidas inicialmente, e podem reemergir sob

pressão seletiva gerada pelo uso de ITRN. (Yerly et al., 1998; Garcia-Lerma et al., 2001)

Com relação ao grupo de pacientes expostos à HAART e em falha virológica, observou-se uma alta proporção de casos com resistência aos ITRNs, ITRNNs e IPs. Estes resultados corroboram com outros estudos brasileiros que avaliaram crianças e adolescentes em falha virológica que mostram uma elevada frequência de resistência aos ARV (Brindeiro et al., 2002; Simonetti et al. 2003, Machado et al., 2004; Machado et al., 2005; Oliveira et al., 2008; Almeida et al., 2009).

A adesão ao tratamento é considerada o fator mais importante para obter o sucesso terapêutico, e também um dos mais desafiadores no manejo de pacientes pediátricos. Embora informações sobre a adesão não tenham sido obtidas nesse estudo, as características da população avaliada como faixa etária e o longo tempo de exposição aos antirretrovirais, são fatores que podem influenciar na adesão e como consequência, estarem associados à elevada prevalência de resistência encontrada.

Na fase da adolescência é comum se observar baixa adesão aos ARV, especialmente em indivíduos com idade acima de 15 anos (Williams et al., 2006; Agwu et al., 2012). Isso se deve a questões que envolvem o comportamento dos cuidadores, a complexidade da posologia do esquema, intolerância aos medicamentos, revelação do diagnóstico, mudanças comportamentais relacionadas à idade, entre outros (Agwu et al., 2012).

Um outro ponto a se considerar é que uma parcela razoável de indivíduos avaliados neste estudo iniciou terapia ARV com terapia mono/dupla. Esses pacientes quando comparados aos que iniciaram a terapia HAART, apresentaram maior tempo de tratamento, idade e número de esquemas terapêuticos. O tratamento inicial com terapia mono/dupla pode ter favorecido o aparecimento de resistência aos ITRN e o acúmulo de mutações, dependendo do tempo de exposição. Dessa forma, o número de

trocas de esquemas terapêuticos pode ter aumentado, limitando as opções terapêuticas ao longo do tempo.

Nessa população de pacientes em falha virológica também se observou uma alta proporção de casos com resistência aos IP de segunda geração TPV e DRV, inclusive para indivíduos que ainda não foram expostos a esses medicamentos. Provavelmente, a resistência ao TPV foi observada em um maior número de casos em relação ao DRV, devido ao perfil de resistência ao TPV apresentar mais mutações que interferem em sua susceptibilidade (Courter et al., 2010; Neely & Kovacs, 2009).

Entre os medicamentos de segunda geração da classe dos ITRNN, o medicamento ETV também estava comprometido em uma parcela das amostras, sendo que apenas um paciente havia sido exposto a ETV. Isso indica que mutações associadas à resistência a ETV como a L100I e a K101P foram acumuladas ao longo do uso de NVP ou EFV, uma vez que geralmente ocorrem em combinação com a mutação K103N (Shafer & Schapiro, 2008). Esses resultados demonstram que essas amostras apresentam um perfil mutacional extenso e poucas opções terapêuticas disponíveis, o que dificulta a elaboração de terapias de resgate para esses pacientes.

Na avaliação da evolução imunológica e virológica dos pacientes que apresentavam mais de uma entrada no laboratório, foi possível notar que no período de aproximadamente quatro anos, a maior parte dos casos apresentou declínio de células TCD4⁺ e uma minoria teve redução da carga viral. Apesar de não ter sido avaliado o histórico de contagem de TCD4⁺ e de carga viral, esse dado sugere que os esquemas terapêuticos utilizados nesses pacientes podem ter sido inadequados para alcançar resposta imunológica e supressão viral, como também existe a hipótese desses pacientes não apresentarem adesão. Isso aponta que esse grupo necessita de uma atenção especial, uma vez que nessas condições apresentam maior risco de progressão da doença.

Na análise de susceptibilidade aos ARV da primeira amostra disponível desse grupo de pacientes, foi observado uma prevalência de resistência à maioria dos ARV das principais classes, demonstrando que uma parcela importante da população estudada apresentava poucas opções de ARV no momento da primeira genotipagem. Em relação à análise do perfil mutacional das amostras de pacientes expostos aos ITRN+ITRNN+IP na amostra desfecho e na amostra mais próxima ao desfecho, não foi observado ganho de mutação no período avaliado. Embora a amostragem desse grupo tenha sido pequena e o intervalo de tempo entre a entrada das amostras tenha sido relativamente curto para essa avaliação, o resultado observado é esperado sabendo que esses pacientes já haviam sido expostos a medicamentos das três classes.

Com relação à prevalência de subtipos observada nesse estudo, houve predominância de sequências do subtipo B, seguido do subtipo F, BF e C, conforme reportado em estudos prévios que avaliaram amostras de crianças e adolescentes de São Paulo e do Rio de Janeiro (Brindeiro et al., 2002; Machado et al., 2004; Almeida et al., 2009). A frequência observada da forma recombinante BF na literatura varia de 4 a 13%, no entanto em dois estudos foi reportada uma frequência variando de 20 a 38%, provavelmente pelo fato de terem sido avaliadas outras regiões genômicas do HIV-1 além da *polimerase*, o que pode ter aumentado a probabilidade de encontrar formas recombinantes (Sanabani et al., 2013; Oliveira et al., 2008).

Interessante notar que, no grupo de pacientes expostos aos ARV, dois casos apresentaram perfis recombinantes atípicos (recombinante AG e GJ), considerando os subtipos e formas recombinantes circulantes no Brasil. Os pacientes eram atendidos em Serviços de Assistência Especializada de São Paulo, porém, a amostra do subtipo recombinante GJ corresponde a um paciente natural da cidade de Luanda, situada no país de Angola, enquanto que a amostra do subtipo AG corresponde a um paciente natural da cidade de Itaquaquecetuba, em São Paulo.

Em uma parcela das amostras do nosso estudo não foi possível determinar o padrão de recombinação de subtipo pelas ferramentas utilizadas. O SIMPLOT é uma ferramenta amplamente utilizada em estudos que envolvem análises de recombinação, no entanto, existem limitações que podem interferir na determinação do subtipo, como o tamanho do fragmento analisado e a qualidade da sequência genética.

Entre as amostras classificadas como subtipo F na região da protease no nosso estudo, se observou uma maior prevalência de resistência e de mutações associadas aos IPs em comparação com amostras do subtipo B. A influência dos subtipos não-B em questões relacionadas ao desenvolvimento de resistência, resposta aos ARV, progressão da doença, transmissibilidade e outras características, ainda são pouco conhecidas na literatura (Bhargava et al., 2014).

Dumans e colaboradores (2009) avaliaram a frequência de mutações e polimorfismos associados à resistência na região da protease do subtipo B e F, em uma coorte de adultos e crianças *naïves* e em falha virológica, no período de 1998 a 2005. Nesse estudo, apesar de não ter sido observado diferença em relação à frequência de resistência entre os subtipos B e F, foi notado um desenvolvimento mais rápido de resistência aos IP em crianças quando comparado aos adultos. No entanto, algumas questões podem ter influenciado esse resultado, como a exposição a diferentes esquemas terapêuticos, e a adesão, que geralmente é mais baixa em crianças.

Em um estudo prospectivo de Lacerda e colaboradores (2007) envolvendo pacientes de Pernambuco que iniciaram a terapia HAART, foi avaliado o perfil de mutações das amostras do subtipo B e F e o desfecho clínico dos pacientes, após aproximadamente dois anos de tratamento. Apesar de ter sido observado uma maior frequência de mutações associadas aos IP nas posições 63, 77 e 71 de amostras do subtipo B, e nas posições 36 e 20 de amostras do subtipo F, essa diferença não refletiu no desfecho clínico. A proporção de pacientes que alcançaram supressão viral e aumento de células T CD4⁺ foi similar entre os grupos.

Resultados semelhantes foram observados em um estudo de Brindeiro e colaboradores (2002), onde foram avaliados os padrões de resistência em amostras dos subtipos B e não-B de crianças em falha virológica. Na região da protease, as mutações secundárias L10I/R/V/F, K20M/R, M36I foram observadas em maior frequência em subtipos não-B, enquanto que as mutações L63P, A71V/T e V77I foram mais frequentes no subtipo B.

No entanto essas posições encontradas são consideradas polimorfismos e alguns são comuns de ocorrer em subtipos não-B (Kantor et al., 2005). No nosso estudo foram encontradas tanto mutações secundárias, quanto mutações primárias associadas aos IPs, trazendo impacto na susceptibilidade aos ARV da classe. Pelo fato de não terem sido notadas diferenças quanto ao tempo de tratamento, carga viral, contagem de células T CD4⁺ e idade dos pacientes, uma hipótese a ser considerada é a de que em subtipos F, as mutações associadas aos IP podem se acumular mais rápido ao longo do tempo. Porém, devido à limitação do nosso desenho de estudo não foi possível responder essa questão.

Além disso, mais informações seriam necessárias como o tempo de exposição aos IPs, e dados laboratoriais pré-tratamento para avaliar se há impacto no uso de IP nessas crianças. Estudos prospectivos com uma amostragem maior de pacientes pediátricos sendo acompanhados são necessários para verificar a relevância clínica desse achado, bem como para direcionar condutas alternativas de tratamento em crianças e adolescentes infectados por esse subtipo viral.

6. CONCLUSÃO

A taxa de resistência transmitida observada nesse estudo demonstra a importância da realização do teste de genotipagem antes da introdução do esquema terapêutico inicial, especialmente na presença de mutações associadas à resistência aos ITRNN, que limitam o uso de medicamentos dessa classe. O monitoramento da resistência transmitida se faz necessário nessa população, assim como estudos que avaliem a influência de determinadas mutações e polimorfismos ao longo do seguimento clínico.

A elevada taxa de resistência aos ARV evidenciada nos pacientes em falha virológica desse estudo, inclusive na primeira amostra de alguns casos, associado ao declínio de células TCD4⁺ e pouca redução de carga viral indicam uma população com maior risco de progressão da doença e poucas opções terapêuticas disponíveis, sendo necessária uma atenção especial para esse grupo.

A alta prevalência de resistência aos IPs observada em amostras do subtipo F nesse estudo sugere que, nesses casos, o uso dos IP e resposta terapêutica a essa classe de medicamentos deve ser avaliada, visando evitar o rápido acúmulo de mutações e reduzir os riscos de falha terapêutica.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Almeida FJ, Berezin EN, Rodrigues R, Sáfadi MA, Arnoni MV, Oliveira C et al. Diversity and prevalence of antiretroviral genotypic resistance mutations among HIV-1-infected children. *Jornal de Pediatria*. 2009; 85:104-9.

Almeida FJ, Rodrigues R, Zaparoli MS, Berezin EN, Sáfadi MA, de Paula Ferreira JL et al. Prevalence of transmitted HIV-1 drug resistance mutations in children and adolescents in São Paulo, Brazil. *The Pediatric Infectious Disease Journal*. 2012; 31: e255-7.

Almeida FJ, Zaparoli MS, Moreira DH, Cavalcanti JS, Rodrigues R, Berezin EN, et al. Association of X4 tropism with disease progression in antiretroviral-treated children and adolescents living with HIV/AIDS in São Paulo, Brazil. *Braz J Infect Dis*. 2014;18:300-7.

Arruda E, Simões L, Sucupira C, Medeiros M, Arruda E, Diaz RS, et al. Short communication: intermediate prevalence of HIV type 1 primary antiretroviral resistance in Ceará State, Northeast Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2011; 27:153-156.

Azijn H, Tirry I, Vingerhoets J, de Béthune MP, Kraus G, Boven K, et al. TMC278, a next-generation nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor (ITRNN), active against wild-type and ITRNN-resistant HIV-1. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2010; 54: 718-727.

Bachelor LT, Anton ED, Kudish P, Baker D, Bunville J, Krakowski K, et al. Human immunodeficiency virus type 1 mutations selected in patients failing efavirenz combination therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2000; 44: 2475-2484.

Bagnarelli P, Valenza A, Menzo S, Manzin A, Scalise G, Varaldo PE, Clementi M. Dynamics of molecular parameters of human immunodeficiency virus type 1 activity in vivo. *Journal of Virology*. 1994, 68: 2495-2502.

Bennett DE, et al. Recommendations for surveillance of transmitted HIV drug resistance in countries scaling up antiretroviral treatment. *Antiviral Therapy*. 2008;13:25–36.

Brasil. Presidência da República, Lei nº 9313. Dispõe sobre a distribuição gratuita de medicamentos aos portadores de HIV e doentes de AIDS. Brasília (DF); 13 de novembro de 1996. D.O.U.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de DST e AIDS. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Manejo da Infecção pelo HIV em Crianças e Adolescentes. Brasília (DF); 2014a. [Disponível em www.aids.gov.br]

Brasil. Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. Coordenadoria de Controle de Doenças. Programa Estadual de DST/Aids-SP. Centro de Referência e Treinamento de DST/Aids-SP. Guia de Referências Técnicas e Programáticas para Eliminação da Transmissão Vertical do HIV. São Paulo (SP); 2014b. [Disponível em www.aids.gov.br]

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de DST e AIDS. Recomendações para Profilaxia da Transmissão Vertical do HIV e Terapia Antirretroviral em Gestantes. Brasília (DF); 2010. [Disponível em www.aids.gov.br]

Brasil. Ministério Da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Coordenação Nacional de DST e Aids. Guia de tratamento clínico da infecção pelo HIV em crianças. Brasília (DF); 2002. [Disponível em www.aids.gov.br]

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de DST e AIDS. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Manejo da Infecção Pelo HIV em Adultos. Brasília (DF); 2013.

Brígido LF, Franco HM, Custódio RM, Oliveira CA, Ferreira JLP, Eira M et al. Molecular Characteristics of HIV Type 1 Circulating in São Paulo, Brazil. *AIDS Research and Human Retroviruses*. 2005; 21: 673-682.

Brígido LF, Nunes CC, Oliveira CM, Knoll RK, Ferreira, JL, Freitas CA et al. Research Capacity Program. HIV type 1 subtype C and CR Pol recombinants prevail at the cities with the highest AIDS prevalence rate in Brazil. *AIDS Research and Human Retroviruses*. 2007; 23: 1579-1586.

Brindeiro PA, Brindeiro RM, Mortensen C, Hertogs K, De Vroey V, Rubini NPM et al. Testing Genotypic and Phenotypic Resistance in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Isolates of CR and Other Clades from Children Failing Antiretroviral Therapy. *Journal of Clinical Microbiology*. 2002; 40: 4512-4519.

Bhargava M, Cajas JM, Wainberg MA, Klein MB, Pant Pai N. Do HIV-1 non-B subtypes differentially impact resistance mutations and clinical disease progression in treated populations? Evidence from a systematic review. *Journal of the International AIDS Society*. 2014;17: 18944.

Bongertz V, Bou-Habib DC, Brígido LF, Caseiro M, Chequer PJ, Couto-Fernandez, JC et al. HIV-1 diversity in Brazil: genetic, biologic, and immunologic characterization of HIV-1 strains in three potential HIV vaccine evaluation sites. Brazilian Network for HIV Isolation and Characterization. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*. 2000; 23: 184-193.

Buchanan AL, Montepiedra G, Sirois PA, Kammerer B, Garvie PA, Storm DS, et al. Barriers to medication adherence in HIV-infected children and youth based on self- and caregiver report. *Pediatrics*. 2012;129:e124451.

Bunupuradah T, Duong T, Compagnucci A, McMaster P, Bernardi S, Kanjanavanit S, et al. Outcomes after reinitiating antiretroviral therapy in children randomized to planned treatment interruptions. *AIDS*. 2013;27:579-89.

Cahn P, Villacian J, Lazzani A, Katlama C, Grinsztejn B, Arasteh K, et al. Ritonavir-Boosted Tipranavir demonstrates superior efficacy to Ritonavir-Boosted protease inhibitors in treatment experienced HIV infected patients: 24 week results of the RESIST-2 Trial. *Clinical Infectious Diseases*. 2006; 43:1347-1356.

Canducci F, Ceresola ER, Boeri E, Spagnuolo V, Cossarini F, Castagna A, et al. Cross-resistance profile of the novel Integrase inhibitor dolutegravir (S/GSK1349572) using clonal viral variants selected in patients failing raltegravir. *Journal of Infectious Diseases*. 2011;204:1811–1815.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Guidelines for Prevention and Treatment of Opportunistic Infections among HIV-Exposed and HIV-Infected Children. September 4, 2009. Disponível em: <http://www.aidsinfo.nih.gov/>.

Chang MW, Torbett BE. Accessory mutations maintain stability in drug-resistant HIV-1 protease. *Journal of Molecular Biology*. 2011; 410: 756-60.

Chiappini E, Galli L, Zazzi M, de Martino M. Immunological recovery despite virological failure is independent of human immunodeficiency virus-type 1 resistant mutants in children receiving highly active antiretroviral therapy. *J Med Virol*. 2003; 70:506-12

Church JA, Hughes M, Chen J, Palumbo P, Mofenson L, Delora P, et al. Long term tolerability and safety of enfuvirtide for Human Immunodeficiency Virus 1-Infected Children. 2004; 23:713-718.

Clapham, PR & McKnight, A. HIV-1 receptors and cell tropism. *British Medical Bulletin*. 2001; 58: 43–59.

Cruz ML, Cardoso CA, Darmont MQ, Souza E, Andrade SD, D'Al Fabbro MM et al. Viral suppression and adherence among HIV-infected children and adolescents on antiretroviral therapy: results of a multicenter study. *Journal of Pediatrics (Rio J)*. 2014; 90: 563-71.

Dehority W, Deville JG, Lujan-Zilbermann J, Spector SA, Viani RM. Effect of HIV genotypic drug resistance testing on the management and clinical course of HIV-1 infected children and adolescents. *International Journal of STD & AIDS*. 2013; 24:549-553.

Delaugerre C, Rohban R, Simon A., Mouroux M, Tricot C, Agher R. Resistance profile and cross-resistance of HIV-1 among patients failing a non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor-containing regimen. *J Med Virol*. 2001; 65: 445-448.

De Oliveira CM, Almeida FJ, Rodrigues R, Crozatti M, Vazquez CM, do Socorro Carneiro Ferrão M, et al. High frequency of BF mosaic genomes among HIV-1-infected children from Sao Paulo, Brazil. *Arch Virol*. 2008;153:1799-806.

De Rossi A, Masiero S, Giaquinto C, Ruga E, Comar M, Giacca M et al. Dynamics of viral replication in infants with vertically acquired Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection. 1996; 97:323-330.

Derdeyn CA, Decker JM, Sfakianos JN, Wu X, O'Brien WA, et al. Sensitivity of human immunodeficiency virus type 1 to the fusion inhibitor T-20 is modulated by coreceptor specificity defined by the V3 loop of gp120. *Journal of Virology*. 2000; 74:8358-8367.

Doms, RW & Moore, JP. HIV-1 Membrane Fusion: Targets of Opportunity. *The Journal of Cell Biology*. 2000; 151: 9-13.

Dow D, Shayo AM, Cunningham CK, Reddy EA. Durability of antiretroviral therapy and predictors of virologic failure among perinatally HIV-infected children in Tanzania: a four-year follow-up. *BMC Infectious Diseases*. 2014; 14: 1-9.

Ernesto AS, Lemos RM, Huehara MI, Morcillo AM, Dos Santos Vilela MM, Silva MT. Usefulness of pharmacy dispensing records in the evaluation of adherence to antiretroviral therapy in Brazilian children and adolescents. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 2012; 16:315-20.

Ferreira JLP, Rodrigues R, Lanca AM, de Almeida VC, Rocha SQ, Ragazzo TG et al.: Transmitted drug resistance among people living with HIV/Aids at major cities of São Paulo State, Brazil. *Advances in Virology*. 2013: :878237.

Ferreira FG, Pinto JA, Kakehasi FM, Cleto S, Tupinambás U, Aleixo AW et al. Prevalence of primary drug resistance-associated mutations among HIV type 1 vertically Infected children in Belo Horizonte, Brazil. *AIDS Research and Human Retroviruses*. 2010; 26:229-32.

Filho LF, Nogueira SA, Machado ES, Abreu TF, de Oliveira RH, Evangelista L et al. Factors associated with lack of antiretroviral adherence among adolescents in a reference centre in Rio de Janeiro, Brazil. *International Journal of STD & AIDS*. 2008; 19: 685-8.

Garcia-Lerma JG, Nidtha S, Blumoff K, Weinstock H, Heneine W. Increased ability for selection of zidovudine resistance in a distinct class of wild-type HIV-1 from drug-naive persons. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2001; 98: 13907-12.

Guimarães PM, Ferreira JLP, Coelho LPO, Cavalcanti JS, Lopes GISL, Matsuda EM, et al. Transmitted Drug Resistance Among Recently Diagnosed Adults and Children in Sao Paulo, Brazil. *AIDS Research And Human Retroviruses*. 2015; 31: 1-7.

Haddad M, Napolitano LA, Paquet AC, Evans MD, Petropoulos CJ, Whitcomb J et al. Impact of HIV-1 reverse transcriptase E138 mutations on rilpivirine drug susceptibility. *Antiviral Therapy*. 2011.

Hanna GJ, D'Aquila RT. Clinical use of genotypic and phenotypic drug resistance testing to monitor antiretroviral chemotherapy. *Clinical Infectious Diseases*. 2001; 32: 774-782.

Hazra R, Siberry GK, Mofenson LM. Growing Up with HIV: Children, Adolescents, and Young Adults with Perinatally Acquired HIV Infection. *Annual Review of Medicine*. 2010; 61: 169-185.

Heidari S, Mofenson LM, Hobbs CV, Cotton MF, Marlink R, Katabira E. Unresolved Antiretroviral Treatment Management Issues in HIV-1 Infected Children. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndrome*. 2012, 59:161-169.

Courter JD, Teevan CJ, Li MH, Giroto JE, Salazar JC. Role of tipranavir in treatment of patients with multidrug-resistant HIV. *Journal of Therapeutics and Clinical Risk Management*. 2010; 6: 431–441.

Kantor R, Katzenstein DA, Efron B, Carvalho AP, Wynhoven B, Cane P, Impact of HIV-1 subtype and antiretroviral therapy on protease and reverse

transcriptase genotype: results of a global collaboration. *Plos Medicine*. 2005; 2: 325–337.

Koot M, Keet IP, Vos AH, de Goede RE, Roos MT, Coutinho RA, et al. Prognostic Value of HIV-1 Syncytium-inducing Phenotype for Rate of CD4+ Cell Depletion and Progression to AIDS. *Annals of Internal Medicine*. 1993; 118: 681-8.

Kopka J, Batalla M, Mangano A, Mecikovsky D, Bologna R, Sen L. Relevance of viral phenotype in the early AIDS outcome of pediatric HIV-1 primary infection. *Pediatric Research*. 2002;52:475-80.

Korber B, Gaschen B, Yusim K, Thakallapally R, Kesmir C, Detours V. Evolutionary and immunological implications of contemporary HIV-1 variation. *British Medical Bulletin*. 2001; 58: 19-42.

Lacerda HR, Medeiros LB, Cavalcanti AM, Ximenes RA, Albuquerque M de F. Comparison of the epidemiology, profile of mutations, and clinical response to antiretrovirals among subtypes B and F of the human immunodeficiency virus type 1. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2007;102: 693-9.

Lambert-Niclot S, Charpentier C, Storto A, et al. Prevalence of pre-existing resistance-associated mutations to rilpivirine, emtricitabine and tenofovir in antiretroviral naïve patients infected with B and non-B subtype HIV-1 viruses. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2013; 68: 1237–1242.

Lau, KA & Wong, JYL. Current Trends of HIV Recombination Worldwide. *Infectious Disease Report*. 2013, 5: s1e4.

Lessells RJ, Katzenstein DK, Oliveira T. Are subtype differences important in HIV drug resistance?. *Current Opinion in Virology*. 2012, 2: 636-643.

Lewinson, W. & Jawetz, E. *Microbiologia Médica e Imunologia*. 7ªed. Porto Alegre. Artmed. 2005. Cap.45, p 295-303.

Los Alamos National Laboratory. HIV Sequence Database. Disponível em <http://www.hiv.lanl.gov> [Acessado em 07 de março de 2015]

Luzuriaga K, McQuilken P, Alimenti A, Somasundaran M, Hesselton R, Sullivan JL. Early viremia and immune responses in vertical human Immunodeficiency Virus Type 1 infection. *Journal of Infectious Diseases*. 1993; 167:1008–1013.

MacArthur RD, Novak RM. Maraviroc: the first of a new class of antiretroviral agents. *Clinical Infectious Diseases*. 2008; 47: 238-41.

Machado E, Lambert JS, Watson DC, Afonso AO, Cunha SM, Nogueira, AS et al. Genotypic Resistance and HIV-1 subtype in Brazilian children on dual and triple combination therapy. *Journal of Clinical Virology*. 2004; 30:24-31.

Machado DM, Fernandes SC, Succi RCM, Freire WS, Pannuti CS, Gouveia AB, et al. Analysis of HIV- type 1 Protease and Reverse Transcriptase in Brazilian children failing Highly Active Antiretroviral Therapy (HAART). *Revista do Instituto de Medicina Tropical*. 2005; 47:1-5.

Mammano F, Petit C, Clavel F. Resistance-associated loss of viral fitness in human immunodeficiency virus type 1: phenotypic analysis of protease and gag coevolution in protease inhibitor-treated patients. *Journal of Virology*. 1998; 72:7632-7.

Markowitz M. Targeting Integrase: Mechanisms of action and mechanisms of resistance to Integrase inhibitors. *Clinical Care Options*, 2008.

McCune JM, Rabin LB, Feinberg MB, Liernerman M, Kosek JC, Reyes GR, et al. Weissman, I. Endoproteolytic Cleavage of gp 160 is Required for the Activation of Human Immunodeficiency Virus. *Cell*. 1988; 53: 55-67

Mellins CA, Tassiopoulos K, Malee K, Moscicki AB, Patton D, Smith R, et al. Behavioral health risks in perinatally HIV-exposed youth: co-occurrence of Sexual and Drug Use Behavior, Mental Health Problems, and Nonadherence to Antiretroviral Treatment. 2011; 25: 413-422.

Neely M, Kovacs A. Managing treatment-experienced pediatric and adolescent HIV patients: role of darunavir. *Journal of Therapeutics and Clinical Risk Management*. 2009; 5: 595–615.

Miller V. Resistance to protease inhibitors. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology*. 2001; 26:S34-S50.

Molla A, Korneyeva M, Gao Q, Vasavanonda S, Schipper PJ, Mo HM, et al. Ordered accumulation of mutations in HIV protease confers resistance to ritonavir. *Nature Medicine*. 1996; 2:760-766.

Morgado, MA.; Sabino, EC.; Shpaer, EG.; Bongertz, V.; Brigido, L.; Guimaraes, MDC.; Castilho, EA.; Galvão-Castro, B.; Mullins, JI.; Hendry, RM.; Mayer, A. 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 Research and Human Retroviruses*. 1994; 10: 569-576.

Naugler WE, Yong FH, Carey VJ, Dragavon JA, Coombs RW, Frenkel LM. T69D/N pol mutation, human immunodeficiency virus type 1 RNA levels, and syncytium-inducing phenotype are associated with CD4 cell depletion during didanosine therapy. *Journal of Infectious Diseases*. 2002; 185: 448-55.

Neely M, Kovacs A. Managing treatment-experienced pediatric and adolescent HIV patients: role of darunavir. *Journal of Therapeutics and Clinical Risk Management*. 2009; 5: 595-615.

Nijhuis M, Schuurman R, de Jong D, Erickson J, Gustchina E, Albert J et al. Increased fitness of drug resistant HIV-1 protease as a result of acquisition of compensatory mutations during suboptimal therapy. *AIDS*. 1999; 13:2349-59.

Niubo J, Li W, Henry K, Erice A. Recovery and Analysis of Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV) RNA Sequences from Plasma Samples with Low HIV RNA Levels. *Journal Of Clinical Microbiology*. 2000; 38: 309–312.

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

Oliveira CM, Almeida FJ, Rodrigues R, Crozatti M, Vazquez CMP, Ferrão MSC, Campeas AE, Marques SR, Berezin EN, Brigido LFM. High frequency of BF mosaic genomes among HIV-1-infected children from Sao Paulo, Brazil. *Archives of Virology*. 2008; 153:1799–1806.

Ortigão de Sampaio M.B., Castello-Branco L.R.R. Imaturidade imunológica fetal e neonatal: implicações na evolução clínica da infecção pelo HIV-1 em crianças. *Revista da Associação Médica Brasileira*. 1997; 43: 29-34.

Paediatric European Network for Treatment of AIDS. Response to planned treatment interruptions in HIV infection varies across childhood. *AIDS*. 2010;24:231-241.

Patterson DL, Swindells S, Mohr J, Brester M, Vergis EN, Squier C, et al. Adherence to protease inhibitor therapy and outcomes in patients with HIV infection. *Annals of Internal Medicine*. 2000; 133: 21-30.

Palladino C, Briz V, González-Tomé MI, León Leal JA, Navarro ML, José MI et al. Short Communication: Evaluation of the effect of enfuvirtide in 11 HIV-1 vertically infected pediatric patients outside clinical trials. *AIDS Research and Human Retroviruses*. 2010; 26: 301-305.

Parkin NT, Schapiro JM. Antiretroviral drug resistance in non-subtype B HIV-1, HIV-2 and SIV. *Antiviral Therapy*. 2004; 9: 3-12.

Pedroso C, Queiroz ATL, Alcântara LC, Drexler JF, Diaz RS, Weyll NB. High Prevalence of Primary Antiretroviral Resistance Among HIV-1-Infected Adults and Children in Bahia, a Northeast State of Brazil. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*. 2007; 45: 251-253.

Pilcher CD, Eron Jr JJ, Galvin S, Gay C, Cohen MS. Acute HIV revisited: new opportunities for treatment and prevention. *The Journal of Clinical Investigation*. 2004; 113: 937 – 945.

Pizzo PA, Wilfert CM. Markers and determinants of disease progression in children with HIV infection. *Journal of Acquired immune deficiency syndromes and human retrovirology*. 1995; 8: 30-44.

Potthoff AV, Brockmeyer NH. Current therapy of HIV. *Journal of the German Society of Dermatology*. 2009.

Rhee SY, Gonzales MJ, Kantor R, Betts BJ, Ravela J, Shafer RW. Human immunodeficiency virus reverse transcriptase and protease sequence database. *Nucleic Acids Research*. 2003; 31: 298-303.

Rudy BJ, Murphy DA, Harris DR, Muenz L, Ellen J. Prevalence and interactions of patient-related risks for nonadherence to antiretroviral therapy among perinatally infected youth in the United States. *AIDS Patient Care STDS*. 2010;24:97104.

Rizzuto, CD. A Conserved HIV gp120 Glycoprotein Structure Involved in Chemokine Receptor Binding. *Science*. 1998; 280: 1949-53.

Rodrigues R, Vazquez CMP, Colares JK, Custodio RM, Bonásser FF, Souza LR, et al. Antiretroviral resistance mutations in human immunodeficiency virus type 1 infected patients enrolled in genotype testing at the Central Public Health Laboratory, São Paulo, Brazil: preliminary results. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 2005;100:97-102.

Sabino, EC.; Shpaer, EG.; Morgado, MG.; Korber, BTM.; Diaz, RS.; Bongertz, V.; Cavalcante, S.; Galvão-Castro, B.; Mullins, JI.; Mayer, A. Identification of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Envelope Genes Recombinant between Subtypes B and F in Two Epidemiologically Linked Individuals from Brazil. *Journal of Virology*. 1994; 68: 6340-46.

Sanabani SS; Pessoa R.; Oliveira, ACS.; Martinez, VP.; Giret, MTMG.; Succi, RCM, et al. Variability of HIV-1 Genomes among Children and Adolescents from São Paulo, Brazil. 2013; 8: e62552.

Shahriar R1, Rhee SY, Liu TF, Fessel WJ, Scarsella A, Towner W et al. Nonpolymorphic human immunodeficiency virus type 1 protease and reverse transcriptase treatment-selected mutations. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2009; 53:4869-78.

Sluis-Cremer N, Jordan MR, Huber K, et al.: E138A in HIV-1 reverse transcriptase is more common in subtype C than B: Implications for rilpivirine use in resource-limited settings. *Antiviral Research*. 2014; 107: 31–34.

Tambuyzer L, Nijs S, Daems B, Picchio G, Vingerhoets J. Effect of mutations at position E138 in HIV-1 reverse transcriptase on phenotypic susceptibility and virologic response to etravirine. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*. 2011;58: 18-22.

Rojas Sánchez P, Holguín A. Drug resistance in the HIV-1-infected paediatric population worldwide: a systematic review. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2014; 69:2032-42.

Schacker T, Collier AC, Hughes J, Shea T, Corey L. Clinical and epidemiologic features of primary HIV infection. *Annals of Internal Medicine*. 1996;125: 257-264.

Shafer, R. Review of HIV Drug Resistance with references. 2003. Disponível em:
www.hivdb.stanford.edu/modules/lookUpFiles/pdf/GenotypicResistance.pdf.

Shearer WT, Quinn TC, LaRussa P, Lew JF, Mofenson L, Susan A *et al*. Viral load and disease progression in infants infected with human immunodeficiency virus type 1. *The New England Journal of Medicine*. 1997; 336: 1337 – 1342.

Sierra S, Kupfer B, Kaiser R. Basics of virology of HIV-1 and its replication. *Journal of Clinical Virology*. 2005; 34: 233-244.

Silverberg MJ, Neuhaus J, Bower M, Gey D, Hatzakis A, et al. Risk of cancers during interrupted antiretroviral therapy in the SMART study. *AIDS*. 2007; 21:1957-63.

Simonetti SR, Schatzmayr HG, Simonetti JP. Human immunodeficiency virus type 1: drug resistance in treated and untreated Brazilian children. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2003; 98:831-7.

Steegeen K, Demecheleer E, De Cabooter N *et al.*: A sensitive in-house RT-PCR genotyping system for combined detection of plasma HIV-1 and assessment of drug resistance. *Journal of Virological Methods*. 2006;133(2):137-45.

Soto-Ramirez LE, Rodriguez-Diaz R, Harris DR, Hazra R. HIV Drug Resistance-Associated Mutations in Antiretroviral Naïve HIV-1-Infected Latin American Children. *Advances in Virology*. 2010; 2010: 407476.

Talbot A, Grant P, Taylor J, Baril JG, Liu TF, Charest H. *et al.* Predicting Tipranavir and Darunavir Resistance Using Genotypic, Phenotypic, and Virtual Phenotypic Resistance Patterns: na Independent Cohort Analysis of Clinical Isolates Highly Resistant to All Other Protease Inhibitor. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2010; 54: 2473–2479.

Taylor, BS.; Sobieszczyk, ME.; McCutchan, FE.; Hammer, SM. The challenge of HIV-1 subtype diversity. *New England Journal of Medicine*. V.15, p. 1590-602, 2008.

Tiemessen CT, Kuhn L. Immune pathogenesis of pediatric HIV-1 infection. *National Institute of Health*. 2006; 3: 13–19.

The Pursuing Later Treatment Options (PLATO II) Project Team for the Collaboration of Observational HIV Epidemiological Research Europe (COHERE). Risk of triple-class failure in children with HIV: a retrospective cohort study. 2011; 377:1580-1587.

UNAIDS/ WHO. Joint United Nations Programme on HIV/AIDS (UNAIDS)/ World Health Organization (WHO). 2013. Report on the Global AIDS Epidemic. [Disponível em <http://www.unaids.org>]

Underwood MR, Johns BA, Sato A, Martin JN, Deeks SG, Fujiwara T. The activity of the integrase inhibitor dolutegravir against HIV-1 variants isolated from raltegravir-treated adults. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2012; 3: 297–301.

U.S. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. Antiretroviral drugs used in the treatment of HIV infection. [Acessado em 07 de março de 2015]

Van't Wout AB, Kootstra NA, Mulder-Kampinga GA, Albrecht-van Lent N, Scherpbier HJ, Veenstra J, et al. Macrophage-tropic Variants Initiate Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection after Sexual, Parenteral, and Vertical Transmission. *The Journal of Clinical Investigation*. 1994; 94: 2060–7.

Vicente, ACP.; Otsuki, K.; Silva, NB.; Castilho, MC.; Barros, FS.; Pieniazek, D.; Hu, Dale.; Rayfield, MA.; Bretas G.; Tanuri A. The HIV Epidemic in the Amazon Basin Is Driven by Prototypic and Recombinant HIV-1 Subtypes B and F. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*. 2000; 23: 327-331.

Wensing AM, Calvez V, Günthard HF, Johnson VA, Paredes R, Pillay D, et al. Update of the drug resistance mutations in HIV-1: July 2014. *Topics in Antiviral Medicine*. 2014; 22:642-650.

WHO-UNAIDS. World Health Organization (WHO)/ Joint United Nations Programme on HIV/AIDS (UNAIDS). Guidelines for Standards HIV Isolation and Characterization Procedures. 2002.

Wong FL, Hsu AJ, Pham PA, Siberry GK, Hutton N, Agwu AL. Antiretroviral treatment strategies in highly treatment experienced perinatally HIV-infected youth. *The Pediatric Infectious Diseases Journal*. 2012; 31: 1279–83.

Yerly S, Rakik A, De Loes SK, Hirschel B, Descamps D, Brun-Vezinet F et al. Switch to unusual amino acids at codon 215 of the human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase gene in seroconvertors infected with zidovudine-resistant variants. *Journal of Virology*. 1998; 72: 3520-3.

Zdanowicz M. M. The pharmacology of HIV drug resistance. *The American Journal of Pharmaceutical Education*. 2006; 5: 1–9.

ANEXOS

ANEXO I

ANEXO II

ANEXO III

ANEXO IV

ANEXO 1 – Classificação da Infecção pelo HIV em crianças

Tabela 1. Classificação da infecção pelo HIV em crianças e adolescentes menores de 13 anos (CDC, 1994; Brasil 2014a)

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

Categorias clínicas

➤ Categoria N – Assintomática:

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

➤ Categoria A – Sinais e/ou sintomas leves:

Presença de dois ou mais das condições abaixo, porém sem nenhuma das condições das categorias B e C:

- linfadenopatia (maior que 0,5 cm em mais de 2 cadeias diferentes);
- hepatomegalia;
- esplenomegalia;
- parotidite;
- infecções persistentes ou recorrentes de vias aéreas superiores (otite média ou sinusite).

➤ Categoria B – Sinais e/ou sintomas moderados:

- anemia (Hb < 8g/dl), neutropenia (<1.000/mm³) ou trombocitopenia (<100.000/mm³), por mais de 30 dias;
- meningite bacteriana, pneumonia ou sepse;
- TB pulmonar (critérios CDC modificados pelo MS)
- candidíase oral persistindo por mais de 2 meses;
- miocardiopatia;
- infecção por Citomegalovírus (CMV), antes de 1 mês de vida;
- diarreia recorrente ou crônica;
- hepatite;
- estomatite pelo vírus do Herpes Simples (HSV) recorrente (mais do que 2 episódios/ano);
- pneumonite ou esofagite por HSV, com início antes de 1 mês de vida;
- herpes zoster, com 2 episódios ou mais de um dermatomo;
- pneumonia intersticial linfocítica (LIP);
- nefropatia;
- nocardiose;
- febre persistente (> 1 mês);
- toxoplasmose antes de 1 mês de vida; e
- varicela disseminada ou complicada.

➤ Categoria C – Sinais e/ou sintomas graves.

Crianças com quaisquer das condições listadas abaixo:

- Infecções bacterianas graves, múltiplas ou recorrentes (confirmadas por cultura, 2 episódios em intervalo de 1 ano): sepse, pneumonia, meningite, infecções osteoarticulares, abscessos de órgãos internos;
- candidíase esofágica ou pulmonar;
- coccidioidomicose disseminada;
- criptococose extra-pulmonar;
- criptosporidíase ou isosporíase com diarreia (> 1 mês);
- CMV em locais além do fígado, baço ou linfonodos, a partir de 1 mês de vida;
- encefalopatia pelo HIV (achados que persistem por mais de 2 meses), em razão de:

- déficit do desenvolvimento neuropsicomotor;
 - evidência de déficit do crescimento cerebral ou microcefalia adquirida identificada por medidas de perímetro cefálico ou atrofia cortical mantida em tomografias computadorizadas ou ressonâncias magnéticas sucessivas de crânio; E
 - déficit motor simétrico com 2 ou mais dos seguintes achados: paresias, reflexos patológicos, ataxia e outros;
 - infecção por HSV, úlceras mucocutâneas com duração maior do que 1 mês ou pneumonite ou esofagite (crianças > 1 mês de vida);
 - histoplasmose disseminada;
 - Mycobacterium tuberculosis disseminada ou extrapulmonar;
 - Mycobacterium, outras espécies ou não identificadas, disseminadas;
 - Mycobacterium avium ou M. kansasii disseminados;
 - pneumonia por Pneumocystis jiroveci;
 - salmonelose disseminada recorrente;
 - toxoplasmose cerebral com início após o 1º mês de vida;
 - síndrome da caquexia, manifestada por:
 - perda de peso > 10% do peso anterior;
 - queda de dois ou mais percentis nas tabelas de peso para a idade;
 - peso abaixo do percentil 5, em duas medidas sucessivas;
 - diarreia crônica (duração maior que 30 dias);
 - febre por 30 dias ou mais, documentada.
 - leucoencefalopatia multifocal progressiva;
 - sarcoma de Kaposi;
 - linfoma primário do cérebro ou outros linfomas.

Categories imunológicas

Baseiam-se na contagem de células CD4 de acordo com a idade, conforme quadro abaixo:

Tabela 2. Categorias imunológicas da classificação da infecção pelo HIV em crianças e adolescentes menores de 13 anos.

Alteração Imunológica	Contagem de LT-CD4+		
	Idade		
	< 12 meses	1 a 5 anos	6 a 12 anos
Ausente (1)	> 1500 (> 25%)	≥ 1000 (≥ 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%)

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
PARA RESPONSÁVEIS POR MENORES (CRIANÇAS E ADOLESCENTES)**

I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE

Nome: _____
 Prontuário: _____ R.G: _____
 Data de nascimento: ____/____/____ Sexo: M F
 Responsável Legal: _____
 Natureza (grau de parentesco, tutor, etc.): _____
 Autoriza contato: () sim () não
 Nome para contato: _____
 Telefone de contato: _____

II – DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

Título: **“RESISTÊNCIA GENOTÍPICA NO RESGATE TERAPÊUTICO (DE PACIENTES
INFECTADOS PELO HIV) COM NOVAS CLASSES DE ANTIRRETROVIRAIS”**

Pesquisadores Responsáveis:

Dra. Alexandre Campeas
 Instituto de Infectologia Emilio Ribas-São Paulo. SES/SP

Dr. Luis Fernando de Macedo Brígido
 Instituto Adolfo Lutz – SES/SP

III - Explicações ao Paciente:

Seu filho(a), ou menor que se encontra sob sua responsabilidade, está sendo convidado(a) a participar de uma pesquisa sobre tratamento da infecção pelo HIV. Durante a leitura deste termo de consentimento, você poderá interromper o investigador (a pessoa que está lendo) para esclarecer eventuais dúvidas.

Este estudo esta sendo realizado pelo Instituto de infectologia Emílio Ribas, em conjunto com o Instituto Adolfo Lutz e outras instituições públicas, e seus objetivos principais são:

- melhorar o entendimento dos tratamentos par o HIV em nosso Estado, em especial crianças que já usaram diferentes terapias e necessitam de novos medicamentos para o controle da infecção.
- avaliar os diferentes tratamentos, sua forma de uso e seu impacto no vírus HIV.
- Avaliar a estrutura do HIV (tipos, resistência aos medicamentos antirretrovirais) e das estruturas do organismo expostas aos medicamentos, visando identificar características que podem influenciar a resposta ao tratamento.

O conhecimento desses dados, além de fornecer informações importantes para as ações de controle da epidemia de HIV/Aids, poderá permitir também, através de exame que avalia mudanças na estrutura do HIV, a orientação do tratamento antirretroviral a ser oferecido, se necessário.

Este projeto será conduzido por equipes de pesquisadores dos institutos envolvidos sob a responsabilidade do Dr. Alexandre Campeas do Instituto de Infectologia Emilio Ribas e do Dr. Luis Fernando de Macedo Brígido do Instituto Adolfo Lutz, ambos da SES/SP.

Participação no estudo:

A participação neste estudo implica em análise do sangue, que será, sempre que possível junto, com sobras de coleta sangue para exames de rotina ou na coleta de um tubo adicional e na obtenção de informações sobre o voluntário.

Entrevista: A entrevista tem por finalidade obter dados adicionais não documentados em seu prontuário, como informações sócio-demográficos (local de moradia, anos de escolaridade, data de nascimento, cor/raça), para esclarecer a forma de transmissão e em especial a forma de utilização de medicação.

Coleta de sangue: Quando não for possível usar sobras de exames de rotina, serão coletados aproximadamente 4mL de sangue (o equivalente a uma colher de sopa), para realizar os exames relacionados a esse estudo. Nesse material serão realizados exames laboratoriais para verificar características do vírus, como o subtipo do HIV e de seu perfil de resistência a medicações e eventualmente das células e produtos dessas responsáveis pelo controle da infecção.

A coleta será feita como as coletas de rotina, e sempre que possível junto com essas para evitar novas coletas. Serão realizadas com agulhas descartáveis por profissional capacitado, de modo a minimizar os riscos inerentes a este procedimento tais como: dor pela punção, hematomas e flebites (inflamação no local onde foi feita a picada para a coleta de sangue. O material coletado dos pacientes será estocado para uso apenas para as finalidades acima descritas. Para qualquer outro uso será apresentado novo Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, caso você autorize o contato, e esse uso só será efetuado com a aprovação do voluntário e dos comitês pertinentes. O biorrepositório estará sob a guarda do Dr. Luis Fernando de Macedo Brígido, no instituto Adolfo Lutz, prédio da Virologia, segundo andar, sob refrigeração. Se algum exame, no futuro, for identificado ou desenvolvido que possa beneficiar o voluntário, o material estará a disposição do voluntário, após concordância dos comitês pertinentes.

O estudo não implica em riscos do ponto de vista clínico, e a participação é voluntária, podendo seu consentimento ser retirado a qualquer momento, sem que isto traga prejuízo ao atendimento do paciente ou à continuação de seu tratamento. Dentro do objetivo da pesquisa, no 6º e 12º mês após a entrada no estudo deverão ser realizadas avaliações sobre o vírus e

marcadores da infecção, de preferência obtidas durante exames de rotina, e para isso você será novamente consultado. No entanto, a autorização a essa coleta atual não o obriga a aceitar coletas posteriores. Mesmo que você não concorde com o estudo aqui proposto os exames necessários a sua saúde você e seu médico venham a solicitar e que estiverem ao nosso alcance realizar serão feitos e encaminhados a seu médico.

Por favor, assinalar com "X" se você concorda (SIM) ou não concorda (NÃO), em participar da pesquisa, no 6º e 12º mês após a entrada no estudo:

Resultados e sigilo dos dados:

Os coordenadores deste estudo se comprometem a disponibilizar os resultados de exames, tão logo estes estejam prontos.

O estudo garante a confidencialidade dos dados obtidos. Em nenhum momento serão tornados públicos dados relacionados à sua identidade como nome, endereço, entre outros identificadores.

IV – Consentimento Pós Esclarecido

Declaro que, após a leitura do texto acima e após ter sido convenientemente esclarecido, concordo na participação deste projeto de pesquisa.

Local e data: _____, ____/____/____.

Assinatura do responsável: _____

Pesquisador que obteve o consentimento:

(nome) _____

(assinatura) _____

Qualquer dúvida favor entrar em contato com Dr. Alexandre Campeas no telefone (011) 38961200, ou com Dr. Luis Brígido , no telefone (011) 30682982.

Dr. Alexandre Campeas
Instituto de Infectologia Emilio Ribas-São Paulo. SES/SP

TERMO DE ASSENTIMENTO INFORMADO

O assentimento informado para a criança/adolescente não substitui a necessidade de consentimento informado dos pais ou guardiães. O assentimento assinado pela criança demonstra a sua cooperação na pesquisa.

Assentimento informado para _____
(Nome da criança/adolescente)

Este formulário de assentimento informado é para crianças/adolescentes entre idades até 18 anos que comparecerão no serviço de saúde do Instituto Emílio Ribas e que estamos convidando a participar da pesquisa **“RESISTÊNCIA GENOTÍPICA NO RESGATE TERAPÊUTICO DE PACIENTES INFECTADOS PELO HIV-1 COM NOVAS CLASSES DE ANTIRRETROVIRAIS”**

Parte I

Introdução

Eu, Alexandre Campéas, responsável médico pelo serviço onde você é atendido, estou fazendo uma pesquisa para estudar como é o vírus e como o tratamento que você usa modifica esse vírus. Nós também queremos entender como suas defesas respondem a esse vírus. Tudo isso também será importante para o desenvolvimento de melhores formas de lidar com essa situação. Este estudo analisa os genes do vírus. Genes são estruturas bem pequenas onde ficam armazenadas todas as informações genéticas dos seres vivos, sejam eles, animais, plantas ou mesmo o HIV. Eu gostaria de informar você e convidá-lo a participar desta pesquisa. Você pode escolher se quer participar ou não. Discutimos esta pesquisa com seus pais ou responsáveis e eles sabem que também estamos pedindo seu acordo. Se você vai participar na pesquisa, seus pais ou responsáveis também terão que concordar. Mas se você não desejar fazer parte na pesquisa, não é obrigado, até mesmo se seus pais concordarem.

Você pode discutir qualquer coisa deste formulário com seus pais, amigos ou qualquer um com quem você se sentir a vontade de conversar. Você pode decidir se quer participar ou não depois de ter conversado sobre a pesquisa e não é preciso decidir imediatamente. Pode haver algumas palavras que não entenda ou coisas que você quer que eu explique mais detalhadamente porque você ficou mais interessado ou preocupado. Por favor, peça que eu pare a qualquer momento e eu explicarei.

Objetivos

Estudar as características do vírus HIV.

Escolha dos participantes

Estamos querendo entender melhor o vírus de pessoas que usaram vários tratamentos para o HIV, como é o seu caso.

Voluntariedade de Participação

Você não precisa participar desta pesquisa se não quiser. É você quem decide. Se decidir não participar da pesquisa, é seu direito e nada mudará no seu tratamento de saúde. Mesmo assim, este serviço de saúde estará disponível para você. Até mesmo se disser “sim” agora, poderá mudar de idéia depois, sem nenhum problema.

Procedimentos

Seu médico irá anotar as informações de seu Prontuário Médico, de forma confidencial, não sendo identificado o seu nome em nenhum momento, durante ou após o estudo, garantindo a sua privacidade e anonimato. Informações adicionais poderão ser solicitadas em uma entrevista, mas você não é obrigado a responder. Serão utilizados códigos para sua identificação, sendo permitido o acesso apenas ao respectivo médico e aos responsáveis pelo estudo.

Eventual coleta de sangue (1-2 tubos de sangue de 5 ml cada), o correspondente a menos que duas colheres de sopa poderá ser solicitada para alguns pacientes. Você pode negar essa coleta adicional sem prejuízo do estudo ou do seguimento clínico da criança. Com o material biológico armazenado, quando necessário serão realizados outros testes de genotipagem em diferentes genes do vírus. Os resultados serão enviados ao seu médico que informará você, sempre que forem realizados. Não será realizado nenhum outro exame que não esteja dentro deste projeto de pesquisa.

Os exames de rotina de CD4 e Carga Viral serão solicitados para que você colha regularmente, possivelmente nos meses 3, 6 e 9, como após a introdução ou mudança do tratamento.

Riscos

Testes de genotipagem já foram realizados em adultos e crianças e não existe nada relativo a esses que nos preocupe. É necessário, contudo uma coleta de sangue para a sua realização, e essa apresenta os riscos de qualquer coleta de sangue, tais como dor e vermelhidão no local da aplicação. Sempre que possível usaremos material coletado junto a exames de rotina para evitar tais desconfortos. Porém, se você estiver preocupado ou com alguma dúvida, fique à vontade em procurar à mim, a enfermeira ou seu médico para falar sobre isso, além de poder negar ou pedir para interromper a coleta mesmo após iniciada.

Desconfortos

Usaremos para essa pesquisa o sangue que será coletado para seus exames de rotina sempre que possível, evitando o desconforto de mais uma coleta. A aplicação da agulha poderá doer por algum tempo e o local da picada poderá ficar vermelho e duro. Porém, esse desconforto deverá desaparecer em até 1 dia. Se a dor no local persistir ou houver inchaço, você deverá comunicar isso a mim ou aos seus pais.

Eu conferi se a criança/adolescente entendeu os riscos e desconfortos da pesquisa:

___ sim ___ não

Confidencialidade

Não falaremos para outras pessoas que você está nesta pesquisa e também não compartilharemos informação sobre você para qualquer um que não trabalha na pesquisa. As informações sobre você serão coletadas na pesquisa e ninguém, exceto os investigadores poderão ter acesso a elas. Qualquer informação sobre você terá um número ao invés de seu nome. Só os investigadores saberão qual é o seu número e manteremos em sigilo. Ela não será compartilhada com quem quer que seja exceto, alguém que tenha permissão de acesso à informação, sempre de forma anônima tais como: órgãos governamentais e médicos da equipe.

Benefícios e compensação

O entendimento de algumas das características do vírus poderá trazer informações que poderão auxiliar a conduta do seu médico quanto a melhor escolha do tratamento. Essas informações serão repassadas a seu médico. O seu atendimento será o usual, e qualquer resultado que possa beneficiar você será também repassado a seu médico. Não estão previstas compensações e benefícios adicionais do estudo.

Divulgação dos resultados

Quando terminarmos a pesquisa, eu sentarei com você e seus pais e falaremos sobre o que aprendemos com a pesquisa. Eu também lhe darei um papel com os resultados por escrito. Depois, iremos falar com mais pessoas, cientistas e outros, sobre a pesquisa. Faremos isto escrevendo e compartilhando relatórios e indo para as reuniões com pessoas que estão interessadas no trabalho que fazemos.

Direito de recusa ou retirada do assentimento informado

Você não tem que estar nesta pesquisa. Ninguém ficará irritado ou desapontado com você se você disser não, a escolha é sua. Você pode pensar nisto e falar depois se você quiser. Você pode dizer “sim” agora e mudar de idéia depois e tudo continuará bem.

Contato

Você pode me perguntar agora ou depois fazer as perguntas para a enfermeira. Eu escrevi um número de telefone e endereço onde você pode nos localizar ou, se você estiver por perto, você poderá vir e nos ver. Se você quiser falar com outra pessoa tal como o seu professor ou doutor ou tia, não tem problema. Dr. Alexandre: (11) 3896-1380

Endereço: Instituto de Infectologia Emílio Ribas
Av. Dr. Arnaldo, 165, São Paulo – SP
Prédio do Ambulatório

Parte II - Certificado do Assentimento

Eu entendi que a pesquisa é sobre testes de genotipagem que podem ajudar no entendimento da doença. Eu entendi que eu darei uma amostra de sangue através de uma picada no braço.

Nome/Assinatura da criança/adolescente: _____
_____ Data: __/__/__

Nome/Assinatura do pesquisador: _____
_____ Data: __/__/__

Nome/Assinatura do profissional que obteve o assentimento: _____
_____ Data: __/__/__



SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENADORIA DE CONTROLE DE DOENÇAS
INSTITUTO ADOLFO LUTZ

Comitê de Ética em Pesquisa - CEPIAL

Av. Dr. Arnaldo, 355 – Sala 83 - Cerqueira César - 01246-902

Fone: 3068-2859 e-mail: cepi@ial.sp.gov.br



São Paulo, 17 de março de 2011.

Protocolo: 018/2011

Projeto de Pesquisa: “Resistência genotípica no resgate terapêutico de pacientes infectados pelo HIV com novas classes de antirretrovirais”.

Pesquisador Responsável: Luís Fernando de Macedo Brígido

Instituição: Instituto Adolfo Lutz

O Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Adolfo Lutz - CEPIAL analisou e deliberou em reunião ordinária de 17 de março de 2011, de acordo com a Resolução CNS nº 196 de 10 de outubro de 1996 e suas resoluções complementares, o projeto na categoria **APROVADO**.

Em conformidade com o item IX. 2 da Resolução CNS nº 196/96 - cabe ao pesquisador: a) desenvolver o projeto conforme delineado; b) elaborar e apresentar os relatórios parciais e final; c) apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; d) manter em arquivo, sob sua guarda, por 5 anos, os dados da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; e) encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; f) justificar, perante o CEP, interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

Os relatórios parciais deverão ser encaminhados ao CEPIAL a cada seis meses a partir do início da pesquisa.

Luz Marina Trujillo

Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos
Instituto Adolfo Lutz – CEPIAL

1ª via – coordenador

2ª via - CEPIAL

LMT/dvmp



COORDENADORIA DOS SERVIÇOS DE SAÚDE
INSTITUTO DE INFECTOLOGIA "EMILIO RIBAS"

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Av. Dr. Arnaldo, 165 - Cerqueira César - São Paulo - SP

CEP: 01246-900 - TEL: 3896-1406

E-mail: comitedeetica-ier@ig.com.br

PARECER

PROCOLO DE PESQUISA N.º 15/2012

PARECER N.º 243/2012

Data: 03/10/2012

Título da Pesquisa: "Resistência genotípica no resgate terapêutico com novas classes de antiretrovirais"

Investigador Responsável: Dr. Alexandre Ely Campéas

CONSIDERAÇÕES: O Comitê de Ética em Pesquisa considera respondida a pendência do parecer anterior referente ao Termo de Assentimento e Aprova o estudo e a nova versão do Termo de Assentimento.

(X) APROVADO

() REPROVADO

() COM PENDÊNCIAS- OBS.: a ausência de resposta em 60 dias, acarretará em arquivamento do processo por falta de interesse do pesquisador.

TEMÁTICA ESPECIAL

SIM NÃO

CONEP

SIM NÃO

SVS (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA) SIM NÃO


Dra. Anna Christina Nunes D'Ambrosio
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisas - I.I.E.R.

Transmitted Drug Resistance Among Recently Diagnosed Adults and Children in São Paulo, Brazil

Paula Morena de Souza Guimarães,¹ João Leandro de Paula Ferreira,¹ Luana Portes Ozório Coelho,¹ Jaqueline de Souza Cavalcanti,¹ Giselle Ibetete Silva Lopez Lopes,¹ Elaine Monteiro Matsuda,² Flávia Jacqueline Almeida,³ Valéria Correia Almeida,⁴ Alexandre Ely Campeas,⁵ Luiz Carlos Pereira Junior,⁵ Luís Fernando de Macedo Brígido,¹ and the São Paulo Salvage Workgroup

Abstract

Transmitted drug resistance mutations (TDRM) have been a constant threat to treatment efficacy. We evaluated TDRM in plasma RNA of 217 antiretroviral therapy-naïve patients from sites in the São Paulo metropolitan area, collected from 2012 to 2014. The partial HIV-1 polymerase region was sequenced using Big Dye terminators at an ABI 3130 Genetic Analyzer. TDRM was defined according to the Stanford database calibrated population resistance (CPR v.6.0), but other drug resistance mutations (DRM) considered at the IAS list (IAS, 2014) and at the Stanford HIV Database Genotyping Resistance Interpretation (GRI-HIVdb) were also described. Out of 78% (170/217) of patients with information on the time of diagnosis, most (83%, 141/170) had been recently diagnosed, with the first positive HIV serology at a median of 58 days (IQR 18–184). Subtype B predominated (70%), followed by subtype F (10%), BF (7.5%), C (7.5%), and BC (5%). TDRMs were observed in 9.2% (20/217, CI 95% 5.9% to 13.6%), mostly (5.2%) to nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor (NNRTI) antiretroviral class. Among children and adolescents, only a single patient showed TDRMs. Additional non-CPR mutations were observed: 11.5% (25/217) according to IAS or 4.6% (10/217) according to GRI-HIVdb. Overall, 23.5% (51/217) of the cases had one or more DRM identified. TDRM prevalence differed significantly among some sites. These trends deserve continuous and systematic surveillance, especially with the new policies of treatment as prevention being implemented in the country.

Introduction

WITH ENHANCED ACCESS to antiretroviral therapy (ART), reductions in morbidity and mortality related to HIV infection have become even clearer, improving the quality of life of patients living with HIV/AIDS. However, the development of resistance to antiretroviral drugs and the potential for its transmission have been constant threats as they may reduce therapy efficacy.^{1,2} The pretreatment genotypic test identifies resistance that might compromise initial therapy, and upon treatment failure allows a better virological response with a genotypic test-guided therapy.³ However, its cost and accessibility have limited its widespread use in resource-limited settings. Monitoring the prevalence trends of transmitted drug resistance mutations (TDRM) could help in the identification of more adequate

antiretroviral combinations and generate prevalence estimates that, when reaching a given threshold, indicate the need for the introduction of the pretreatment genotypic test as part of routine care.^{4–25}

In Brazil, most studies in TDRM prevalence documented low to intermediate rates,^{4,7–9,10,15,19,25} but different potential limitations can compromise comparability of these studies such as differences in sample size and recruitment design. We reevaluate, using a similar methodology, previous study sites⁴ and new ones in the major metropolitan area of São Paulo, Brazil.

Materials and Methods

Blood samples from 226 HIV-1 antiretroviral therapy-naïve patients were collected from May 2012 to July 2014 in

¹Retrovirus Laboratory, Virology Center, Adolfo Lutz Institute, São Paulo, Brazil.

²Santo André Aids Program, São Paulo, Brazil.

³Division of Pediatric Infectious Diseases, Santa Casa de São Paulo Hospital, São Paulo, Brazil.

⁴DST/Aids Reference Center, Campinas, Brazil.

⁵Emílio Ribas Infectious Diseases Institute, São Paulo, Brazil.

three areas of the São Paulo metropolitan area: (1) sites in the city of São Paulo; (2) sites in neighboring cities southeast of São Paulo, ABCD (Santo Andre, São Bernardo do Campo, São Caetano do Sul, and Diadema); and (3) sites in Campinas, the second largest metropolitan area in the state, about 100 km from São Paulo. The study enrolled consecutive HIV-1 antiretroviral therapy-naive patients of all age groups recruited specifically for the study or from physicians' request as part of the clinical follow-up. Clinical and demographic data were obtained at baseline visit when informed consent was obtained from subjects or either parents or guardians. Patients younger than 12 years old were categorized as children, 12 years to 18 years as adolescents, and those over 18 years old as adults. Time from first HIV serological diagnosis allowed classifying patients as recent (less than 2 years from diagnosis) and long-term HIV infection (over 2 years from diagnosis).

Sequences were obtained from plasma viral RNA, extracted (QIAmp viral RNA mini kit, Qiagen, Hilden, Germany) and amplified with an "in-house" adapted methodology. The amplification of the partial HIV polymerase region (codons 1–235 related to HXB2, accession number K03455) was obtained using primers previously described^{5,24} in an adapted nested polymerase chain reaction (PCR).^{4,25} The reverse transcriptase (RT)-PCR was performed using 10 µl of viral RNA in a 50 µl volume reagent mix containing 10× PCR buffer High Fidelity, 50 mM MgSO₄, 10 mM dNTP's (Life Technologies, USA), 0.1 M DTT, 10 U RNase inhibitor (New England Biolabs, UK), 50 U RT SuperScript III (Life Technologies, USA), 1.25 U Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity (Life Technologies, USA), and 10 µM of primers (GAG2: 5'-GAGGAAGCTGCAGAATGGG-3' forward) and (RT137: 5'-TTCTGTATGTCATTGACAGTCCAGC-3' reverse). The RT-PCR was carried out at 50°C for 30 min and 94°C for 5 min, followed by amplification cycles: 18 cycles at 94°C for 30 s, 50°C for 30 s, 68°C for 2 min 30 s; 17 cycles at 94°C for 30 s, 53°C for 30 s, 68°C for 2 min 30 s, and a final extension at 68°C for 10 min.

A 2.5 µl volume of the RT-PCR product was used in a nested PCR performed with Go Taq Green Master Mix 2X (Promega Biosciences, CA) and 10 µM of primers (PR3: 5'-AGAGCCAACAGCCCCACCA-3' forward) and (RT12: 5'-ATCAGGATGGAGTTCATAACCCATCCA-3' reverse). The nested PCR was carried out at 94°C for 3 min followed by 35 cycles of at 94°C for 30 s, 55°C for 30 s, 72°C for 1 min 30 s, and a final extension at 72°C for 10 min.

An unique fragment of approximately 1,112 bp was sequenced with Big Dye using eight primers to cover the partial pol region (codon 1 to 235). Sequences were manually edited using Sequencher 4.7 software (Gene Codes, USA). Ambiguous DNA bases (mixtures) were considered at sequence edition and were counted as a resistance-associated codon when one or more deduced amino acids were considered resistance mutations.

HIV genotyping resistance test results (Stanford HIV database genotype resistance report, GRI-HIVdb) were reported to the clinical sites to subsidize clinical follow-up. TDRMs were defined according to the Calibrated Population Resistance Version 6.0 (CPR, Stanford Database, SDRM 2009), a specifically designed algorithm for the epidemiologic surveillance of HIV-1 transmitted drug resistance mutations (DRM). DRMs listed in bold in the International

Antiviral Society (IAS, 2014) and the Stanford HIV Database Genotyping Resistance Interpretation (GRI-HIVdb) were also described to evaluate additional mutations that might have an impact on ART treatment.

HIV-1 subtyping was initially performed with NCBI Genotyping and REGA HIV Subtyping tools and confirmed with phylogenetic analysis using BEAST v1.7.4, under the GTR+I+G model. Recombinant patterns were evaluated by SimPlot (v. 3.5.1 recombination software).

Statistical analysis

Data were analyzed with Epi Info 6 (CDC, Atlanta, GA), applying a level of statistical significance of 0.05, two tailed. Categorical variables were tested using Yates or Fisher's exact test. Results of continuous variables were expressed as the median and interquartile range (IQR). Mid-p 95% was used to calculate the confidence interval.

Ethical approval

This study was approved by Ethical and Research Committees of Adolfo Lutz Institute, Secretary of Health of São Paulo, Brazil and participating institutions.

Results

From 226 HIV-1 antiretroviral therapy-naive patients enrolled in this study, we could successfully amplify and perform 217 (96%) partial HIV-1 *pol* sequences, except for one case with only the protease region.

Demographic characteristics are depicted in Table 1. Three women enrolled in the study had previous exposure to short-term use of ART for mother-to-children transmission prophylaxis, all of them without detected resistance mutations; one additional male patient (BRSP417-14) with long-term infection was found subsequently to have had a previous 1 month prescription of zidovudine (AZT)+ didanosine (ddI). This case had a secondary non-CPR IP mutation considered by the Stanford Database algorithm to confer potential low-level resistance to tipranavir. Ten women (4.6%) were pregnant, but none of them had been exposed to ART prophylaxis at blood collection. Perinatal infection was found mostly among children (11/17, 64.7%) and then adolescents (2/14, 14.2%), with some adolescents (3/14, 21.4%) reporting homosexual behavior.

From 217 patients, 78% (170/217) had information about the time of diagnosis; most (141/170, 83%) had been recently diagnosed, with the first positive HIV serology at a median of 58 days (IQR 18–184), with 17% (29/170) classified as long-term infection (median 1998 days, IQR 1281–3523).

As observed in previous studies,^{4,7–10} subtype B predominated in 70% (130/186) of HIV-1 *pol* sequences among adults, with subtypes C and F in 15/186 (8%) and 14/186 (7.5%), respectively. Recombinant forms of subtype BF were observed in 13/186 (7%) cases and BC in 11/186 (6%). HIV-1 *pol* sequences from children and adolescents also showed a predominance of subtype B in 64.5% (20/31), but a significantly higher prevalence of subtype F (26%, 8/31) ($p=0.005$) as compared to adults. Three isolates (9.4%) were subtype BF and one subtype was C.

According to CPR, TDRM was detected in 20/217 (9.2%) isolates, with 65% (16/20) subtype B. TDRM was not

TABLE 1. DEMOGRAPHIC AND LABORATORY DATA BY AGE GROUP

	Adults (n=186)	Children and adolescents (n=31)	Total (n=217)
Age (years)	31 (25–38)	9 (4–14)	29 (22–37)
Male gender [n (%)]	141 (75.8)	15 (48.5)	156 (72)
CD4 cell count (cells/mm ³)	496 (354–745)	569 (392–1168)	506 (354–778)
Viral load (log ₁₀)	4.40 (3.82–4.97)	4.68 (4.43–5.07)	4.52 (3.91–4.99)
HIV risk factor [n (%)]			
MSM/bisexual	92 (49.5)	3 (9.7)	95 (43.7)
Heterosexual male	20 (10.8)	0 (0)	20 (9.2)
WSM	28 (15)	0 (0)	28 (12.9)
Perinatal	0 (0)	13 (41.9)	13 (6.0)
No information	43 (24.7)	15 (48.4)	61 (28.2)
HIV-1 subtype [n (%)]			
B	132 (70.9)	19 (61.2)	150 (70)
F	14 (7.5)	8 (25.8)	22 (10)
C	14 (7.5)	2 (6.5)	16 (7.5)
Recombinant BF	15 (8.0)	2 (6.5)	16 (7.5)
Recombinant BC	11(6.0)	0 (0)	11 (5.0)

Demographic and laboratory characteristics of patients studied by age group. Values are expressed as median (25th–75th IQR) or number of cases (percentage in parentheses). MSM, men who have sex with men; WSM, woman who have sex with men.

observed in subtype C isolates, but was present in subtype F, BC, and BF recombinants. The prevalence of TDRM was higher at the Campinas site (7/44, 16%) compared to the ABCD site (5/99, 5%) ($p=0.047$; if only adults are considered, $p=0.056$). At São Paulo metropolitan area TDRM was 11% (8/74). Mutations to nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTI) were most frequent (4.6%, 10/217), with a higher prevalence of the K103N mutation (43%, 9/21). The prevalence of TDRM to the nucleoside reverse transcriptase inhibitor (NRTI) class was 3.6% (8/217) and to the protease inhibitor (PI) class 1.8% (4/217) (Table 2). Two-class resistance was uncommon, and was observed in only two cases (0.9%, one NRTI+PI and one NNRTI+PI, Table 2). When only children or adolescents were considered, only 1/31 (3%) sequences had a CPR-defined mutation.

When we compared previous reported estimates⁴ among adults from sites evaluated in this study, we found a non-significant trend in Campinas (15/156, 9.6% in 2009 and 7/44, 15.9% in 2013; $p=0.3$). In the city of São Paulo a significant increase in TDRM prevalence was observed, from 3% (2/69) to 14% (7/50) ($p=0.03$). The ABCD sites had no previous evaluation.

DRMs listed in bold in the IAS list (2014) were found in 37/217 (17%) of HIV-1 sequences, with 3/31 (9.6%) among children and adolescents. Some of these sequences also had other CPR mutations. Most of these non-CPR mutations (60%, 22/37) were associated with newer drugs of the NNRTI class, such as E138A (4.6%, 10/217), V179D/E/L (2.3%, 5/217), and H221Y (0.46%, 1/217). Ten cases presented at least one additional amino acid substitution considered by the GRI-HIVdb.

Regarding the NRTI drug class, a limited impact in susceptibility is expected as we observed an important loss of susceptibility only when two or more mutations were present, with the exception of mutation M184V, which itself confers high resistance to lamivudine. In the protease region some polymorphisms were found (Q58E and K43T) that are associated with low/potential-low resistance to tipranavir, a new generation PI drug. One case exhibited high resistance to

lopinavir with the L76V mutation and another one showed three PI resistance mutations, which conferred resistance to all first generation PI drugs.

Discussion

Monitoring ART resistance among untreated individuals is an important public health tool, but comparability among studies is subject to different bias that may influence results, as the sampling in geographic areas with an uneventful distribution of TDRM and, equally important, potential heterogeneity among patients' subpopulations.⁵ One major factor is the stringency in the exclusion of previously exposed individuals, a problem that does not seem to be trivial when this issue is properly evaluated.⁶ We reevaluated clinical information from all cases with detectable resistance mutations to exclude ARV exposure, but we included few cases in which short-term ARV exposure was documented, with none presenting mutations associated with regimens used.

We tried to expand our monitoring by the inclusion of new sites, but we reevaluated previous studied sites, maintaining the recruitment and other inclusion and exclusion criteria as close as possible to a former study from 2009⁴ to allow a follow-up evaluation. The new geographic area included here comprised four middle-sized cities (ABCD). This work is the first study including this specific area, which showed a lower TDRM estimate.

Our study demonstrates a TDRM prevalence of 9.2%. Overall, our estimates are similar to those reported from many other studies in Brazil, with intermediate estimates ranging from 5% to 15%.^{4,7–9} A study among HIV-infected blood donors in Brazil found a TDRM prevalence of 19.4%, the highest reported in São Paulo,¹⁰ but the confidence interval (CI 95%) for this estimate ranged from 9.5% to 29.2%. TDRM levels higher than 15%, as observed in our study for Campinas, but also with large CI 95%, have been reported in some Brazilian cities, such as Santos and Salvador.^{11,12} One of these studies¹¹ was based on a small sample size (only 47 cases per site) and the other¹² included non-CPR mutations in

TABLE 2. PATIENTS' SEQUENCES WITH DRUG RESISTANCE MUTATIONS

Patient ID	Age/gender	Site	DRM mutation found			Subtype
			NRTI	NNRTI	PI	
BRSP098-12	23/M	ABCD	<i>V106I</i>			F
BRSP147-12	31/F	ABCD	T215I , <i>V106IV</i>			B
BRSP237-12	25/M	Campinas	M184I			B
BRSP249-12	37/M	Campinas		<i>K103N</i>		B
BRSP252-12	32/F	Campinas		<i>V108I</i>		B
BRSP260-12	62/F	São Paulo	<u>K70N</u>			B
BRSP308-12	32/M	Campinas	<u>N/A</u>	<i>N/A</i>	<i>L76V</i>	B
BRSP310-12	31/F	Campinas		<i>K103N</i>		BF
BRSP316-12	31/M	Campinas		<u>V179DE</u>		B
BRSP319-12	29/M	Campinas		K103N		B
BRSP323-12	33/M	Campinas			<i>Q58E</i>	B
BRSP326-12	26/F	Campinas			<i>Q58E</i>	B
BRSP431-12	52/M	Campinas	<i>V106I</i>			F
BRSP433-12	36/F	Campinas	<i>V106I</i>			F
BRSP434-12	51/M	Campinas	<i>V106I</i>			B
BRSP539-12	31/M	São Paulo		<i>Y188H, G190A, H221Y</i>		B
BRSP556-12	19/M	ABCD	T215S			B
BRSP001-13	2/F	ABCD	<u>T69NT</u>			B
BRSP034-13	36/M	São Paulo	<u>V106IV</u>			B
BRSP070-13	21/M	ABCD		<i>K103N, P225H, V179LV</i>		B
BRSP162-13	49/M	ABCD		<i>E138A</i>		B
BRSP257-13	39/M	ABCD		<i>E138A</i>		B
BRSP358-13	11/M	São Paulo		<i>K103N</i>	<i>I85V</i>	F
BRSP489-13	38/M	São Paulo			<i>I85V</i>	B
BRSP574-13	23/M	ABCD		<i>E138A</i>		B
BRSP588-13	0/F	São Paulo	<i>V106IV</i>			F
BRSP616-13	29/M	São Paulo		<u>F227FL</u>		B
BRSP630-13	16/F	São Paulo		<u>E138AE</u>		C
BRSP718-13	32/M	São Paulo		<i>V108I</i>		B
BRSP728-13	20/M	São Paulo		<i>K103N</i>		B
BRSP788-13	39/M	ABCD		<i>E138A</i>		B
BRSP835-13	24/M	ABCD		<i>K103N</i>		B
BRSP864-13	52/M	ABCD		<u>V179D</u>		B
BRSP001-14	6/M	São Paulo	<u>T69N</u>			B
BRSP050-14	42/M	São Paulo		<i>V179D</i>		B
BRSP054-14	32/M	ABCD		<u>E138AE</u>		B
BRSP078-14	25/M	ABCD		<i>E138A</i>		B
BRSP158-14	38/F	São Paulo	M41L, T215D			B
BRSP185-14	28/M	ABCD		<i>E138A</i>		B
BRSP310-14	42/M	São Paulo		<i>V90IV, K101E</i>	<i>I50L, Q58E, V82M, L90M</i>	BC
BRSP339-14	26/M	São Paulo	K219R			BF
BRSP354-14	33/M	ABCD	<u>T69N</u>			B
BRSP395-14	56/F	ABCD			<i>M46IMV*</i>	B
BRSP417-14	35/M	São Paulo			<u>K43T</u>	B
BRSP536-14	27/M	São Paulo		<i>K103N, E138A</i>		B
BRSP554-14	18/M	ABCD			<u>T74S</u>	C
BRSP618-14	54/M	Campinas	M41L, T215V			BF
BRSP627-14	30/M	ABCD		<u>V179D</u>		BF
BRSP648-14	37/M	ABCD		<u>E138A</u>		B
BRSP796-14	38/M	ABCD		<i>K103N</i>		BF
BRSP892-14	56/F	Campinas	M184V	<i>V179T</i>		B

Patients' HIV-1 sequences with one or more drug resistance mutations (DRM) by drug class as NRTI, nucleoside reverse transcriptase inhibitors; NNRTI, nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors; PI, protease gene. N/A, not available; M, male; F, female.

Clinical sites are grouped by geographic areas as São Paulo, ABCD, and Campinas. Aminoacid substitutions listed in CPR (TDRM) as drug resistance mutations are in *bold*, additional DRM listed in the IAS 2014 list are in *italic (bold and italic for those listed in both lists)*, and additional mutations considered at the GRI-HIVdb are underlined.

*The mutation M46I is a surveillance TDRM according to the CPR list, but the mixture observed (*M46IMV*) was not computed as TDRM when the study sequences were evaluated at the CPR site.

the estimates. However, these cities deserve further attention, especially due to the fact that NNRTI mutations are the most frequently observed, potentially compromising the recommended NNRTI-based first line ART regimen.¹⁸

Regarding children and adolescents, risk exposure was underestimated due to the lack of proper information, but perinatal exposure was the main route of transmission reported among children. A single patient presented TDRM considered by CPR, which was the K103N mutation, contrasting with studies that show a prevalence varying from 8.7% to 12.8%.^{13–16} However, a Brazilian study conducted between 2000 and 2004 evaluated a cohort of 24 children and did not find any TDR.¹⁷ These studies with children are still limited to properly evaluate the prevalence of TDRM in this population.

As expected, subtype B remains predominant while non-B subtypes and recombinants were found at a lower frequency, similar to other observations in the area.^{4,7,10} In cities located in the southern part of Brazil the scenario for the epidemic is different, with a predominance of subtype C and CB recombinants. Some studies observed that TDRM seems to be less frequently found among subtype C,^{19,20} but the small sample size of non-B subtypes does not allow a proper evaluation of this issue. It is worth noting that subtype C and CB recombinants have attained proportions similar to subtype F and BF recombinants, an increase in the subtype C already observed²¹ in other studies.

We reported our TDRM results using CPR to determine prevalence rates, enabling a comparison to other molecular epidemiology studies, but we also evaluated additional DRMs that are considered only by IAS or GRI-Hdb. Some of those mutations may compromise new NNRTIs such as rilpivirine or etravirine, particularly in the E138A mutation. Although not described in previous studies in the country, when we re-analyzed our dataset,⁴ we observed that this mutation was already present in some samples, with a similar proportion (E138A 4%, 9/225). The presence of E138A among subtype B sequences in our study, 6.9% (9/130, CI 95% 3.4–12), is somewhat higher than that observed by Sluis-Cremer²² among subtype B sequences from antiretroviral therapy-naïve patients at large databases (2.3% in the Stanford database and 2% in the British Columbia Centre database), and our findings are actually similar to findings observed in subtype C in these databases (6.1% and 5.9%, respectively).

Lambert-Niclot and colleagues evaluated the prevalence of rilpivirine-associated mutations in a French cohort of 1,729 antiretroviral therapy-naïve patients and found mostly the E138A mutation among non-B subtypes (4.1%, 35/867, versus 2%, 17/862, in subtype B).²³ This mutation seems to be relevant only to the new NNRTI. Etravirine is used in the country only in salvage therapy,¹⁸ a situation in which drug activity may be limited due to class recycling, and the other, rilpivirine, is not yet available through public access. However, the latter is being recommended for first line therapy and evaluated as long-acting nanosuspension formulations that might provide new preexposure prophylaxis strategies (PrEP),^{26,27} situations in which our findings may become more worrisome.

Conclusions

Overall, we observed an increase in TDRM among adults when compared to data from a previous study, but rates are within the range observed in other studies. Children and ad-

olescents show a lower prevalence of TDRM. Continuous monitoring of the situation as well as pretreatment genotyping assessment are necessary, especially taking into account new policies¹⁸ regarding treatment as prevention that are being implemented in the country.

Sequence Data

Sequences are available at GenBank with accession numbers KPI15360 to KPI15579.

Acknowledgments

Participants in the São Paulo Salvage Workgroup who contributed to this work included Max Igor Banks Ferreira Lopes, Margareth da Eira, Denise Peluso Pacola, Yu Ching Lian, Roberio Carneiro, Alina Bernardes Habert, Fabio AB Cabral, Lucy Vasconcelos, Paulo Friggi de Carvalho, Raffaella Shimada, Marcina Garcia, Maria Roberta Lopes, Adriane Maira Delicio, and Ana Cláudia Diaz.

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) [grant 2011/21958-2].

Author Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

References

- Di Biagio A, Rusconi S, Marzocchetti A, *et al.*: The role of baseline HIV-1 RNA, drug resistance, and regimen type as determinants of response to first-line antiretroviral therapy. *J Med Virol* 2014;86(10):1648–1655.
- Cambiano V, Bertagnolio S, Jordan MR, *et al.*: Transmission of drug resistant HIV and its potential impact on mortality and treatment outcomes in resource-limited settings. *J Infect Dis* 2013;207(Suppl 2):S57–62.
- Zu Knyphausen F, Scheufele R, Kücherer C, *et al.*: First line treatment response in patients with transmitted HIV drug resistance and well defined time point of HIV infection: Updated results from the German HIV-1 seroconverter study. *PLoS One* 2014;9(5):e95956.
- Ferreira JLP, Rodrigues R, Lança AM, *et al.*: Transmitted drug resistance among people living with HIV/Aids at major cities of São Paulo State, Brazil. *Adv Virol* 2013; 2013:878237.
- Steege K, Demecheleer E, De Cabooter N, *et al.*: A sensitive in-house RT-PCR genotyping system for combined detection of plasma HIV-1 and assessment of drug resistance. *J Virol Methods* 2006;133(2):137–145.
- Fogel JM, Wang L, Parsons TL, *et al.*: Undisclosed antiretroviral drug use in a multinational clinical trial (HIV Prevention Trials Network 052). *J Infect Dis* 2013;208(10): 1624–1628.
- Gonzalez CR, Alcalde R, Nishiya A, *et al.*: Drug resistance among chronic HIV-1-infected naïve for use of anti-retroviral therapy in São Paulo city. 2007;129(2):87–90.
- Inocencio LA, Pereira AA, Sucupira MCA, *et al.*: Brazilian Network for HIV Drug Resistance Surveillance: A survey of individuals recently diagnosed with HIV. *AIDS Soc* 2009;12:20.
- Sanabani SS, Pastena ÉR, da Costa AC, *et al.*: Characterization of partial and near full-length genomes of HIV-1 strains sampled from recently infected individuals in São Paulo, Brazil. *PLoS One* 2011;6(10):e25869.

10. Alencar CS, Sabino EC, Carvalho SM, *et al.*: HIV genotypes and primary drug resistance among HIV-seropositive blood donors in Brazil: Role of infected blood donors as sentinel populations for molecular surveillance of HIV. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2013;63(3):387–392.
11. de Moraes Soares CM, Vergara TR, Brites C, *et al.*: Prevalence of transmitted HIV-1 antiretroviral resistance among patients initiating antiretroviral therapy in Brazil: A surveillance study using dried blood spots. *J Int AIDS Soc* 2014;17(1):19042.
12. Sucupira MC, Caseiro MM, Alves K, *et al.*: High levels of primary antiretroviral resistance genotypic mutations and B/F recombinants in Santos, Brazil. *AIDS Patient Care STDS* 2007;21(2):116–128.
13. Soto-Ramirez LE, Rodriguez-Diaz R, Harris DR, and Hazra R: HIV drug resistance-associated mutations in antiretroviral naïve HIV-1-infected Latin American children. *Adv Virol* 2010;2010:407476.
14. Ferreira FGF, Pinto JA, Kakehasi FM, *et al.*: Prevalence of primary drug resistance-associated mutations among HIV type 1 vertically infected children in Belo Horizonte, Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2010;26(2):229–232.
15. Arruda E, Simões L, Sucupira C, *et al.*: Short communication: Intermediate prevalence of HIV type 1 primary antiretroviral resistance in Ceará State, Northeast Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2011;27(2):153–156.
16. Almeida FJ, Rodrigues R, Zapparoli MS, *et al.*: Prevalence of transmitted HIV-1 drug resistance mutations in children and adolescents in São Paulo, Brazil. *Pediatr Infect Dis J* 2012;31(12):e255–257.
17. Almeida FJ, Berezin EN, Rodrigues R, *et al.*: Diversity and prevalence of antiretroviral genotypic resistance mutations among HIV-1-infected children. *J Pediatr (Rio J)* 2009; 85(2):104–109.
18. Brazilian protocol for ART treatment, accessed in November 5, 2014, available at www.aids.gov.br/publicacao/2013/protocolo-clinico-e-diretrizes-terapeuticas-para-manejo-da-infeccao-pelo-hiv-em-adultos.
19. de Medeiros RM, Junqueira DM, Matte MCC, *et al.*: Co-circulation HIV-1 subtypes B, C, and CRF31_BC in a drug-naïve population from Southernmost Brazil: Analysis of primary resistance mutations. *J Med Virol* 2011;83:1682–1688.
20. Rodrigues R, Scherer LC, Oliveira CM, *et al.*: Low prevalence of primary antiretroviral resistance mutations and predominance of HIV-1 clade C at polymerase gene in newly diagnosed individuals from south Brazil. *Virus Res* 2006;116(1–2):201–207.
21. Brígido LF, Ferreira JL, Almeida VC, *et al.*: Southern Brazil HIV type 1C expansion into the state of São Paulo, Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2011;27(3):339–344.
22. Sluis-Cremer N, Jordan MR, Huber K, *et al.*: E138A in HIV-1 reverse transcriptase is more common in subtype C than B: Implications for rilpivirine use in resource-limited settings. *Antiviral Res* 2014;107:31–34.
23. Lambert-Niclot S, Charpentier C, Storto A, *et al.*: Prevalence of pre-existing resistance-associated mutations to rilpivirine, emtricitabine and tenofovir in antiretroviral-naïve patients infected with B and non-B subtype HIV-1 viruses. *J Antimicrob Chemother* 2013;68(6):1237–1242.
24. Stuyver L, Wyseur A, Rombout A, *et al.*: Line probe assay for rapid detection of drug-selected mutations in the human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase gene. *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41(2):284–291.
25. Ferreira JLP, Thomaz M, Rodrigues R, *et al.*: Molecular characterisation of newly identified HIV-1 infections in Curitiba, Brazil: Preponderance of clade C among males with recent infections. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2008;103(8): 800–808.
26. Klooster G, Hoeben E, Borghys H, *et al.*: Pharmacokinetics and disposition of rilpivirine (TMC278) nanosuspension as a long-acting injectable antiretroviral formulation. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54(5):2042–2050.
27. Rajoli RKR, Back D, Rannard S, *et al.*: Optimisation of intramuscular sustained release nano-formulations using in silico modelling. 21st Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI), Boston, MA, March 3–6, 2014. Abstract #518.

Address correspondence to:
Luís Fernando de Macedo Brígido
 Ave. Dr. Arnaldo 355
 Virology Center, Retrovirus Laboratory
 São Paulo 01246-902
 Brazil
 E-mail: lubrigido@gmail.com