

Mayra Simioni Zapparoli

**Caracterização Molecular da região do
envelope do HIV-1 em crianças e adolescentes da
cidade de São Paulo, Brasil.**

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 obtenção do Título de Mestre em Ciências.

**Área de Concentração: Pesquisas
Laboratoriais em Saúde Pública**

**Orientador: Prof. Dr. Luís Fernando de
Macedo Brígido**

**SÃO PAULO
2011**

Mayra Simioni Zapparoli

**Caracterização Molecular da região do
envelope do HIV-1 em crianças e adolescentes da
cidade de São Paulo, Brasil.**

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 obtenção do Título de Mestre em Ciências.

**Área de Concentração: Pesquisas
Laboratoriais em Saúde Pública**

**Orientador: Prof. Dr. Luís Fernando de
Macedo Brígido**

**SÃO PAULO
2011**

FICHA CATALOGRÁFICA

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

©reprodução autorizada pelo autor, desde que citada a fonte

Zaparoli, Mayra Simioni

Caracterização molecular da região do envelope do HIV-1 em crianças e adolescentes da cidade de São Paulo, Brasil / Mayra Simioni Zaparoli - São Paulo, 2010.

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

Área de concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública

Orientador: Luis Fernando de Macedo Brigido

1. HIV-1 2. Proteínas gp120 do envelope de HIV 3. Tropismo viral
4. Avanço da doença

SES/CCD/CD-236/10

Dedicatória

A Deus, pois me fez acreditar na realização de um objetivo...

*Aos meus pais, Sidinei e Daisy, pela vida que me deram,
pela formação moral e acadêmica que me proporcionaram
e pelos bons exemplos de dedicação para
realização dos objetivos...*

*Aos meus irmãos Lucio e Priscila, pelos bons exemplos,
pelo apoio e companheirismo...*

*Aos meus sobrinhos Yasmin e Yago, pela alegria que
trouxeram a nossa família...*

*Ao Samuel, pela paciência e compreensão, pelo apoio e
motivação constante por todos esses anos...*

Agradecimentos

Ao meu orientador, Dr. Luis Fernando de Macedo Brígido, pela oportunidade de trabalho em colaboração, pelas críticas construtivas feitas durante a realização deste trabalho. Por ter confiado a mim este trabalho.

À Dra. Rosangela Rodrigues, pelo apoio, paciência e pelas valiosas sugestões e correções feitas durante a realização deste trabalho.

Ao grupo clínico e colaboradores do Serviço de Infectologia Pediátrica da Irmandade Santa Casa de Misericórdia de São Paulo, em especial a Dra. Flávia Jacqueline Almeida, pelo envio das amostras e o suporte na coleta de dados; pela troca de experiências e pela amizade.

Aos pacientes e responsáveis que aceitaram participar deste estudo, agradeço gentilmente a contribuição para as pesquisas em HIV/AIDS e também por incentivarem de forma indireta meu desenvolvimento científico.

Aos colegas da Seção de Virologia do Instituto Adolfo Lutz, agradeço a amizade e o apoio demonstrado no dia-a-dia.

Aos colegas funcionários do Laboratório de Genotipagem do Instituto Adolfo Lutz: Fábio Cabral, Giselle Lopez, João Leandro P. Ferreira, Luciana O. Souza, Maria Divina da Silva, Mariucha C. Barbosa.

Aos pós-graduandos e bolsista do Laboratório de Genotipagem do HIV do Instituto Adolfo Lutz, em especial aos amigos: Andréia J. Silva, Antonio Flávio A.C. Siqueira, Jaqueline S. Cavalcanti, João Paulo G. Batista, Mariana C. Magri, Paula M. de Souza Guimarães e Ricardo B. Andrade, pela amizade e apoio nas horas difíceis.

Às amigas Aline C. Nascimento, Claudia R. Ferrari, Daniela Toscano e Silvia M. Kanawa pela amizade, boa convivência, apoio e incentivo diários.

Aos funcionários e ex-aprimorandos da Seção de Sorologia do Instituto Adolfo Lutz, onde iniciei os caminhos pela área científica, agradeço os ensinamentos, a amizade e o incentivo.

À Prof.^a Carmem Aparecida de Freitas Oliveira e Dra. Mirthes Ueda, pelos ensinamentos e sabedoria transmitidos; pelo incentivo e exemplos de dedicação ao trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, pela oportunidade de crescimento científico.

A CAPES, pela bolsa concedida e oportunidade de trabalho.

A todos que participaram direta ou indiretamente na construção deste trabalho, muito obrigada!

RESUMO

Introdução: O manejo de crianças vivendo com HIV/AIDS é um desafio e pode ser beneficiado com informações adicionais para subsidiar as decisões clínicas. Foram avaliados dados clínicos e laboratoriais a partir de uma coorte pediátrica em São Paulo, Brasil, visando a identificação de marcadores de prognóstico da doença.

Métodos: Todas as crianças foram acompanhadas em uma unidade pediátrica de referência em São Paulo, Brasil. Todas as crianças com consentimento do estudo e informações de acompanhamento foram incluídas. Foi realizado sequenciamento parcial do gene do envelope do HIV-1 das amostras disponíveis (plasma ou PBMC). As amostras foram amplificadas por nested PCR, sequenciadas com ABI3100 usando Big Dye e as sequências foram editadas manualmente. As taxas de falso positivo (FPRs, predição genotípica do tropismo viral) foram avaliadas pelo website *geno2-pheno*_[co-receptores]. Os desfechos de evolução da doença avaliados foram: 1- aviremia (CV < 1.7 cópias/mL versus viremia detectável); e 2- Progressão da doença (TCD4 > 350cels/mm³ e clinicamente assintomáticos versus sintomas ou TCD4 < 350cels/mm³). EpiInfo6 e Stata 8 foram utilizados para análise estatística e valores de p < 0.05 foram considerados.

Resultados: Das 87 crianças incluídas, 71 tiveram acompanhamento por mais de um ano. Foi observado que 45% do sexo masculino, com idade mediana de 8 anos (1-15). Na entrada, 86% apresentavam sintomas, com mediana de TCD4 e carga viral respectivamente de 454 células/mm³ e 5.1 log₁₀. Na última avaliação, 75% eram assintomáticos, 37% avirêmicos, com mediana de linfócitos TCD4 470cels/mm³. O tropismo viral R5 na entrada foi observado em 57% dos pacientes e esteve associada a valores de TCD4 mais elevados durante o seguimento e a sintomatologia, quando comparados com pacientes X4. Aviremia foi associada ao uso de HAART como primeiro esquema, CV indetectável durante o seguimento e adesão boa ao TARV. A progressão boa da doença foi associada à idade, durante o seguimento, aviremia, valores de TCD4 mais altos na entrada e durante o seguimento e adesão boa ao TARV.

Conclusão: Este estudo corrobora com o descrito na literatura que TCD4, CV e aderência são bons marcadores da evolução da doença, porém a predição genotípica do tropismo viral mostrou-se um importante marcador para complementar a resposta ao tratamento de crianças com HIV/AIDS.

ABSTRACT

Background: Management of infants living with HIV/AIDS is a challenge and it may be benefited from additional information to subsidize clinical decisions. We evaluated the clinical and laboratory data from a pediatric cohort in Sao Paulo, Brazil, aiming at identifying the prognostic disease markers.

Methods: All children were followed at a pediatric reference center in Sao Paulo, Brazil. All consenting children with follow-up information were included. Partial envelope and polymerase genes, from serum or PBMC, were amplified by nested PCR and sequenced with ABI3100 using Big Dye. The sequences were manually edited. False positive rates (FPRs, tropism prediction) were evaluated at *geno2-pheno*_[coreceptors]. The outcomes evaluated were: 1-aviremia (VL<50copies/mL versus detectable viremia) and 2-Good Outcome (TCD4>350cells/mm³ and clinically asymptomatic versus either symptoms or TCD4< 350cells/mm³). EpiInfo6 and Stata8 were used for analysis.

Results: Of 87 children, 71 with follow-up of more than one year were included; 45% males; median age 8 yo (1-15), exposed median of 3 ARV regimens (1-12) during a median of 8 yo. At entry, 86% had symptoms, with median TCD4 of 454 cell/mm³ and viral load of 5.1log₁₀. At last evaluation 75% were asymptomatic, 37% aviremic, with median TCD4 of 470cells/mm³. The R5 tropic viral entry was observed in 57% of patients and it was associated with higher values of CD4 and symptoms during the follow-up compared with patients X4. Aviremia was associated (p<0.05) with the use of HAART as first regimen, undetectable VL during follow-up and adherence. Good Outcome was associated to age, aviremia during follow-up and at censoring, higher TCD4 at baseline and during follow-up and adherence.

Conclusion: This study corroborate that TCD4, VL and adherence are good markers, however genotypic tropism prediction may become an additional surrogate marker for treatment response of HIV infected children.

Glossário de siglas e abreviaturas:

SIGLA	SIGNIFICADO
mg	Micrograma (10^{-6} gramas)
μ L	Microlitro (10^{-6} litros)
3TC	Lamivudina
AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida <i>Acquired immunodeficiency syndrome</i>
ARV	Antirretroviral
AZT	Zidovudina
CCD-BM	Comissão Científica da Divisão de Biologia Médica
CDC-USA	Centro para o Controle e Prevenção de Doenças <i>Centers for Disease Control and Prevention-USA</i>
cDNA	Ácido desoxirribonucléico complementar
CEPIAL	Comissão de ética em pesquisa do Instituto Adolfo Lutz
CRF	Forma recombinante circulante do HIV
D4T	Estavudina
DDI	Didadosina
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico <i>Deoxyribonucleic acid</i>
DST	Doenças sexualmente transmissíveis
dNTP	<i>Deoxinucleotídeo trifosfato</i>
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ácido etilenoaminotetracético
EFV	Efavirenz
Env	Envelope
gp	Glicoproteína
Gag	Antígeno grupo-específico <i>Group-specific antigen</i>
HIV	Vírus da imunodeficiência humana <i>Human immunodeficiency virus</i>
HAART	Terapia antirretroviral de alta potência
IAL	Instituto Adolfo Lutz
IP	Inibidor de protease
Kb	Kilobase
LIP	Pneumonia Intersticial Linfocítica
LPV/r	<i>Lopinavir associado a ritonavir</i>
M	Molaridade
MgCl ²	Cloreto de Magnésio
mL	Mililitro (10^{-3} litro)

Glossário de siglas e abreviaturas

SIGLA	SIGNIFICADO
mM	Milimolar (10^{-3} molar)
MS	Ministério da Saúde
Nef	Fator negativo de infectividade
NFV	Nelfinavir
NIH	<i>National Institute of Health</i>
Nm	Nanômetro
NNRTI	Inibidor de Transcriptase Reversa não análogo de nucleosídeo
NRTI	Inibidor de Transcriptase Reversa
NSI	Não indutor de sincício
NVP	Nevirapina
OMS	Organização Mundial da Saúde
PACTG	Grupo de ensaios clínicos em Aids pediátrica <i>Pediatric Aids Clinical Trials Group</i>
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
Pol	Polimerase
PN-DST/AIDS	Programa Nacional de DST/AIDS
RENAGENO	Rede Nacional para Genotipagem do HIV-1
Rev	Regulador da expressão de proteínas virais
RNA	Ácido ribonucléico
SI	Indutor de sincício
SIV	Vírus da imunodeficiência símia
T-20	Enfuvirtide
TARV	Tratamento antirretroviral
Tat	Trans-ativador da transcrição
TCD4⁺	Linfócito T auxiliar
TCD8⁺	Linfócito T citotóxico
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
U	Unidade
UNAIDS	Programa conjunto das Nações Unidas para a AIDS <i>United Nations Joining Aids Program</i>
V	Volts
Vif	Fator de infectividade viral
Vírus R5	Vírus com tropismo pelo co-receptor CCR5
Vírus R5X4	Vírus com tropismo pelos co-receptores CCR5 e CXCR4
Vírus X4	Vírus com tropismo pelo co-receptor CXCR4
Vpr	Proteína viral R
Vpu	Proteína viral U
WHO	Organização Mundial da Saúde <i>World Health Organization</i>
X g	Força centrífuga gerada em unidades de gravidade

LISTA DE TABELAS E FIGURAS:

Figura 1: Representação esquemática da estrutura molecular do vírus HIV-1.....	18
Figura 2: Representação esquemática da organização genômica do HIV-1.....	19
Figura 3: Representação esquemática do gene do envelope do HIV-1.....	24
Figura 4: Representação esquemática da sequência de aminoácidos do domínio V3.....	25
Figura 5: Sequência de primers utilizados para amplificar a região do envelope do HIV-1	46
Figura 6: Diagrama representando a distribuição do número das amostras e pacientes participantes do estudo em cada grupo no período de 2000 à 2010	52
Figura 7: Classificação clínica da infecção pelo HIV, segundo CDC, das crianças e adolescentes de acordo com a faixa etária, referentes a entrada no estudo (2000-2010).....	55
Figura 8: Distribuição da frequência de esquemas terapêuticos utilizados no primeiro TARV dos pacientes (n=79), por ano de início de tratamento (2000-2010).....	56
Figura 9: Árvore filogenética representativa da região do envelope (600pb) de amostras pareadas	58
Figura 10: Predição do tropismo para todas as amostras analisadas no período de 2000 a 2010 (n=134)	59
Figura 11: Frequência de assinaturas da alça V3 do envelope do HIV-1 encontradas na primeira amostra sequenciada de cada paciente (n=73)	61
Figura 12: Adesão ao tratamento nos grupos de pacientes com boa progressão e progressão ruim da doença (n=71).....	65

Figura 13: Adesão ao tratamento, na última avaliação clínica, nos grupos de pacientes virêmicos e avirêmicos (n=71)..... 67

Tabela 1: Informações clínico-epidemiológicas dos pacientes referente à entrada no estudo (2000-2010)..... 54

Tabela 2: Classificação do CDC da infecção pelo HIV em crianças e adolescentes, referente à entrada no estudo (2000-2010) 55

Tabela 3: Comparação do tropismo viral no entrada do estudo com dados clínicos para cada paciente (n=73) 60

Tabela 4: Critérios utilizados para classificação da progressão da doença nos pacientes do grupo B,C e D (n=71) 62

Tabela 5: Comparação da progressão da doença com dados clínicos e moleculares nos pacientes do grupo B,C e D (n=71)..... 64

Tabela 6: Comparação da supressão virológica ao final do estudo com dados clínicos e moleculares nos pacientes dos grupos B, C e D (n=71) ... 68

ÍNDICE DE ANEXOS:

ANEXO 1 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

ANEXO 2 - Classificação pelo CDC das categorias clínicas e imunológicas dos pacientes

ANEXO 3 - Modelo de questionário aplicado a cada consulta do paciente

ANEXO 4 - Recomendações de tratamento ARV em populações pediátricas. Fonte. Ministério da Saúde, 2009

ANEXO 5 - Parecer dos Comitês de Ética

Sumário

1. Introdução	16
1.1. Epidemia de HIV/AIDS no mundo e no Brasil.....	17
1.2. Caracterização e organização genômica do HIV.....	18
1.3. Classificação e diversidade do HIV.....	21
1.4. A replicação viral	22
1.5. O envelope viral	23
1.6. Receptores de quimiocinas e tropismo viral	26
1.7. Determinação do tropismo viral	28
1.8. Tratamento antirretroviral.....	30
1.8.1. Classes de antirretrovirais	30
1.8.1.1. Inibidores da Transcrição Reversa	31
1.8.1.2. Inibidores de Protease	32
1.8.1.3. Inibidores de Entrada	32
1.8.1.4. Inibidores de Integrase	33
1.9. Patogênese da AIDS pediátrica	34
2. Objetivos	38
2.1. Objetivo geral	38
2.2. Objetivos específicos	38
3. Material e Métodos	40
3.1. Desenho e população do estudo.....	40
3.2. Seleção de pacientes e coleta de dados clínicos	40
3.3. Coleta de material biológico para teste genotípico de tropismo viral.....	42
3.4. Metodologias Laboratoriais	43
3.4.1. Imunofenotipagem de linfócitos TCD4	43
3.4.2. Quantificação da carga viral para HIV	43
3.4.3. Extração do RNA viral	44

3.4.4. Reação de transcrição reversa	44
3.4.5. Reação e cadeia da polimerase – (PCR Nested)	45
3.4.6. Reação de sequenciamento.....	46
3.4.7. Edição e análise das sequências genéticas	47
3.4.8. Análise filogenética	47
3.4.9. Análise genotípica do tropismo viral	48
3.4.10. Análises estatísticas	49
4. Resultados	51
4.1. Distribuição da casuística	51
4.2. Características gerais da população estudada	53
4.3. Estadiamento clínico	55
4.4. Terapia antirretroviral	56
4.5. Adesão aos antirretrovirais.....	57
4.6. Análises moleculares	57
4.6.1. Análise do subtipo viral	57
4.6.2. Predição do tropismo	59
4.6.3. Assinaturas da alça V3	60
4.7. Evolução clínica dos pacientes	62
4.7.1. Desfecho 1 – Progressão da doença	62
4.7.2. Desfecho 2 – Supressão virológica	66
5. Discussão	71
5.1. Desenho e fluxo operacional do estudo	71
5.2. Características da população estudada	73
5.3. Análises moleculares	74
5.4. Determinação do tropismo viral	75
5.5. Evolução clínica dos pacientes	78
6. Conclusões	82

7. Referências Bibliográficas	84
--	-----------

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O monitoramento clínico-laboratorial de crianças e adolescentes com HIV/AIDS é componente importante das ações no combate a epidemia mundial. Inúmeros esforços em atenção à saúde desta população têm sido implementados na tentativa de melhorar a expectativa e qualidade de vida desses pacientes. Estudos que contribuam para esclarecer o papel da evolução viral na progressão da doença podem constituir elementos chave para o desenvolvimento de estratégias de controle.

A caracterização molecular do vírus da imunodeficiência humana (HIV) tem contribuído para o entendimento da patogênese em adultos. Nesse sentido, estudo de regiões virais relacionadas à resposta imune, em especial no envelope viral, e aos alvos dos medicamentos antirretrovirais (ARV) tem permitido crescente aprimoramento científico beneficiando o desenvolvimento nas áreas de epidemiologia, vacinas e microbicidas e terapia antirretroviral (TARV). Essas informações são limitadas entre crianças e adolescentes.

A análise de informações moleculares, sua correlação com a evolução clínico-laboratorial de crianças e adolescentes vivendo com HIV/AIDS, bem como seu potencial papel como preditor de progressão da doença nessa população constitui o objetivo central deste estudo.

1.1. Epidemia de HIV/AIDS no mundo e no Brasil

Os dados mundiais estimam em 33,3 milhões o número de pessoas vivendo com HIV/AIDS, 1,8 milhões de óbitos e 2,6 milhões de novas infecções (UNAIDS, 2009) . No Brasil, até o final de 2009 cerca de 635 mil pessoas entre adultos e crianças estavam infectadas pelo HIV. Esses dados epidemiológicos enfatizam a importância de esforços para controle e combate a AIDS. A UNAIDS informa ainda que, em decorrência do maior acesso da população mundial a serviços de prevenção da transmissão materno-infantil, e mudanças nos parâmetros utilizados para gerar as estimativas, o número total de crianças que nascem com o HIV diminuiu. Estima-se que 370 mil crianças foram infectadas com o HIV em 2009 (uma queda de 24% em relação aos cinco anos anteriores), totalizando 2,5 milhões de crianças e adolescentes com menos de 15 anos vivendo com HIV e 260 mil óbitos em 2009.

A transmissão do HIV em crianças pode ocorrer por via sexual, contato com sangue contaminado (transfusões sanguíneas) ou por transmissão vertical (mãe para o filho), destacando-se esta como a principal forma de infecção em crianças de até 13 anos que corresponde aproximadamente a 80% dos casos. A transmissão vertical pode ocorrer em momentos distintos: intra-útero, no momento do parto ou durante a amamentação (Ministério da Saúde, 2006; Barbosa, 1999). Em um estudo multicêntrico realizado com gestantes (Pediatric AIDS Clinical Trials Protocol – PATCG 076), que não fizeram uso de TARV durante o pré-natal, observou-se taxa de transmissão vertical do HIV em torno de 25% (Connor, 1994). No Brasil, as estratégias de prevenção como o diagnóstico precoce, o incentivo ao acompanhamento pré-natal, o uso de TARV combinada, adoção de parto por cesariana, quimioprofilaxia na parturiente e recém-nascido e impedimento da amamentação tem possibilitado a redução da transmissão vertical do HIV para níveis próximos a 1% (Ministério da Saúde, 2006).

1.2. Caracterização e organização genômica do HIV

O HIV é um vírus com genoma RNA da família *Retroviridae* do gênero *Lentivirus*. A denominação *Lentivirus* deve-se à característica de um longo período de incubação no hospedeiro podendo persistir e replicar-se por muitos anos sem apresentar sinais clínicos da doença. O HIV é o agente etiológico da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (Acquired Immune Deficiency Syndrome - AIDS) em humanos, doença que em seu estágio final caracteriza, principalmente, por grave imunossupressão (WHO, 2007).

As características biológicas e estruturais distinguem dois tipos virais em humanos: HIV-1 e HIV-2; o HIV-1 é predominante e responsável pela pandemia de AIDS e o HIV-2 tem sido isolado principalmente na África Ocidental (Stebbing, 2004).

O HIV é um vírus de formato esférico com aproximadamente 100 a 120nm de diâmetro e cercado por uma bicamada lipídica (figura 1) de cerca de 72 espículas que formam o envelope viral (*Env*). As espículas são compostas por um trímero de glicoproteínas ligadas por ligações não-covalentes e derivam do precursor gp160, que é clivado por proteases celulares, produzindo as glicoproteínas gp120 de superfície e gp41 que é a glicoproteína transmembrana (WHO, 2007).

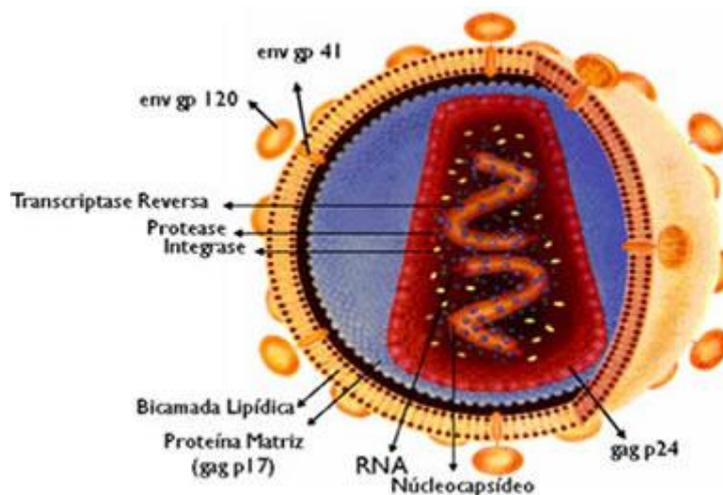


Figura 1. Representação esquemática da estrutura molecular do vírus HIV-1. Fonte. Bismara, 2006

No interior do vírus, encontra-se o material genético que é composto de duas fitas simples de RNA viral de 9kb em um envoltório, denominado *core* viral. O *core* é de formato cônico e composto pela matriz protéica (p17), capsídeo (p24) e nucleocapsídeo (p6 e p7). Juntamente com o material genético do vírus encontram-se também as enzimas protease (PT), transcriptase reversa (RT) e integrase (IN) (WHO, 2007; Menéndez-Arias, 2010). O genoma do HIV é caracterizado por três diferentes tipos de genes: os genes estruturais, os genes regulatórios e os genes acessórios. Os genes estruturais compreendem três principais regiões codificadoras de proteínas: *gag*, *pol* e *env* (figura 2).

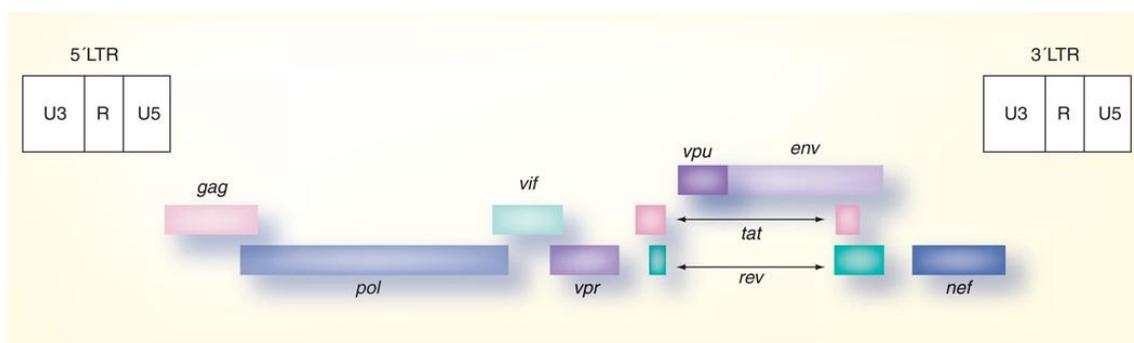


Figura 2. Representação esquemática da organização genômica do HIV-1. Fonte: McBurney, 2008.

O gene *gag* é responsável pela formação de precursores de proteínas do capsídeo viral. O *gag* é traduzido em uma poliproteína de 55kD, denominada p55, clivada pela protease viral em quatro proteínas: p17 que forma a matriz, p24 que constitui o capsídeo, p7 que constitui o nucleocapsídeo e a p6 que atua na incorporação da proteína *Vpr* às partículas virais (WHO, 2007; Costin, 2007).

O gene *pol* codifica uma poliproteína precursora das enzimas virais, que são responsáveis por todo processo de replicação e integração do vírus na célula hospedeira. A enzima *protease* (PT) atua na maturação das partículas virais, a *transcriptase reversa* é responsável pela retrotranscrição do RNA em DNA viral e a *integrase* atua na ligação covalente do DNA viral

ao genoma da célula hospedeira. A região *pol* é de grande importância no ciclo biológico do HIV e é também um dos principais alvos dos ARV (WHO, 2007, Costin, 2007).

O gene *env* é composto por um heterodímero da gp120 externa ligada não-covalentemente ao domínio de transmembrana gp41. A glicoproteína gp120 efetua o reconhecimento da célula alvo e determina o tropismo celular pela ligação ao receptor celular CD4 a um dos vários receptores de quimiocinas. A glicoproteína gp41 é responsável pela fusão da membrana viral com a celular e pela liberação do nucleocapsídeo ao interior da célula hospedeira (Clapham, 2001; WHO, 2007; Costin, 2007).

Tat e *Rev* são genes regulatórios e auxiliam na replicação viral e na transcrição de proteínas. O gene *Tat* controla a expressão genética no processo transcricional, que resulta no aumento de níveis de RNA viral e eleva a transcrição e alongamento. O gene *Rev* atua no processo pós transcricional e regula o processamento e o transporte do RNA viral do núcleo ao citoplasma (Clapham, 2001; Strebel, 2003; Costin, 2007).

Nef, *Vif*, *Vpr* e *Vpu* são genes acessórios. O gene *Nef* (fator negativo – *negative factor*) está presente em todos os *Lentivirus* e está associado ao aumento da infectividade viral, regulação negativa da expressão de CD4 e inibição de sinais apoptóticos nas células infectadas. O gene *Vif* (fator de infectividade viral – *viral infective factor*) participa do processo de replicação e maturação viral. O gene *Vpr* auxilia na entrada do DNA viral ao núcleo da célula, na capacidade de bloquear o processo de divisão celular e auxilia também no processo de replicação viral. O gene *Vpu* está associado à maturação, liberação das partículas virais maduras e degrada CD4 para facilitar a montagem e liberação do vírus. Este gene está presente no HIV-1, porém ausente no HIV-2 (Strebel, 2003; Costin, 2007).

1.3. Classificação e diversidade do HIV

De acordo com as diferenças em seu genoma, o HIV-1 é classificado em três grupos: grupo M (*major group*), grupo O (*outlier group*) e grupo N (*non-M/ non-O group*). Os grupos N e O estão praticamente restritos a regiões da África, já o grupo M é o mais prevalente e responsável pela epidemia mundial. O grupo M é classificado em nove subtipos compreendendo de A-D, F-H, J e K, com base em distância filogenética do genoma. (Geretti, 2006). Alguns subtipos podem ainda ser separados em sub-subtipos distintos, como o subtipo A (A1 e A2), o subtipo F (F1 e F2) e até o momento em 49 formas recombinantes circulantes (*Circulating Recombinant Forms* - CRF). As CRFs originam-se da recombinação do material genético de dois ou mais subtipos virais que infectam a mesma célula, quando um indivíduo é infectado por mais de um subtipo. Estima-se que de 10 a 20% das novas linhagens virais caracterizadas sejam CRFs (Geretti *et al*, 2006; www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/CRFs/CRFs.html data de acesso - 25/02/11).

A variabilidade genética entre os subtipos pode chegar até 25% na região do *envelope*, a 16% no gene *gag* e até a 13% na região da *polimerase* (Morgado, 2002). Essa alta variabilidade é resultante das constantes recombinações que ocorrem. Levando-se em consideração que por dia são geradas aproximadamente 10 bilhões de partículas virais e que a enzima transcriptase reversa é incapaz de reparar erros durante o processo de replicação, a taxa de substituições nucleosídicas incorretas é elevada. Com isso, a diversidade genética do vírus fornece um importante mecanismo de escape da pressão do sistema imune e dos ARV. No Brasil foi descrita a circulação dos subtipos B, F1, C, D e A, com predomínio do subtipo B seguido por F1 e atualmente verifica-se um aumento do subtipo C, principalmente no sul do Brasil, sendo o subtipo mais prevalente nessa região. O subtipo C é o mais prevalente correspondendo a cerca de 50% da infecção mundial e circula principalmente nos países em desenvolvimento (Morgado, 2002; Hemeelar, 2006; Brígido, 2005).

1.4. A replicação viral

O processo de entrada do vírus inicia-se pela interação entre os receptores CD4 da célula hospedeira com a gp120 do vírus. O HIV tem tropismo principalmente por receptores CD4 presentes em linfócitos T, macrófagos e células dendríticas (Clapham, 2001). Primeiramente ocorre uma ligação de alta afinidade entre o domínio extracelular da gp120 e os receptores CD4. Tal ligação promove mudanças conformacionais na gp120 e gp41 que expõe outros sítios de ligação permitindo a interação do vírus com receptores de quimiocina presente na superfície celular e a fusão do envoltório viral e das membranas celulares.

Após esta fase, ocorre a fusão da membrana celular com o envoltório viral e o *core* viral é inserido no citoplasma celular. Cada fita de RNA genômico é retrotranscrita em DNA linear de dupla fita (DNA proviral) por meio da enzima transcriptase reversa do próprio vírus. Então, o DNA proviral é levado até o poro nuclear da célula para ser inserido no genoma celular com o auxílio da enzima integrase (WHO, 2007; Costin, 2007).

O DNA proviral começa então a ser transcrito pela RNA polimerase da célula. O produto da transcrição é processado de várias maneiras para produzir mRNAs que codificam todas as proteínas virais.

A expressão gênica do HIV começa com a expressão dos genes regulatórios *Rev*, *Tat* e *Nef* e em seguida os genes estruturais são expressos. As proteínas virais e RNA viral são transportadas para o citoplasma dentro de um complexo de nucleoproteínas. Então, este nucleocapsídeo é envolvido por um envelope no qual estão presentes tanto proteínas de membrana celular como gp120 e gp41. Os novos vírions imaturos são liberados por brotamento da célula hospedeira. Precusores de polipéptidos são processados pela protease viral para produzir a maturação das partículas virais (WHO, 2007; Costin, 2007).

1.5. Envelope viral

O envelope viral é a camada mais externa do vírus e um dos principais alvos para a resposta imune anti-HIV e é responsável pela entrada do vírus na célula hospedeira. O gene *env* é sintetizado no complexo de Golgi como uma poliproteína precursora denominada gp160, que após sua maturação é clivada em duas glicoproteínas denominadas gp120 e gp41 que são fundamentais nos eventos iniciais da infecção pelo HIV, pois mediam a ligação do vírus à célula hospedeira (Clapham, 2001).

A gp120 (glicoproteína de superfície - SU) efetua o reconhecimento da célula alvo e determina o tropismo viral pela ligação do vírus ao receptor celular CD4 e aos receptores de quimiocinas. A gp120 é composta por cinco domínios constantes (C1–C5) e por cinco alças variáveis (V1–V5) intercaladas e estabilizadas por pontes dissulfeto (figura 3). As alças variáveis V1–V5 possuem grande variabilidade genética. Estima-se que a magnitude da diversidade possa ser superior a 10% em um único paciente e até 50% entre cepas de diferentes grupos (Morgado, 2002).

A glicoproteína gp41 (glicoproteína de transmembrana - TM) é um trímero composto por 345 aminoácidos que contém o domínio N-terminal, a região de transmembrana e o domínio citoplasmático. A gp41 promove a fusão da membrana viral com a celular, processo que resulta na liberação do nucleocapsídeo viral no interior da célula hospedeira. Durante esse processo, a gp41 sofre várias mudanças conformacionais que levam a exposição de um peptídeo de fusão, uma região hidrofóbica rica em resíduos de glicina, essencial ao processo de fusão das membranas. Este processo envolve geralmente três etapas: a ligação de alta afinidade da gp120 ao receptor TCD4, o que ocasiona uma mudança conformacional dessa glicoproteína expondo a glicoproteína de transmembrana gp41 e, finalmente, a fusão do invólucro do vírus com a membrana citoplasmática da célula hospedeira (Clapham, 2001, Kuhmann, 2008).

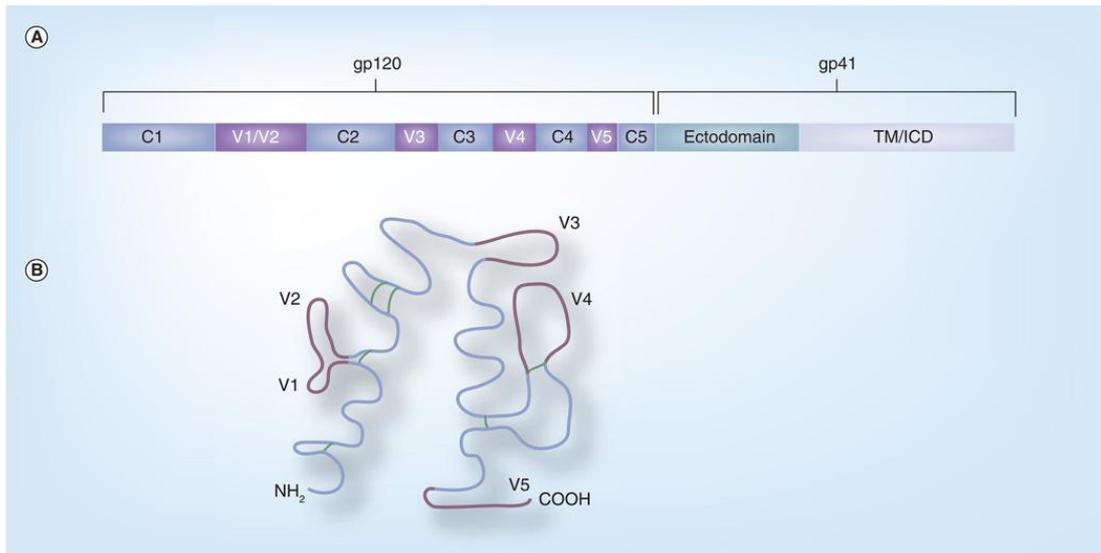


Figura 3. Representação esquemática do gene envelope do HIV-1. (A) mostra a clivagem da gp160 em gp120 e gp41, bem como as respectivas regiões. (B) esquema das alças da gp120. As regiões constantes são mostradas em azul e as regiões variáveis mostradas em rosa. As pontes de dissulfeto são mostradas em verde. ICD: domínio intracitoplasmático. Fonte: McBurney, 2008

Uma das principais estruturas do envelope viral é a alça V3. Essa alça é uma região hipervariável, localizada na porção externa da gp120, que possui de 35 a 40 aminoácidos dispostos em alça por pontes de dissulfeto e variam muito entre diferentes linhagens virais. (figura 4).

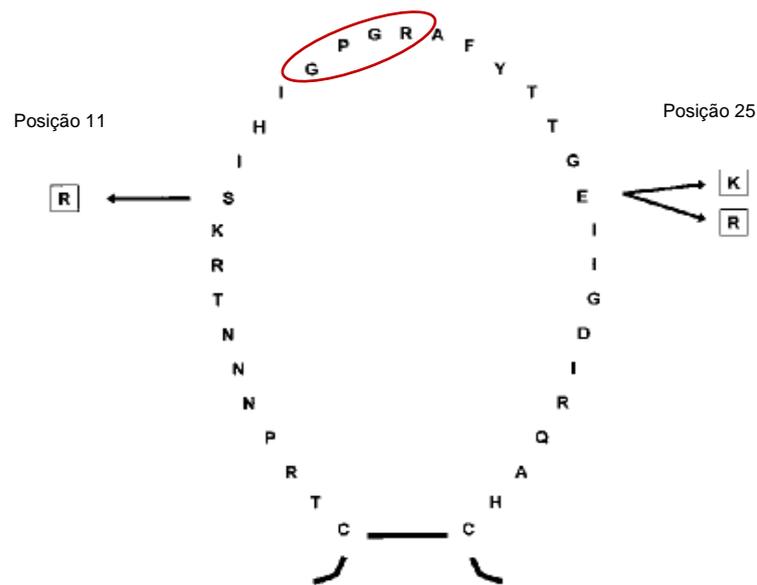


Figura 4. Representação esquemática da sequência de aminoácidos no domínio V3. Os isolados com arginina (R) ou lisina (K) na posição 11 ou 25 são considerados X4. O círculo em vermelho representa a assinatura da V3. (Adaptado de Fouchier, 1995)

Estudos têm demonstrado a importância da diversidade da alça V3 em diversas funções virais, como a ligação ao receptor CCR5 e CXCR4 e, conseqüentemente, na determinação do tropismo celular. As mutações pontuais nessa região estão estabelecidas como determinantes na formação de vírus indutores de sincício (SI) e não indutores de sincício (NSI). Um aumento na carga de aminoácidos nas posições 11 e 25 estão associados ao aparecimento de vírus X4 (Fouchier, 1995; Clapham, 2001; Clevestig, 2005). Uma variante do subtipo B denominado B-Br ou B' que circula principalmente no Brasil, distingue-se do subtipo B isolado nos Estados Unidos e Europa, pela presença de uma assinatura de aminoácidos GWGR na região V3 do envelope, diferindo da assinatura GPGR comumente encontrada nestes países. Essa variante do subtipo B foi descrita também em outros países como Japão, França e alguns países da América Latina. Outros subtipos circulantes no Brasil não estão associados a essa mudança do aminoácido prolina (P) para o triptofano (W) na assinatura da região V3.

Os vírus com assinaturas GWGR parecem estar associados ao melhor prognóstico (Santoro-Lopes, 2000; Casseb, 2002)

1.6. Receptores de quimiocinas e tropismo viral

Apesar de ser necessária, a ligação do HIV à molécula de CD4 parece não ser suficiente para a entrada do HIV na célula. A constatação de que era necessário co-existirem na mesma célula o receptor CD4 e um receptor adicional para que o HIV penetre na célula, veio explicar a razão do porque de certas variantes de HIV serem capazes de infectar determinadas células TCD4 e outras não (Brelot, 2001).

Os receptores de quimiocinas estão presentes nas células e são receptores naturais α e β quimiocinas. Seu principal papel biológico está na ativação e recrutamento de leucócitos. Os receptores estão presentes na superfície celular formando alças com um poro central circundado por sete regiões transmembrana. Quatro domínios são expostos na superfície celular: o domínio N-terminal e mais três alças extracelulares E1, E2 e E3 (Clapham, 2001; Brelot, 2001; Kuhmann, 2008). Até o momento, os receptores de quimiocina foram descritos como serem capazes de interagir com a gp120 na infecção por HIV-1, HIV-2 e SIV, porém somente CCR5 e CXCR4 parecem ter capacidade de infectar células *in vivo* (Grivel, 2010).

O receptor CXCR4 está presente na maioria dos tecidos e órgãos. Durante o desenvolvimento embrionário, ele desempenha função na maturação do sistema linfóide e na vida adulta tem papel regulatório das células precursoras do sistema linfóide. Possui um ligante natural que é o SDF-1/CXCL12 (Ribeiro, 2006; Tagliamonte, 2010).

O receptor CCR5 é expresso principalmente em linfócitos TCD4 de memória (CD45RO) e também em células apresentadoras de antígenos como macrófagos, células dendríticas e células de Langerhans. Seu papel principal no sistema imunológico consiste no recrutamento de leucócitos em

reações inflamatórias, e seus ligantes naturais são MIP e RANTES (Ribeiro, 2006; Tagliamonte, 2010).

O polimorfismo, que leva a uma deleção de 32pb no gene CCR5 (CCR5 Δ 32), ocasiona a não expressão deste receptor na superfície celular. Os indivíduos que apresentam genótipo homozigoto (CCR5 Δ 32/ Δ 32) para este polimorfismo desenvolvem maior resistência à infecção pelo HIV. Um genótipo heterozigoto (CCR5 Δ 32/wt) para esse polimorfismo ocasiona uma menor expressão desse receptor na superfície celular e conseqüentemente uma redução nas taxas de progressão da doença. A freqüência de indivíduos homozigotos é baixa, aproximadamente 0,5 a 1% em caucasianos (Clampham, 2001; Moore, 2004).

O tropismo do HIV para esses receptores está associado com a capacidade de replicação dos vírus nas diferentes linhagens celulares. Os vírus R5 são geralmente isolados na fase assintomática da doença, infectam preferencialmente macrófagos, não formam sincícios (células gigantes multinucleadas) e têm taxa de replicação mais lenta/baixa. Os vírus X4 são isolados na fase mais avançada da doença, infectam preferencialmente linfócitos, formam sincícios e têm taxa de replicação mais rápida/alta. Os vírus que usam ambos receptores são designados de vírus duotrópicos R5/X4 (Moore, 2004; Kuhmann, 2008).

Embora o HIV possa usar ambos receptores para entrar na célula, observa-se o predomínio de vírus R5 em indivíduos recentemente infectados. De fato, 80% dos indivíduos não tratados possuem somente vírus R5, enquanto 20% possuem vírus duo-trópicos e raros indivíduos com vírus X4 (Brumme, 2004). Durante o curso da infecção, o aparecimento de vírus X4 está relacionado à progressão mais rápida da doença, com forte depleção de linfócitos TCD4 e aumento da carga viral (Fitzgibbon, 1998; Moore, 2004; Langford, 2007; Briz, 2006). Todavia, não se sabe se este fenômeno é a causa ou conseqüência da progressão para AIDS.

1.7. Determinação do tropismo viral

O desenvolvimento de ferramentas que possam auxiliar na predição do tropismo viral têm sido implementadas em decorrência do desenvolvimento de novas classes de ARV que atuam na fusão viral, como os antagonistas do receptor CCR5, que agem no bloqueio da entrada do vírus na célula. No entanto, para garantir a eficácia da droga é necessário que a circulação de vírus R5 no indivíduo seja predominante.

Diante disso, foram desenvolvidos testes de fenotipagem que utilizam pseudovírus recombinantes marcados em linhagens celulares CCR5+ ou CXCR4+, e são considerados *gold-standard*. O mais utilizado atualmente é o teste *Trofile - Monogram Bioscience™* que baseia-se na amplificação da região do envelope do HIV isolado do paciente, com inserção em vetores de expressão do envelope. O vetor *env* juntamente com outro vetor que contém fragmentos genômicos do HIV e mais um gene indicador (luciferase) são colocados em culturas celulares para produção de “pseudo-vírus”. Os “pseudo-vírus” produzidos são postos em linhagens celulares que expressem somente o receptor CCR5 ou somente o receptor CXCR4. Uma vez que o “pseudo-vírus” consegue infectar a célula, ele sofre um único ciclo de replicação, e a presença da luciferase é sinalizada por meio da emissão de luz, identificando assim o tropismo viral isolado do paciente na linhagem celular em que foi infectada. Se ambas as linhagens (CCR5+ e CXCR4+) forem infectadas, o vírus do paciente será classificado como duo-trópico R5X4 (www.trofileassay.com – data de acesso 13/01/2011).

Entretanto, o alto custo desse ensaio limita seu acesso o que leva a busca de métodos alternativos e mais rápidos para determinação do tropismo. Assim, foram desenvolvidos os testes genotípicos, que se tornaram importantes ferramentas no monitoramento do uso de coreceptores do HIV-1 e também para o uso de inibidores de entrada do vírus. (Delobel, 2007). Estes ensaios baseiam-se na amplificação e sequenciamento genético da região V3 do envelope, e análise por *softwares* de bioinformática

e *websites* (Sierra, 2007). Atualmente, os métodos genotípicos têm sido utilizados com grande frequência na predição do tropismo viral.

Há três *websites* disponíveis gratuitamente na internet para a predição do tropismo: *WetCat*, *WebPSSM* e *Geno2-pheno*_[coreceptor]. Cada ferramenta utiliza diferentes metodologias de análise do tropismo (Sierra, 2007).

O *website WetCat* (<http://genomiac2.ucsd.edu:8080/wetcat/v3.html> - data de acesso 09/10/10) é o mais antigo e possui cinco testes preditivos em sua plataforma, baseados principalmente em árvores de decisão, em que os aminoácidos em posições específicas determinam os vírus X4 ou R5. Para utilizar essa ferramenta é necessário alinhar a sequência com uma referência descrita no *website* (Sierra, 2007).

O *Geno2-pheno*_[coreceptor] realiza a predição utilizando-se o modelo SMV (Support Vector Machine). Essa ferramenta permite também a inserção de dados clínicos do paciente e estabelece uma correlação do genótipo/fenótipo com um banco de dados de 1000 sequências da região V3 da gp120 determinadas “*in vitro*” (Sierra, 2007). Essa ferramenta não apresenta restrição quanto à inserção de sequências de diferentes subtipos.

O *WebPSSM – Position Specific Scoring Matrix* utiliza uma matriz para analisar os aminoácidos da região V3, mas só avalia vírus do subtipo B ou C (Jensen, 2003; Poveda, 2009; Chueca, 2009, Sierra, 2007).

Outra maneira muito utilizada para predição do tropismo é a análise da composição de aminoácidos da alça V3 conhecida como regra 11/25 em que a presença de aminoácidos básicos (Arginina – R, Histidina – H, ou Lisina – K) nas posições 11 e/ou 25 são considerados vírus X4 (Fouchier, 1995; Sierra, 2007).

Os testes genotípicos apresentam vantagens em relação a testes fenotípicos quanto ao custo e tempo, porém não demonstram a mesma sensibilidade e especificidade dos testes fenotípicos apesar dos crescentes aprimoramentos (Sing, 2007; Skrabal, 2007).

1.8. Tratamento Antirretroviral

O tratamento antirretroviral em pacientes infectados pelo HIV iniciou-se no final da década de 80 com o uso de zidovudina (AZT). No Brasil, a distribuição de ARV iniciou-se em 1991 no Estado de São Paulo com o AZT. O Brasil foi um dos primeiros países do mundo a adotar políticas de saúde para a melhoria do atendimento de pacientes HIV positivos com a distribuição gratuita de medicamentos, desde 1996 (www.aids.gov.br).

A terapia combinada com três drogas antirretrovirais, que inclui duas classes de fármacos diferentes, é o tratamento inicial recomendado para crianças e adolescentes com infecção pelo HIV. Essa é considerada a melhor estratégia para maximizar a supressão da replicação viral, preservar e/ou restaurar o sistema imune, retardar a progressão da doença e aumentar a sobrevida. Os parâmetros para tratamento de crianças HIV estão apresentados nos Anexos 4.

1.8.1. Classes de antirretrovirais

No Brasil estão aprovados e disponíveis para uso terapêutico de indivíduos com infecção por HIV 19 medicamentos antirretrovirais que atuam em várias fases do ciclo viral e estão classificados em 5 classes:

- inibidores de transcriptase reversa análogos de nucleosídeos (NRTI)
- inibidores de transcriptase reversa não-análogos de nucleosídeos (NNRTI)
- inibidores de protease (IP)
- inibidores de entrada (inibidor de fusão e antagonista de CCR5)
- inibidor de integrase (IN)

1.8.1.1. Inibidores da Transcrição Reversa (RT)

A enzima responsável pela transcrição do material genético do vírus de RNA para DNA é a transcriptase reversa. Os medicamentos que agem nesta fase da replicação viral podem ser divididos em duas classes: análogos de nucleosídeos (NRTI) e não análogos de nucleosídeos (NNRTI).

Os NRTI têm estrutura química semelhante aos trifosfatos nucleosídeos (dNTP) naturais e necessitam ser transformados em metabólitos para atuarem na RT. Ocorre fosforilação e seus produtos trifosfato atuam como inibidores competitivos. Esses trifosfatos ligam-se a nova fita de DNA em fase de transcrição e impede sua extensão. Esta classe inclui o AZT (zidovudina) e o d4T (estavudina) que são análogos de timidina; o 3TC (lamivudina) e o DDC (zalcitabina) que são análogos de citosina; o DDI (didanosina), o TDF (tenofovir) e o FTC (emtricitabina) que são análogos de adenosina; e o ABC (abacavir) que é análogo de guanosina. Essa classe de medicamentos é a mais utilizada no TARV em populações pediátricas, com exceção do TDF, que só é aprovado para maiores de 18 anos (Shafer, 2002; Zdanowicz, 2006; Ministério da Saúde, 2009).

Os NNRTI atuam ligando-se a uma bolsa hidrofóbica próxima ao sítio ativo alostérico da *polimerase*, responsável pela formação da dupla hélice de DNA, que restringe sua mobilidade e flexibilidade levando à redução da eficiência da RT (Shafer, 2002; Menendez-Arias, 2009). Desta classe, três fármacos são utilizados, NVP (nevirapina) e EFV (efavirenz), de primeira geração; e ETV (etravirina), de segunda geração. Os primeiros são amplamente utilizados em crianças e adolescentes e apresentam menor risco de dislipidemia e lipodistrofia. A NVP é muito utilizada em gestantes infectadas pelo HIV para prevenção da transmissão vertical. Porém, estes fármacos possuem uma baixa barreira genética pois necessitam de apenas uma mutação para apresentar resistência aos fármacos da classe (Shafer, 2002; Ministério da Saúde, 2009).

A ETV tem sido utilizada como terapia de resgate em indivíduos multirresistentes. Ao contrário dos NNRTI de primeira geração, sua barreira

genética é alta e necessita de um acúmulo de mutações para apresentar resistência, contudo seu uso não é recomendado para populações pediátricas (Ministério da Saúde, 2009).

1.8.1.2. Inibidores de protease

A protease é uma enzima homodimérica composta de duas cadeias de polipeptídeos, cada uma contendo 99 resíduos. Cada monômero contém sequências conservadas dos aminoácidos Asp-Thr-Gly que fornece o grupo aspartil que é necessário para a catálise. O resíduo aspartil auxilia na adição de uma molécula de água ao substrato, formando um intermediário tetraédrico. Os medicamentos inibidores de protease (IP) mimetizam a estrutura dos substratos naturais da protease, com forte afinidade pelo sítio ativo e inibem a atividade catalítica da enzima com conseqüente interrupção do ciclo viral (Shafer, 2002; Zdanowicz, 2006). São eles: AMP (Amprenavir), ATV (Atazanavir), IND (Indinavir), SQV (Saquinavir), LPV (Lopinavir/r), NFV (Nelfinavir), RTV (Ritonavir) e DRV (Darunavir), este último de segunda geração. Com a era HAART, essa classe de medicamentos passou a ser uma opção para o TARV em crianças e adolescentes infectados por apresentar maior barreira genética, o que implica em menor risco de desenvolvimento de resistência (Ministério da Saúde, 2009). A combinação de LPV com RTV é recomendada para o uso em gestantes, na profilaxia da transmissão vertical (Ministério da Saúde, 2009).

1.8.1.3. Inibidores de entrada

É uma nova classe de ARV aprovada recentemente pelo FDA e tem seu mecanismo de ação voltado aos eventos iniciais do ciclo biológico do HIV, representada pelos inibidores de fusão e antagonistas de CCR5.

Os inibidores de fusão são peptídeos sintéticos que atuam na gp41 e bloqueiam a formação do peptídeo de fusão e, conseqüentemente, impedem

o HIV de penetrar na célula. O T-20 (enfuvirtide) foi a primeira droga desta classe a ser aprovada. Estes fármacos apresentam barreira genética baixa e já estão descritas mutações de resistência para esta droga (Briz, 2006). Sua administração é por via sub-cutânea e por isto só é utilizado em pacientes com falha terapêutica a outras classes de medicamentos. Em crianças sua utilização está aprovada para crianças com idade superior a 6 anos (Ministério da Saúde, 2009).

Os medicamentos antagonistas de CCR5 atuam no bloqueio dos receptores CCR5 e assim impedem a ligação do HIV à célula. O antagonista aprovado pelo FDA, o Maraviroc (Pfizer) tem demonstrado bons resultados no âmbito de diminuir a replicação, contudo esta droga apresenta uma restrição de uso que é a prévia realização de testes de fenotipagem ou testes de genotipagem para garantir a presença de linhagens R5-trópicas (Breedek, 2007; Ray, 2008). Seu uso está aprovado para indivíduos acima de 19 anos.

1.8.1.4. Inibidores de Integrase

É uma nova classe de medicamentos que age no bloqueio da atividade da enzima integrase, responsável pela inserção do HIV ao DNA humano. Assim, inibe a replicação do vírus e sua capacidade de infectar novas células. O RAL (Raltegravir) é medicamento disponível para esta classe e é muito utilizado em terapias de resgate a partir dos 16 anos (Ministério da Saúde, 2009).

1.9. Patogênese da AIDS pediátrica

A evolução do HIV em crianças pode apresentar padrões distintos dos anteriormente descritos para adultos, com um grande espectro de sinais e sintomas. Para classificar a infecção pediátrica, o CDC (*Center for Disease Control and Prevention*) utiliza desde 1994 um sistema alfanumérico baseando-se em parâmetros clínicos e imunológicos (Anexo 2).

A progressão da doença em crianças infectadas com HIV pode ocorrer das seguintes maneiras:

- progressão rápida, com início dos sintomas até aproximadamente o segundo ano de vida e imunodepressão grave e precoce. Corresponde a cerca de 10-15% dos pacientes e é constituído, principalmente, por crianças que se infectaram na vida intra-uterina e apresentam comprometimento tímico importante (Rubini, 1999);
- progressão intermediária, com sinais e sintomas leves nos primeiros cinco a sete anos de vida. Corresponde a cerca de 50-70% dos casos;
- progressão lenta, com ausência de manifestações da doença até os oito anos de idade. Corresponde a cerca de 10-15% dos casos (Brasil – Ministério da Saúde, 2009).

Diversos marcadores de progressão da doença já foram propostos, entre eles o aparecimento de sinais e sintomas clínicos, a dosagem do antígeno p24, a dosagem de outros marcadores imunológicos como a β 2-microglobulina e a dosagem sérica de neopterinina, porém nenhum se mostrou suficientemente sensível e específico (Barbosa, 1999). Assim, a contagem de linfócitos TCD4 e carga viral passaram a ser os marcadores mais utilizados para o acompanhamento do avanço da doença.

A manutenção dos valores de carga viral em níveis indetectáveis é esperada quando iniciado o tratamento ARV. Em crianças, o pico da viremia plasmática ocorre por volta dos dois meses de idade e frequentemente atinge valores superiores a 1.000.000 cópias/mm³, com taxas de declínio mais lentas do que as apresentadas em adultos, sendo difícil de definir os limites precisos na progressão da doença, principalmente no primeiro ano de

vida (Luzuriaga, 1999; Tiemessen, 2006). A viremia plasmática declina lentamente, mesmo sem TARV, a uma taxa média de 0,6 log/ano nos primeiros dois anos e de 0,3 log/ano até os quatro a cinco anos de idade (Luzuriaga, 1999). Com o declínio lento da carga viral e na ausência de TARV, cerca de um quarto das crianças infectadas verticalmente evoluem para AIDS e aproximadamente 10 a 15% evoluem para óbito no primeiro ano de vida (Tiemessen, 2006). Estima-se que 20% dos lactentes que não recebem TARV tem progressão precoce da doença (Lwembe, 2009). Por este motivo, o uso da terapia HAART está associada a uma melhor sobrevida e redução da carga viral.

A avaliação imunológica é um instrumento importante, porque afere o dano causado pelo HIV ao sistema imune do paciente e o direcionamento da progressão da doença. O linfócito TCD4 é alvo primário do HIV e seu esgotamento limita gravemente a capacidade de resposta do hospedeiro.

Nos primeiros anos de infecção em população pediátricas, a contagem de TCD4 permanece elevada. Isso ocorre provavelmente em função da imaturidade do sistema imune, ao maior percentual de linfócitos TCD4 circulantes, e possivelmente a ativação imunológica relacionada ao desenvolvimento da resposta imune na criança (Ortigão de Sampaio, 1997; Rubini, 1999). Assim como em adultos, a depleção de TCD4 está associada a um maior risco de progressão da doença. O CDC se baseou em critérios imunológicos entre as diferentes faixas etárias para classificar o nível de alteração imunológica nesses pacientes. Dessa forma, o conhecimento sobre os fatores relacionados à replicação viral e a dinâmica de reconstituição imune em crianças infectadas pelo HIV ainda é limitado (Luzuriaga, 1999).

Seria de grande valor aos profissionais da área pediátrica a identificação de marcadores laboratoriais que permitissem auxiliar o acompanhamento clínico. Marcadores como o teste de tropismo, que em adultos estão associados a um pior prognóstico, se forem adequados a essa população, podem identificar pacientes mais graves e de difícil resposta ao

tratamento, facilitando a identificação e a condução desses pacientes de pior prognóstico, nos estudos visa avaliar esses potenciais marcadores.

OBJETIVOS

2.OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

- Efetuar a análise molecular de isolados do vírus de crianças e adolescentes vivendo com HIV/AIDS e correlacionar com os dados clínicos e laboratoriais.

2.2. Objetivos Específicos

- 1- Sequenciar parte da região do envelope do HIV-1 de amostras de crianças e adolescentes, e determinar os subtipos do HIV-1 e as assinaturas da alça V3.
- 2- Analisar, por meio de *softwares* disponíveis, o tropismo viral e sua associação com marcadores celulares e virais de progressão da doença (contagem de linfócitos TCD4 e carga viral)
- 3- Documentar a evolução clínica dos pacientes e correlacionar a evolução clínica e molecular observada em amostras sequenciais

MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Desenho e População do estudo

Este estudo foi desenvolvido em parceria científica do Laboratório de Retrovírus do Instituto Adolfo Lutz Central e o Serviço de Infectologia Pediátrica da Santa Casa de São Paulo. O delineamento do estudo foi longitudinal prospectivo de uma coorte de crianças e adolescentes com infecção por HIV/AIDS do Serviço de Infectologia Pediátrica da Santa Casa de São Paulo. Todos os indivíduos foram incluídos no estudo após acordo e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido pelos pais, responsáveis ou cuidadores (Anexo 1). O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Adolfo Lutz (CEPIAL 20/08) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Irmandade Santa Casa de Misericórdia de São Paulo (CEP/ISCMSP – 90/03 e 15/10) vide Anexo 5. A avaliação deste estudo foi anônima, e todos os dados foram codificados e disponíveis exclusivamente aos coordenadores do estudo.

3.2. Seleção de pacientes e coleta de dados clínicos

Os indivíduos foram incluídos no estudo de forma sequencial, entre os anos de 2000 a 2010, por profissionais médicos do serviço pediátrico, de acordo com os critérios de seleção definidos. As informações clínicas foram obtidas por meio de entrevistas com pediatras do Serviço e, adicionalmente, por consulta aos prontuários médicos. Foram coletados os seguintes dados clínicos, epidemiológicos e laboratoriais: via de transmissão da infecção por HIV, tempo de infecção, histórico de tratamento antirretroviral, estadiamento clínico, contagem de linfócitos TCD4, viremia plasmática, adesão ao tratamento e sintomatologia.

Critérios de Inclusão:

- Indivíduo com Infecção por HIV/AIDS definidos pelos critérios diagnósticos do Ministério da Saúde,
- com idade inferior a 18 anos completos,
- em acompanhamento clínico regular no Serviço,
- consentimento e assinatura do TCLE.

Critérios de exclusão:

- indivíduos gestantes
- não consentimento e assinatura do TCLE

A cada consulta foi aplicado um questionário aos pacientes e/ou responsáveis (Anexo 3), em que foram anotados o estadiamento clínico, a adesão ao tratamento, os resultados de exames laboratoriais e avaliação clínica.

O estadiamento clínico foi classificado conforme a classificação proposta pelo CDC-USA (*Center for Disease Control-USA*), baseando-se em parâmetros clínicos (presença de sinais e sintomas relacionados à AIDS) e imunológicos (dados laboratoriais).

A adesão ao tratamento foi avaliada por meio de entrevistas com os pacientes e/ou responsáveis. Estes foram questionados quanto à adesão no dia e na semana anterior à consulta. Foi considerado critério para adesão boa quando mais de 90% das doses prescritas foram tomadas (paciente não havia tomado até uma dose na última semana); adesão intermediária quando o paciente não havia tomado de duas até três doses na última semana (adesão de 80-90%); e adesão baixa, quando o paciente não havia tomado quatro ou mais doses na última semana (adesão <80%).

3.3. Coleta de material biológico para o teste genotípico de tropismo viral

Considerando-se que os Serviços de Saúde possuem acesso ao teste genotípico para avaliação de susceptibilidade a medicamentos (teste de genotipagem do HIV), foi utilizada a mesma logística de coleta de material biológico para a realização da genotipagem da região do envelope. Para as análises de predição do tropismo viral foram utilizadas alíquotas das amostras biológicas encaminhadas para a realização do teste de genotipagem do HIV. Dessa forma, a data de entrada de cada indivíduo no estudo foi considerada a data da primeira amostra biológica enviada ao Instituto Adolfo Lutz para realização do teste de genotipagem do HIV, por indicação de falha terapêutica ou por tratar-se de pacientes virgens de terapia antirretroviral. O objetivo foi reduzir ao máximo as novas recoletas de material biológico, para aproveitar o momento do teste de genotipagem para obtenção de plasma.

Para alguns pacientes, faz amostras biológicas foram encaminhadas ao longo do seguimento clínico, devido a indicação do teste de genotipagem ou então por critérios de análise clínica e molecular longitudinal desses pacientes. A meta foi realizar o teste de tropismo viral em um número mínimo de 30 crianças e adolescentes.

3.4. Metodologias Laboratoriais

O material biológico foi coletado na Santa Casa de Misericórdia de São Paulo e encaminhado ao Laboratório de Retrovírus do Instituto Adolfo Lutz. Inicialmente, o sangue total foi centrifugado para a separação de plasma e célula, e imediatamente congelado e armazenado a -70°C para posterior realização dos testes genotípicos.

3.4.1. Imunofenotipagem de Linfócitos TCD4

A imunofenotipagem de linfócitos TCD4 foi realizada por meio da marcação de células sanguíneas periféricas do paciente com anticorpos monoclonais Tritest™ (Becton-Dickinson, San Jose, CA, USA) conforme instruções do fabricante. A leitura foi realizada em citômetro de fluxo de três cores FACSCount™ (Becton-Dickinson, San Jose, CA, USA). O teste foi realizado no Laboratório de Citometria de Fluxo do Instituto Adolfo Lutz – Laboratório Central. Estes testes foram executados na logística da rotina de monitoramento laboratorial do seguimento clínico dos pacientes, não constituindo uma atividade específica para este estudo.

3.4.2. Quantificação da carga viral para HIV

A quantificação de HIV RNA viral foi realizada em amostras de plasma dos pacientes utilizando-se inicialmente o *kit Cobas Amplicor, HIV-1 Monitor™ Test, versão 1.5 - standard* (Roche, USA), conforme instruções do fabricante. A partir de 2007 a quantificação tem sido realizada utilizando-se o *kit Versant® HIV-1 RNA 3.0 Assay bDNA* (Siemens, USA). O teste foi realizado no Laboratório de Carga Viral do Instituto Adolfo Lutz. Da mesma forma que a imunofenotipagem, estes testes foram executados na logística

da rotina de monitoramento laboratorial do seguimento clínico dos pacientes, não constituindo uma atividade específica para este estudo.

3.4.3. Extração do RNA viral

A extração do RNA viral do plasma foi realizada com *kit* de extração QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, Germany). As amostras foram descongeladas, homogeneizadas e 140µL de plasma foi adicionado a 560µL de RNA carreador. Em seguida, as amostras foram homogeneizadas e incubadas por 10 minutos a temperatura ambiente e acrescentados 560µL de etanol absoluto. A solução foi transferida para uma coluna de sílica e centrifugada a 8000rpm por 60 segundos e submetida à lavagem com solução tamponada. Este procedimento foi repetido por duas vezes para remoção do material não aderido ao filtro. O RNA viral aderido foi recuperado com tampão de eluição após centrifugação por 60 segundos a 8000rpm, e então foi processada a reação de transcrição reversa.

3.4.4. Reação de transcrição reversa

Após a extração do RNA viral, as amostras foram retrotranscritas para obtenção da fita de cDNA. O RNA extraído foi retrotranscrito utilizando-se random *primers* 150ng/uL (Invitrogen, USA), dNTP mix 10mM (Invitrogen, USA), DTT 0,1M (Invitrogen, USA), 40U/uL inibidor de RNase (Invitrogen, USA), 200U de *Superscript III* (Invitrogen, USA) e *buffer* 5x. O volume final da reação foi de 20µL. A mistura do RNA extraído, dNTP e *random primer* foi aquecida a 65°C por 5 minutos e em seguida resfriada por 5 minutos. Foram adicionados os demais reagentes e incubados a 25°C por 5 minutos. A reação de retrotranscrição foi realizada a 50°C por 60 minutos, seguida de inativação da reação a 70°C por 15 minutos. O cDNA gerado foi armazenado a -70°C.

3.4.5. Reação em cadeia da polimerase (PCR Nested)

No primeiro PCR foram utilizados 5µL do cDNA retrotranscrito como fita molde, *buffer* 10x (LGC Biotecnologia), MgCl₂ 50mM (LGC Biotecnologia), dNTP mix 10mM (Invitrogen, USA), *primers* ED5 e ED12 10µM, 5U de TaqDNA Polymerase (LGC Biotecnologia) e água livre de DNase/RNase (Gibco/BRL, Life Technologies, USA), para volume final de 50 µL. As amostras foram amplificadas em termociclador (GeneAmp PCR System 9700, Life Technologies-USA) sob as seguintes condições: 3 ciclos de 94°C por 1 minuto, 55°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto; seguido de 32 ciclos de 94°C por 10 segundos, 55°C por 45 segundos e 72°C por 1 minuto; e extensão final de 72°C por 10 minutos. Essa amplificação permitiu a obtenção de um fragmento de 1,25Kb do gene *envelope*.

A segunda amplificação foi realizada com 5µL do produto da primeira PCR, *buffer* 10x, MgCl₂ 1,6mM, dNTP mix 200µM, *primers* ED31 e ES8 10µM, 5U de TaqDNA Polymerase e água livre de DNase/RNase, com volume final de 50µL. A amplificação foi realizada em termociclador sob as mesmas condições da primeira amplificação, gerando um fragmento de 0,85Kb.

Nas amostras em que não ocorreu a amplificação de material genético das respectivas regiões utilizando-se os protocolos citados acima, foi repetido o ciclo de PCR, a partir do material genético extraído alterando-se os *primers* do segundo PCR para ES7 e ED33. Após realizar a reação de PCR, os produtos amplificados foram detectados em gel de agarose a 2% em tampão TBE 0,5X, corado com 0,5µg de brometo de etídeo. Os produtos da amplificação, o padrão de tamanho molecular de 100pb (Invitrogen, USA) diluído a 1:10 e o padrão de massa molecular *Low Mass Ladder* (Invitrogen, USA) foram aplicados no gel de agarose e submetidos a uma corrente constante de 90V por 45 minutos. As bandas do gel de agarose foram quantificadas em transluminador e fotodocumentadas.

3.4.6. Reação de sequenciamento

As amostras que apresentaram amplificação de material genético foram submetidas à reação de sequenciamento, em que foi utilizado 1 a 2µL do DNA amplificado em cada cavidade da placa e analisado por *DNA Sequencing Kit – Big Dye® Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction – ABI Prism®* (Life Technologies, USA). Foram utilizados *Big Dye Terminator 3.1* (Applied Biosystems), tampão de sequenciamento 2,5x (Invitrogen, USA), *primers* 1µM (LR35, ED31, ES7, ES8) e água livre de DNase/RNase para um volume final de reação de 20µL. Nos protocolos de recuperação foram utilizados os *primers* ED31, LR33, LR34 E LR36 (figura 5).

Após a reação de sequenciamento, foi realizada a purificação das amostras com isopropanol 75%. A placa foi centrifugada a 1.990xg por 45 minutos; o isopropanol foi desprezado por inversão seguindo-se a etapa de centrifugação da placa invertida a 150xg por 1 minuto. O sedimento seco foi ressuspenso com 20µL de formamida Hi-Di e as amostras foram sequenciadas em Sequenciador Automático ABI 3100 (ABI, USA).

Primer	Sequência (5' - 3')	Gene	Localização ^a
ED5	ATGGGATCAAAGCCTAAAGCCATGTG (F)	<i>Env</i>	6557-6582
ED12	AGTGCTTCCTGCTGCTCCCAAGAACCCAAG (R)	<i>Env</i>	7811-7782
ES7	CTGTAAATGGCAGTCTAGC (F)	<i>Env</i>	7002-7021
ES8	CACTTCTCCAATTGTCCCTCA (R)	<i>Env</i>	7668-7648
ED31	CCTCAGCCATTACACAGGCCTGTCCAAAG (F)	<i>Env</i>	6817-6845
LR34	GAAAAATTCCCCTCCACAATT (R)	<i>Env</i>	7373-7353
LR35	CTCAACTGCTGTAAATGGCAGTCT (F)	<i>Env</i>	6994-7018
LR36	AATTTCTGGGTCCCCTCCTGAGGA (R)	<i>Env</i>	7337-7314

Figura 5. Sequência de *primers* utilizados para amplificar a região do *envelope* do HIV-1.

^a Posição relativa à referência HXB2 do HIV. Os *primers* estão descritos em Delwart, 1995.

Os arquivos gerados pela reação de sequenciamento, denominados de cromatogramas, são representados por meio de ondas (“picos”) com sinais coloridos e contém as informações da sequência de ácidos nucleicos, bem como informam a qualidade da reação. Foram seqüenciados dois fragmentos, um fragmento *forward* (*sense*) e um *reverse* (*nonsense*). Os

cromatogramas foram alinhados e editados manualmente, utilizando-se o software Sequencher (Gene Codes Corporation,USA). As sequências finais obtidas pela edição das sequências foram salvas em formato Fasta.

3.4.7. Edição e análise das sequências genéticas

Os arquivos fastas da edição da região *env* foram submetidos aos *websites* do NCBI (*National Center for Biotechnology Information-NIH*) disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genotyping/formpagex.cgi> e *REGA* disponível em <http://bioafrica.mrc.ac.za/subtypetool/html/subtyping.html> para análise de subtipos do HIV-1. O *website* “Genotyping” do NCBI realiza a análise por meio da comparação por BLAST da sequência genética da amostra com as sequências de referência de cada subtipo do HIV. O *website* “REGA HIV-1 Subtyping Tool - Version 2.0” realiza as análises de subtipos por meio da combinação de análises filogenéticas com os métodos de *bootscanning*.

3.4.8. Análise filogenética

Para a realização de análises filogenéticas, os arquivos fastas da região *env* gerados pela edição manual foram alinhados com as sequências de referências de HIV-1, obtidas de Los Alamos National Laboratory (LANL) (<http://hiv-web.lanl.gov>), com o uso de software ClustaW. Os alinhamentos foram corrigidos manualmente por meio de programa BioEdit. Com o auxílio do programa PAUP4b10 as matrizes de distância foram obtidas utilizando-se o modelo de substituição nucleotídica definido pelo Modeltest os algoritmos de reconstrução filogenética “Neighbor Joining” e “Maximun Likelihood” foram empregados para as análises. O índice de sustentabilidade dos ramos foi testado pela metodologia de “*bootstrapping*” com 1000 pseudo-réplicas, considerando-se 70% o nível de sustentabilidade e o teste de significância

estatística “*zero-length*” nos valores de $p < 0,001$ e $p < 0,05$. As árvores filogenéticas foram visualizadas com o programa Tree View.

3.4.9. Análise genotípica do tropismo viral

Os arquivos fastas da região do envelope foram alinhados e submetidos ao *site* juntamente com os dados de carga viral e linfócitos TCD4 determinados no momento da coleta da amostra, que geraram os dados de predição clonal e clínica do tropismo. A predição do tropismo foi analisada por meio da ferramenta de bioinformática *Geno2-Pheno_[coreceptors]* (g2p), programa disponível por *website* (<http://coreceptor.bioinf.mpi-inf.mpg.de/>), que realiza a predição de tropismo por meio de um algoritmo de correlação do genótipo/fenótipo utilizando-se a informação de 1100 sequências *naïve* da região V3.

Nesta ferramenta é possível alterar o nível de significância da análise com variação da taxa falso positivo (*False Positive Rate* - FPR) de 1% a 20%. O FPR é a probabilidade de classificar os vírus R5 falsamente como X4. A escolha do FPR para a definição de tropismo foi estabelecido de acordo com a sugestão do Consenso Europeu para Testes de Tropismo, realizado em 2010, em que foi preconizado o uso do FPR de 20% quando o sequenciamento das amostras não for realizado em triplicata (Vandekerckhove, 2011). Foi utilizada ainda a opção FPR clínico, que incluem dados sobre o paciente que podem melhorar a predição, e esse critério foi avaliado em paralelo.

3.4.10. Análises estatísticas

Todas as informações clínicas e laboratoriais foram transcritas para um banco de dados informatizado, utilizando-se o software EpiInfo (versão 6.04). Os dados foram analisados quanto à consistência e foram realizadas as correções pertinentes. As análises estatísticas foram efetuadas por meio de programas *GraphPad Prism 5.0* e *STATA8*. Para variáveis categóricas foi empregado o teste *Yates corrected* ou Teste Fisher quando apropriado. Para as variáveis contínuas foi utilizado o teste Mann-Whitney.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Distribuição da casuística

Neste estudo foram incluídas 87 crianças e adolescentes infectados pelo HIV-1, acompanhados no Serviço de Infectologia Pediátrica da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo entre os anos de 2000 a 2010. O total de 196 amostras biológicas destes pacientes foi encaminhado ao Instituto Adolfo Lutz durante o seguimento clínico-laboratorial.

Em virtude da heterogeneidade dos indivíduos do estudo quanto aos números de entradas de amostras biológicas e tempo de seguimento clínico, a população do estudo foi dividida em grupos (Figura 6). Esta divisão foi necessária por tratar-se de uma avaliação que buscou relacionar dados clínico-laboratoriais com a evolução clínica dos indivíduos. Foram utilizados dois critérios para a divisão dos Grupos:

- tempo de seguimento clínico e
- presença de informação molecular da região do envelope do HIV

Grupo A: indivíduos com tempo de seguimento clínico inferior a seis meses (N=16) com informações moleculares de uma única coleta.

Os demais pacientes, que possuíam seguimento clínico maior que seis meses, foram sub-divididos em três grupos: B, C e D.

Grupo B: indivíduos com tempo de seguimento clínico superior a seis meses e com informação molecular do envelope do HIV no início do seguimento (N=46);

Grupo C: indivíduos com tempo de seguimento clínico superior a seis meses, porém com informação molecular do envelope do HIV ao final do seguimento (N=13);

Grupo D: indivíduos com tempo de seguimento clínico superior a seis meses, porém sem informação molecular do envelope do HIV (N=12).

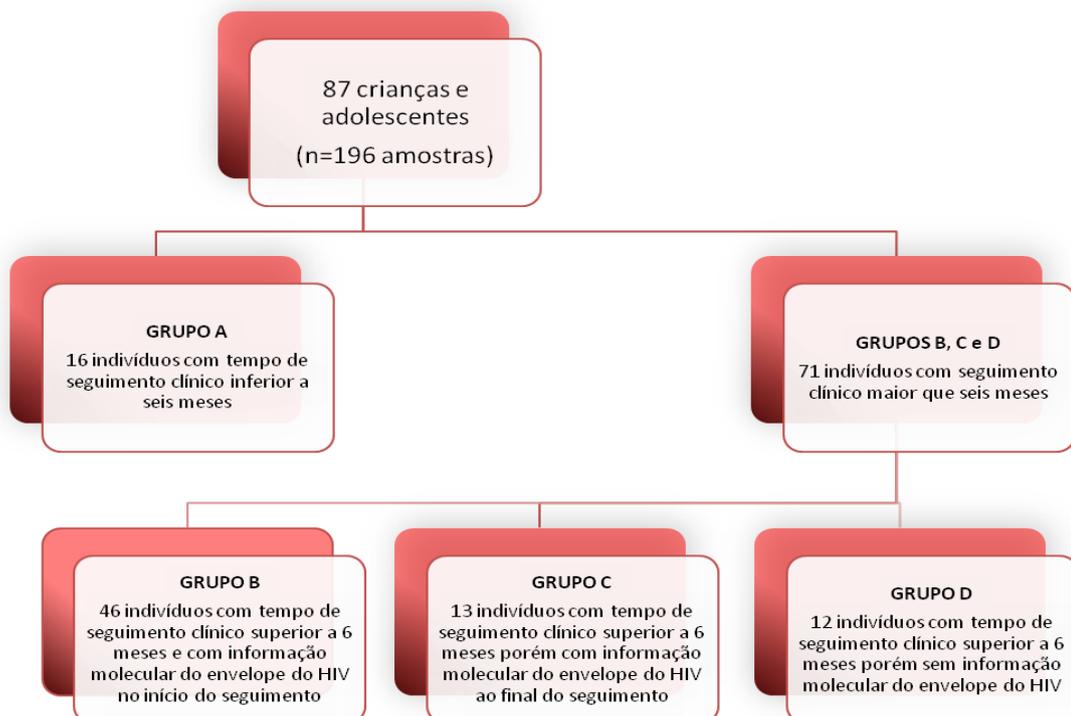


Figura 6. Diagrama representando a distribuição das amostras e pacientes participantes do estudo em cada grupo no período de 2000 a 2010.

4.2. Características gerais da população estudada

Quanto ao gênero, 45% dos pacientes eram do sexo masculino. A principal forma de transmissão do HIV foi a vertical, que representa 82% (71/87) das crianças e adolescentes, seguidos por transfusão sanguínea em 2% e transmissão desconhecida em 16% dos pacientes.

Na entrada no estudo, a mediana de idade foi 8 anos (1-15), com valores medianos de TCD4 454 células/mm³ e CV de 5,1log₁₀. A tabela 1 apresenta as informações obtidas nos prontuários dos pacientes incluídos no estudo.

Tabela 1. Informações clínico-epidemiológicas dos pacientes referentes à entrada no estudo (2000-2010).

	Nº Indivíduos	Idade (anos) ^a	Sexo (masc)	TI ^a (anos)	TS ^a	Presença Sintomas ^b	TCD4 (cél/mm ³) ^a	CV (log ₁₀) ^a	Número Tratamentos ^a	TT ^a
Grupo A	16	1	63%	1	2 meses	75%	771	5,0	1	1 mês
Grupo B	46	9	37%	7	8 anos	87%	286	5,2	3	8 anos
Grupo C	13	14	46%	13	7 anos	92%	500	4,6	3	9 anos
Grupo D	12	9	50%	7	6 anos	92%	435	4,9	3	5 anos
Total	87	8	45%	5	6 anos	86%	454	5,1	3	6 anos

Legenda: ^a valores medianos. (TI) tempo de infecção calculado no pacientes com transmissão vertical entre a entrada no estudo e data de nascimento do paciente. (TS) Tempo de seguimento no Serviço de Infectologia Pediátrica da Santa Casa de São Paulo entre a data de entrada no estudo e a última observação clínica. (CV) carga viral. (TT) tempo total de tratamento. ^b Sintomas classificados entre as categorias clínicas A, B e C (CDC, 1994). Divisão dos grupos: grupo A – indivíduos com tempo de seguimento clínico inferior a seis meses; grupo B – indivíduos com tempo de seguimento clínico superior a 6 meses e com informação molecular do envelope do HIV no início do seguimento; Grupo C – indivíduos com tempo de seguimento clínico superior a 6 meses porém com informação molecular do envelope do HIV ao final do seguimento; e Grupo D – indivíduos com tempo de seguimento clínico superior a 6 meses porém sem informação molecular do envelope do HIV.

4.3. Estadiamento clínico

Na entrada do estudo, apresentavam-se 14% dos pacientes assintomáticos e ao final do estudo 62% estavam sem sintomas. Dois pacientes não possuíam informações sobre alteração imunológica no início do estudo e em um paciente não possuía nenhuma informação. A Tabela 2 apresenta o estadiamento clínico no início do estudo e a figura 7 a distribuição de acordo com a faixa etária.

Tabela 2. Classificação segundo CDC quanto à infecção pelo HIV em crianças e adolescentes na entrada no estudo (2000-2010).

Classificação da infecção pelo HIV		Total
Categorias Clínicas	N = 12	14%
	A = 12	14%
	B = 18	21%
	C = 44	51%
	Ausente = 27	32%
Alteração Imunológica	Moderada = 27	32%
	Grave = 30	36%

Legenda: Categorias clínicas (N) assintomático; (A) sinais e sintomas leves; (B) sinais e/ou sintomas moderados e (C) sinais e sintomas graves. Alterações Imunológicas (1) ausente; (2) Moderada e (3) Grave (Classificação CDC, 1994).

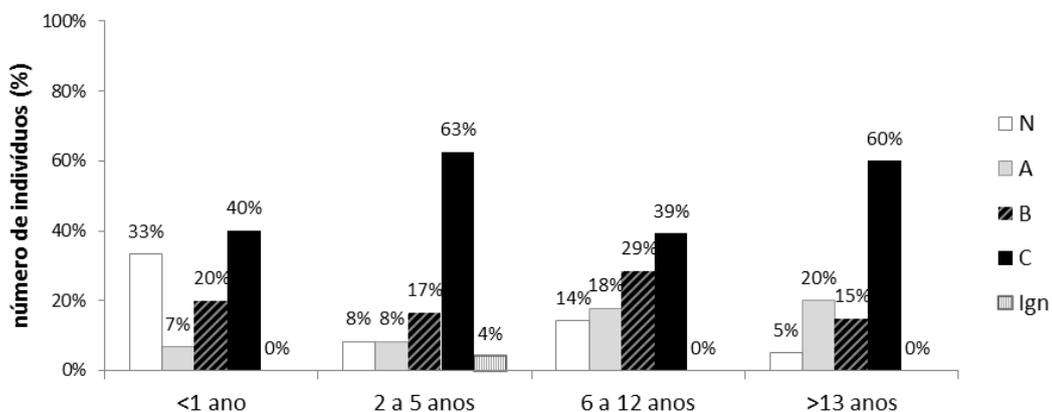


Figura 7. Classificação clínica da infecção pelo HIV, segundo CDC, das crianças e adolescentes de acordo com a faixa etária, na entrada no estudo (2000-2010).

Legenda: Categorias clínicas (N) assintomático; (A) sinais e sintomas leves; (B) sinais e/ou sintomas moderados e (C) sinais e sintomas graves.

4.4. Terapia antirretroviral

Em relação à TARV no primeiro tratamento, foi obtida informação de 79 pacientes (91%), sendo o esquema terapêutico mais freqüente AZT+DDI (17%), seguido por monoterapia com AZT (13%) e AZT+3TC (10%). Desses pacientes, 24% iniciaram o tratamento antes do ano de 1998, com o uso de monoterapia AZT ou terapia dupla AZT+DDI (Figura 8). A terapia com HAART introduzida a partir 1998, tornou-se após 2005 a única terapia de escolha para todos os pacientes deste estudo, e que iniciaram acompanhamento no serviço. Os esquemas mais utilizados foram AZT+3TC+LPV/r, seguido de d4T+TNF+LPV/r e DDI+d4T+LPV/r. Dos 87 pacientes, 42 (48%) não apresentavam exposição à TARV, denominados de “pacientes naïve” ou virgens de tratamento. Dentre estes, 25 pacientes (60%) tiveram coletas de amostras posteriores, no decorrer do seguimento clínico, portanto, obteve-se amostras coletadas pré e pós a introdução de TARV.

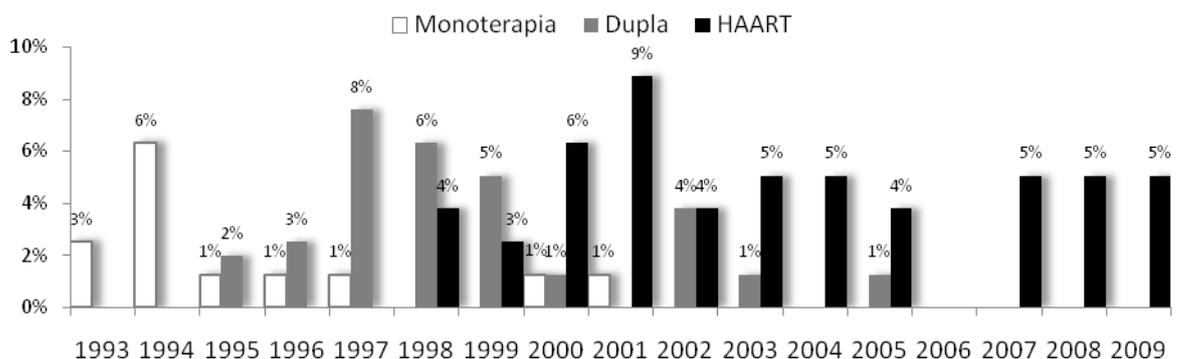


Figura 8. Distribuição da frequência de esquemas terapêuticos utilizados no primeiro TARV dos pacientes (n=79), por ano de início do tratamento (2000-2010).

Legenda: Monoterapia, tratamento ARV com um medicamento, geralmente AZT; Terapia Dupla, tratamento com dois ARV da mesma classe; HAART, terapia de alta potência com a combinação de duas ou mais classes de ARV.

4.5. Adesão ao tratamento

Entre os pacientes que receberam TARV, 28% foram classificados como adesão boa, 21% adesão intermediária e adesão baixa em 35%, Em 8% dos pacientes não foi possível avaliar a adesão pela perda de seguimento no serviço.

4.6. Análises moleculares

Durante o período do estudo foram recebidas 196 amostras. Foi realizado o sequenciamento de 134 amostras (68%), coletadas de 73 pacientes, para a região do envelope do HIV, com a utilização do protocolo padrão e, quando necessário, do protocolo de recuperação. Dentre essas, 86 amostras (64%) foram sequenciadas a partir do cDNA e 48 amostras (36%) a partir do DNA genômico.

4.6.1. Análise do subtipo viral

Na análise do subtipo viral, o subtipo B foi o mais prevalente observado em 73% (53/73) das amostras, seguido por F1 em 22% (16/73) e subtipo C em 4% (3/73) e 1% de recombinante BF (1/73). Dentre as amostras subtipo B, a variante brasileira B-Br foi encontrada em 11 amostras (20%).

A figura 9 mostra a árvore filogenética representativa da região do envelope (600 pb). Os ramos representam as amostras do mesmo paciente coletadas em diferentes momentos do estudo.

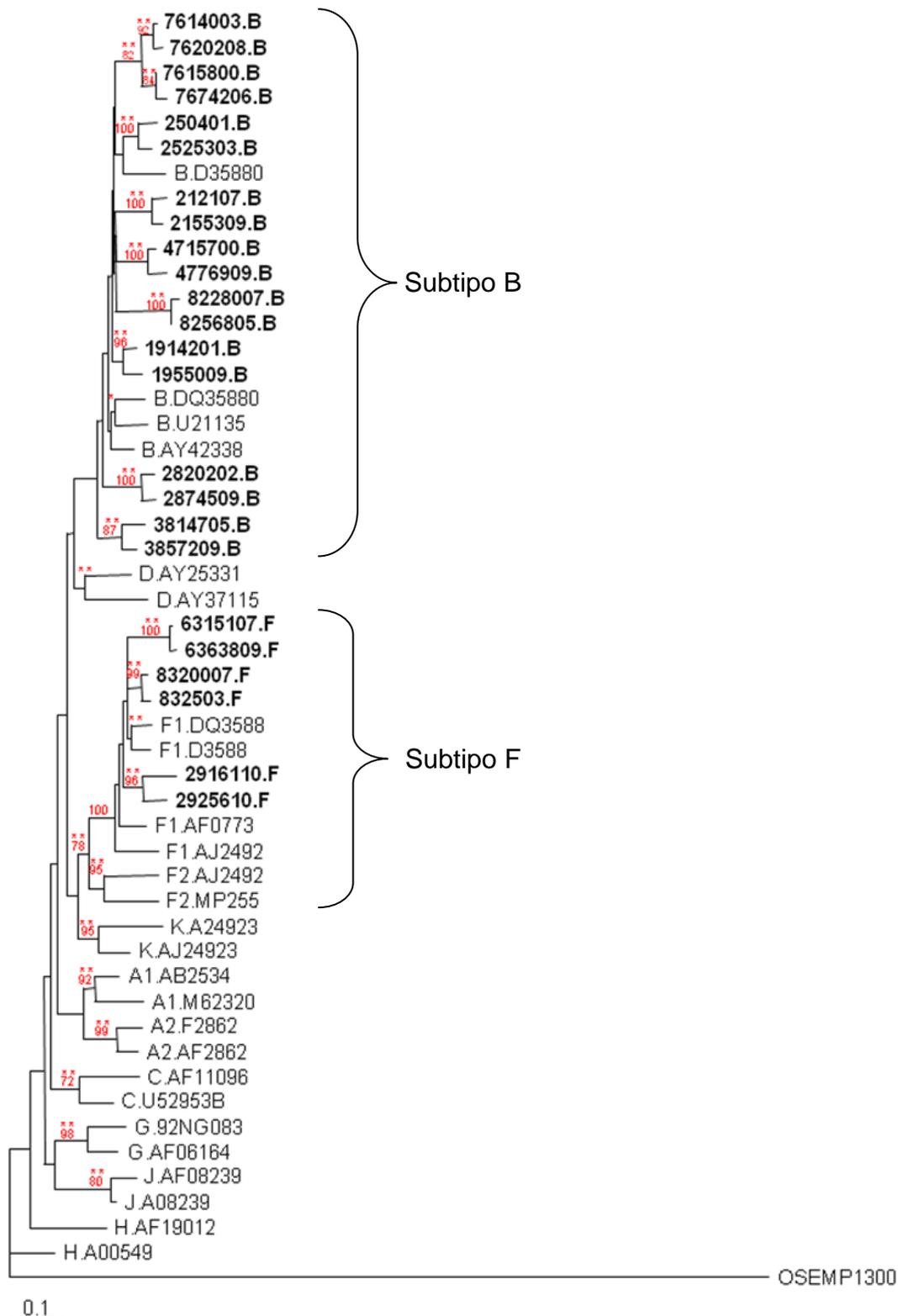


Figura 9. Árvore filogenética com a representação da região do envelope (600 pb) de amostras de 11 pacientes. Foi utilizado o algoritmo de reconstrução filogenética “Neighbor Joining”, empregando-se o modelo de substituição nucleotídica GTR+I+G. Os valores de *bootstrap* estão expressos em porcentagem por 1000 réplicas. Estão indicados somente os valores de *bootstrap* superiores a 70% em vermelho. Os valores do teste de zero length estão expressos como * $p < 0,05$ e ** $p < 0,001$ em vermelho. Em negrito, as sequências analisadas neste estudo, com os ramos de amostras de um mesmo paciente. As sequências de referências foram obtidas no HIV Sequence Database (Los Alamos).

4.6.2. Predição do tropismo

Para a predição do tropismo foi utilizada uma classificação dicotômica com taxas de FPR20% em que os vírus foram classificados como R5 ou X4. A predição genotípica do tropismo viral foi realizada em 134 amostras e a presença da variante R5 foi detectada em 57% das sequências utilizando-se o FPR 20% clonal e em 65% das amostras com o uso de FPR 20% clínico (figura 10).

Considerando-se a primeira amostra sequenciada de cada paciente, a presença de vírus R5 foi observada em 40 amostras (55%) com o emprego de FPR 20% clonal e em 33 amostras (64%) baseando-se no FPR 20% clínico.

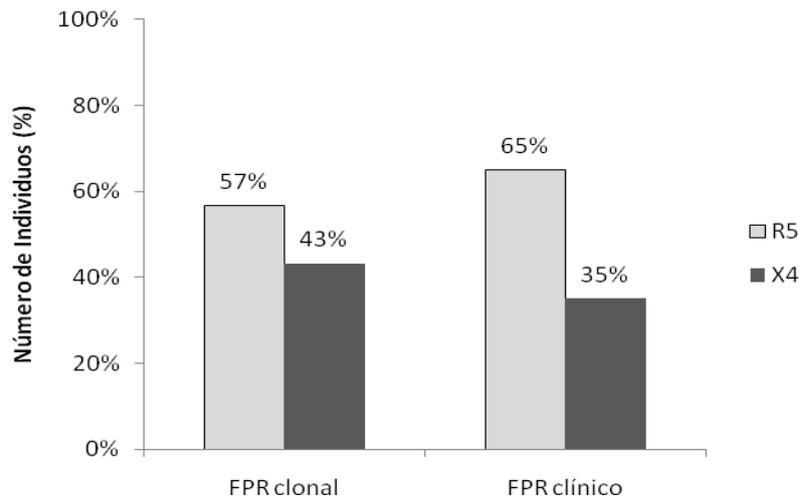


Figura 10. Predição do tropismo para as amostras analisadas, coletadas no período de 2000 a 2010 (n=134).

No geral, os pacientes com tropismo viral R5 apresentaram valores de TCD4 mais elevados na entrada do estudo e ao longo do acompanhamento, quando comparados com os pacientes com tropismo viral X4 o tropismo foi associado também à sintomatologia no início do estudo (tabela 3).

Tabela 3. Comparação do tropismo clonal na entrada do estudo com os dados clínicos para cada paciente (N=73)¹

	Tropismo viral R5 (n=40)	Tropismo viral X4 (n=33)	Valor de p (estatística)
Uso HAART no 1º esquema (%)	48	52	0,995
Valores de TCD4 (cél/s/mm ³)			
Entrada do estudo	593	220	0,0021
Mais baixo (nadir)	282	30	0,0001
Final do estudo	598	324	0,0021
Valores de Carga Viral (log ₁₀)			
Entrada do estudo	5,2	5,2	0,649
Final do estudo	2,1	3,8	0,125
Classificação clínica (assintomáticos - %)			
Entrada do estudo	24	5	0,0440
Final do estudo	84	50	0,428
Adesão aos ARV (%)			
Boa	48	32	0,535
Regular	26	14	0,548
Ruim	26	54	0,205
Subtipos virais (%)			
B	70	76	0,970
C	8	0	0,253
F	20	24	0,942
Recombinante	2	0	0,912

Legenda. ¹ valores medianos.

A análise univariada não demonstrou associação entre o tropismo clonal/clínico na entrada do estudo e a via de transmissão, sexo, tempo de infecção, tempo de seguimento e tempo de tratamento. Quanto ao subtipo viral, o subtipo B (mais frequente) não esteve associado com vírus R5 ou X4, porém nos pacientes com vírus subtipo C foi observado somente vírus com tropismo R5.

4.6.3. Assinaturas da alça V3

Os padrões de assinaturas da alça V3 do HIV encontrados na primeira entrada de cada paciente foram GPGR (29%), seguido de GWGR (19%) e GPGQ (12%). A frequência de assinaturas com misturas foi de 7%. Outras assinaturas observadas foram: AFGR, APGR, GFGK, GFGR, GGGR, GLGK, GLGR, GPGK, GPGS, GPPR, GQGR, GWRR, SRWR, VFGR e

GRGR no total de 33% (figura 11). Destas, as assinaturas APGR, GFGR, GLGR, GPGK, GPGG e GRGR foram encontradas em mais de um paciente.

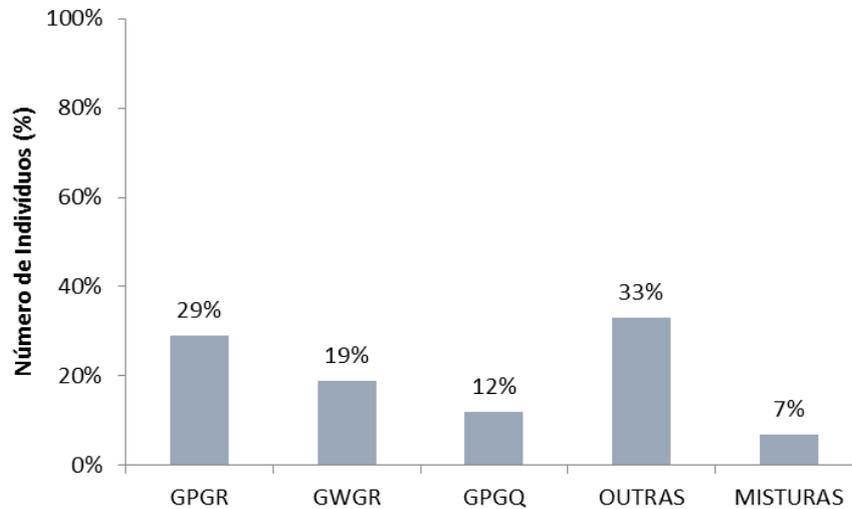


Figura 11. Frequência de assinaturas da alça V3 do envelope do HIV-1 encontradas na primeira amostra sequenciada de cada paciente (n=73).

Quanto às assinaturas mais comuns GWGR e GPGR, foi observada uma associação significativa entre vírus R5 e a assinatura GWGR ($p=0,0007$). Não houve associação de tropismo viral em relação às outras assinaturas encontradas, contudo todos os pacientes que possuíam assinaturas com dois aminoácidos básicos (SRWR e GRGR) foram X4.

Para melhor avaliar a relação da assinatura viral com os níveis de TCD4, os valores de TCD4 foram dicotomizados em <350 células/ mm^3 e >350 células/ mm^3 . Avaliando-se a assinatura GWGR em comparação às outras assinaturas foi notada associação significativa da assinatura GWGR com valores de TCD4 mais elevados no início do seguimento ($p=0,019$), bem como no nadir TCD4 ($p=0,015$), porém, em relação a última avaliação, a diferença não foi significativa ($p=0,63$).

4.7. Evolução clínica dos pacientes

No grupo de pacientes com seguimento clínico foram analisados dois desfechos principais: a progressão da doença e a viremia plasmática ao final do estudo. Para analisar cada um desses desfechos foram considerados outros dados clínico-laboratoriais como idade, sexo, valores de TCD4 e carga viral durante seguimento, adesão, número de TARV, subtipo, entre outros. O objetivo foi ponderar quais dos fatores poderiam estar associados aos desfechos, como o intuito de encontrar possíveis marcadores de boa ou má evolução clínica.

4.7.1. Desfecho 1 - Progressão da doença

A progressão da doença foi avaliada no grupo de pacientes que tiveram acompanhamento clínico por mais de seis meses no serviço. Dos 87 pacientes incluídos, foi possível avaliar a progressão em 71 pacientes (grupos B, C e D) que nesse período tiveram amostras coletadas, e os isolados foram analisados pelo sequenciamento da região do envelope. A tabela 4 descreve os critérios utilizados para categorizar a progressão clínica dos pacientes.

Tabela 4. Critérios para classificação da progressão da doença nos pacientes dos grupo B, C e D (n=71).

Progressão Boa	Pacientes que apresentaram valores de TCD4 superiores a 350 células/mm ³ na última avaliação e ausência de sinais e sintomas clínicos. Pacientes com idade inferior a cinco anos que tiveram valor TCD4 limite de ≥ 750 células/mm ³ .
Progressão Ruim	Pacientes que apresentaram TCD4 abaixo de 350 células/mm ³ ou presença de doença clínica ou óbito.

Os pacientes que tiveram boa progressão clínica (59%), apresentaram tempo mediano de tratamento de seis anos, com valores de TCD4 e carga viral respectivamente de 473 células/mm³ e 5,0 log₁₀, na entrada do estudo. A adesão ao tratamento nesse grupo foi considerada boa em 57% dos pacientes.

Os pacientes com progressão ruim (41%) apresentaram tempo mediano de tratamento de oito anos, com valores de TCD4 e carga viral na entrada do estudo, respectivamente, de 225 células/mm³ e 5,2 log₁₀. A adesão ao tratamento nesse grupo foi considerada boa em 7% dos pacientes.

Quanto à análise do subtipo do envelope dos pacientes com boa progressão 70% eram do subtipo B, 24% eram do subtipo F e 6% do subtipo C. No grupo de pacientes com progressão ruim 73% eram do subtipo B, 23% eram do subtipo F e 4% do subtipo recombinante.

Em relação ao tropismo viral, 79% dos pacientes com boa progressão e 50% dos pacientes com progressão ruim apresentaram tropismo clínico R5, e essa associação foi significativa. Quanto ao tropismo clonal, não foi observada essa associação. Em relação às assinaturas da alça V3 do envelope GPGR e GWGR, mais frequentemente encontradas neste estudo, não houve associação com progressão boa ou ruim da doença.

Na análise univariada, os pacientes considerados com boa progressão estiveram associados à carga viral indetectável, ao longo do acompanhamento, aos valores elevados de TCD4 durante o seguimento, ao tropismo viral clínico R5 (tabela 5) e boa adesão ao tratamento (figura 12).

Tabela 5. Comparação da progressão da doença com dados clínicos e moleculares nos pacientes dos grupo B, C e D (N=71)

	Progressão BOA (n=42)	Progressão RUIM (n=29)	<i>p</i> (análise estatística)
Idade	9 anos	9 anos	0,277
Sexo (masculino %)	41	41	0,904
Clínica entrada (%)			
Assintomáticos	14	7	0,166
Sintomáticos	86	93	
Adesão ¹ (%)			
boa	57	7	
regular	19	29	0,001
ruim	24	57	
ignorado	0	7	
Naive (%)	45	8	0,264
Tempo tratamento (anos)	6	8	0,076
Número tratamentos	3	4	0,809
Uso de HAART no 1º trat (%)	55	34	0,149
Tempo de Seguimento (anos)	7	9	0,257
Tempo Infecção (anos)	9	9	0,621
TCD4 entrada (cél/s/mm ³)	473	225	0,060
TCD4 nadir (cél/s/mm ³)	395	45	0,001
CV entrada (log ₁₀)	5,0	5,2	0,745
Indetectável (%)	71	38	0,007
CV final (log ₁₀)	1,7	4,0	0,002
FPR 20% clonal (%)			
R5	67	43	0,065
X4	33	57	
FPR 20% clínico (%)			
R5	79	50	0,021
X4	21	50	
Assinaturas (%) ²			
GPGR	24	31	0,683
GWGR	21	12	0,507
Subtipo (%)			
B	70	73	0,646
F	24	23	0,795
C	6	0	0,001
recombinante	0	4	0,001

Legenda:¹ Para adesão, foi considerada adesão boa *versus* adesão regular e ruim. ² Nas análises foram consideradas somente as assinaturas mais prevalentes e a análise foi realizada correlacionando-se a assinatura *versus* as outras assinaturas encontradas. Foram utilizados valores medianos para frequência simples. As análises estatísticas significantes estão destacadas em negrito. Para variáveis categóricas foi o teste Yates corrected ou Teste Fisher quando apropriado. Para variáveis contínuas foi empregado o teste Mann-Whitney.

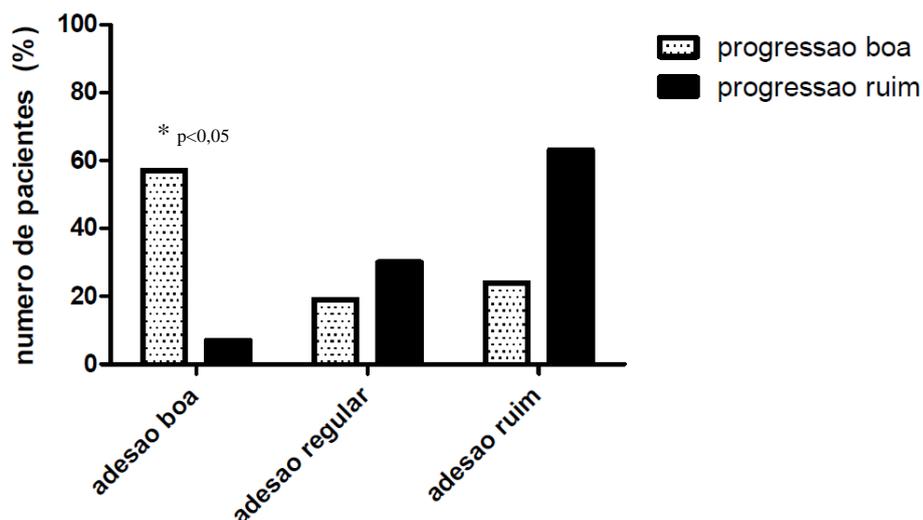


Figura 12. Adesão ao tratamento no grupo de pacientes com boa progressão e progressão ruim da doença (n=71).

Os sete pacientes que foram a óbito ao longo do acompanhamento (grupo maus progressores) apresentaram diferenças quanto à evolução da doença, dos quais três foram a óbito com menos de um ano de vida (progressores rápidos) e outros quatro pacientes mais tardiamente.

Os pacientes progressores rápidos (n=3) eram virgens de tratamento, foram infectados por transmissão vertical e apresentaram sintomas graves da doença durante o primeiro ano de vida. Quanto aos subtipos encontrados foram dois pacientes com subtipo B e um do subtipo F1. Na predição do tropismo dois pacientes eram infectados por vírus R5 e um paciente por vírus X4.

O grupo de pacientes que foi a óbito mais tardiamente (n=4) foi composto de um paciente de cinco anos de idade e outros três pacientes maiores de 10 anos de idade, sendo que três foram infectados por transmissão vertical e um de transmissão ignorada. Todos os pacientes receberam tratamento antirretroviral, mas apresentaram queda progressiva dos valores de TCD4, elevação da carga viral com sinais e sintomas relacionados à AIDS próximos dos cinco aos sete anos de idade. Deste grupo dois foram infectados com vírus R5 pelo FPR clonal e dois por vírus

X4 no FPR clínico. Todos foram do subtipo B. Todos vieram a óbito devido a complicações decorrentes a infecções oportunistas.

4.7.2. Desfecho 2 – Supressão virológica

Para avaliar quais os fatores poderiam estar relacionados à supressão virológica, os pacientes com informações clínico-laboratoriais na última observação foram classificados em: virêmicos, aqueles que apresentavam valores de carga viral $>1,7\log_{10}$; e avirêmicos, aqueles com valores de carga viral $<1,7\log_{10}$.

Segundo essa classificação, o número de pacientes que estavam avirêmicos foi de 37%, com valores de TCD4 e carga viral na entrada do estudo, respectivamente, de 337 células/mm³ e $4,7\log_{10}$. A adesão ao tratamento nesse grupo foi considerada boa em 65% dos pacientes, e 92% estavam assintomáticos na última avaliação clínica. O tempo mediano de tratamento foi de sete anos.

Os pacientes classificados como virêmicos (63%) apresentaram valores de TCD4 e carga viral na entrada do estudo, respectivamente, de 397 células/mm³ e $5,2\log_{10}$. A ausência de sintomas na última avaliação clínica foi observada em 71% dos pacientes e cinco pacientes evoluíram para óbito. A adesão ao tratamento nesse grupo foi considerada boa em 20% dos pacientes e o tempo mediano de tratamento foi de oito anos.

Em ambos os grupos foi analisada a supressão virológica ao longo do acompanhamento. No grupo dos avirêmicos, todos os pacientes já haviam apresentado a carga viral indetectável em algum outro momento do estudo; e no grupo dos virêmicos, a supressão virológica foi demonstrada somente em 33% dos pacientes.

Na análise univariada verificou-se que aviremia na última avaliação clínica foi associada ao uso de HAART no primeiro esquema, bem como estar assintomático ao final do estudo e, conseqüentemente, boa progressão

da doença (Tabela 6). Conforme a figura 13, a boa adesão também foi associada à supressão virológica.

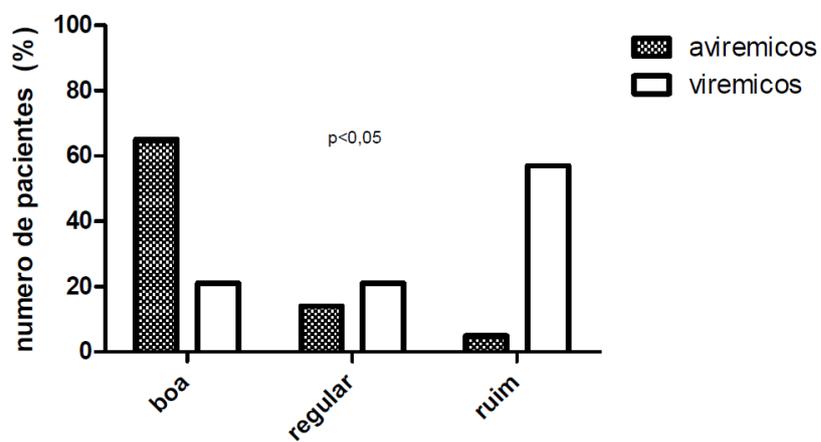


Figura 13. Adesão ao tratamento, na última avaliação clínica, dos grupos de pacientes virêmicos e avirêmicos.

Tabela 6. Comparação da supressão viral ao final do estudo com dados clínicos e moleculares nos pacientes dos grupo B, C e D (n=71).

	Avirêmicos n=26	Virêmicos n=45	p (estatística)
Idade (anos)	13	8	0,827
Sexo (masculino - %)	35	44	0,247
Clínica Entrada			
Assintomático	8	13	0,701
Sintomáticos	92	87	
Clínica Atual (%)			
Assintomático	96	71	0,024
Sintomáticos	4	29	
Progressão (%)			
Boa	85	44	0,002
Ruim	15	56	
Naive (%)	70	30	0,286
Adesão (%) ¹			
Boa	65	20	
Regular	27	20	0,001
Ruim	8	55	
Ignorado	0	5	
Tempo tratamento (anos)	7	8	0,775
Tratamentos (números)	3	3	0,950
Uso HAART no 1º esquema (%)	65	36	0,017
Tempo de Seguimento (anos)	7	7	0,761
Tempo Infecção (anos)	12	8	0,304
TCD4 entrada (cels/mm ³)	337	397	0,526
TCD4 nadir (cels/mm ³)	253	150	0,873
TCD4 final (cels/mm ³)	762	353	0,007
CV entrada (log ₁₀)	4,7	5,2	0,299
Indetectável (%)	100	33	0,001
FPR 20% clonal (%)			
R5	68	46	0,101
X4	32	54	
FPR 20% clínico (%)			
R5	73	60	0,306
X4	27	40	
Assinaturas (%) ²			
GPGR	36	22	0,320
GWGR	9	22	0,264
Subtipo (%)			
B	77	67	0,428
F	18	27	0,443
C	5	3	0,708
BF	0	3	0,001

Legenda: ¹Para adesão foi considerado adesão boa *versus* adesão regular e ruim. ²As análises foram consideradas somente as assinaturas mais prevalentes e a análise foi realizada por meio da associação entre a assinatura *versus* as outras encontradas. Foram utilizados valores medianos para frequência simples. As análises estatísticas significantes estão destacadas em negrito. Para variáveis categóricas foi utilizado o teste Yates corrected ou teste Fisher quando apropriado. Para variáveis contínuas foi empregado o teste Mann-Whitney.

Quanto à análise do subtipo do envelope nos pacientes avirêmicos o subtipo B foi mais prevalente em 77% dos pacientes. No grupo de pacientes classificados como virêmicos o subtipo B foi observado em 67% dos pacientes e 3% apresentaram subtipo recombinante.

Em relação ao tropismo viral aproximadamente 68% dos pacientes avirêmicos e 46% dos pacientes virêmicos apresentavam tropismo viral clonal R5. Quanto às assinaturas da alça V3 do envelope mais frequentemente encontradas, 36% dos pacientes avirêmicos tinham a assinatura GPGR e outros 9% a assinatura GWGR. Entre os pacientes virêmicos ambas as assinaturas foram encontradas em 22% dos pacientes.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Este estudo analisou os dados clínicos e moleculares de crianças e adolescentes vivendo com HIV/AIDS, acompanhados desde sua admissão no Serviço de Infectologia Pediátrica da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo, entre os anos de 2000 a 2010.

5.1. Desenho e fluxo operacional

Os estudos observacionais longitudinais são importantes pois permitem efetuar avaliação sequencial durante o seguimento clínico dos indivíduos. Entretanto, apresentam complexidade de condução, uma vez que a análise e obtenção de dados dependem de fatores como assiduidade dos pacientes às consultas, registro de dados durante todo o período de acompanhamento, além da coleta e procedimento de amostras biológicas em vários períodos.

Neste estudo foi possível realizar o acompanhamento clínico de alguns pacientes durante os 10 anos de seguimento; no entanto, em 69% dos pacientes foi feito um acompanhamento parcial, em função da perda de seguimento ou mudança de serviço clínico.

Os pacientes do estudo foram agrupados de acordo com o período de acompanhamento e existência de dados moleculares do envelope viral, com o objetivo de se buscar possíveis marcadores relacionados à evolução clínico-laboratorial. Em relação ao desfecho, este estudo definiu dois critérios de avaliação: progressão clínica da doença e supressão viral.

O Serviço de Infectologia Pediátrica da Santa Casa de São Paulo acompanhou aproximadamente 100 crianças e adolescentes com infecção por HIV até 2010. Este estudo avaliou aproximadamente 87% dessa casuística. O Laboratório de Retrovírus do Instituto Adolfo Lutz é referência laboratorial para este serviço na execução de testes de genotipagem de HIV pela RENAGENO (Rede Nacional de Genotipagem). Dessa forma, as amostras de pacientes com critérios de falência virológica, têm sido enviadas

ao Laboratório para realização do teste, como estabelecido pelo PN-DST/AIDS do MS. Esse estudo utilizou este fluxo pré-analítico para a entrada das amostras para este estudo.

A análise dessa população específica iniciou-se em 2000 com o projeto *“Características Moleculares do HIV-1 em Crianças e Adolescentes”* desenvolvido na Santa Casa de São Paulo em parceria com o Instituto Adolfo Lutz, para onde foram enviadas as amostras de pacientes recentemente diagnosticados e virgens de tratamento, bem como as amostras de pacientes em falência virológica para realização do teste de genotipagem. As amostras foram processadas e armazenadas, e os laudos enviados ao serviço. Outros estudos realizados com uma parte dessa população avaliaram principalmente a região da polimerase e o perfil de resistência genotípica aos ARV (Almeida, 2005; Oliveira, 2008; Almeida, 2009).

Uma característica dessa população foi que as crianças infectadas por transmissão vertical geralmente foram diagnosticadas juntamente com suas mães, caracterizando uma população que adquiriu o vírus de pessoas não tratadas e que não conheciam seu diagnóstico. Esses pacientes receberam o diagnóstico ao nascimento, ou então mais tardiamente na infância após apresentarem sinais e sintomas graves relacionados à AIDS. (Almeida, 2005).

Outra característica importante foi da população apresentar características socioeconômicas similares e foram atendidas pelo mesmo grupo clínico, o que diminuiu a variabilidade na conduta clínica e o acesso aos ARV.

A população deste estudo apresentou heterogeneidade quanto à via de transmissão, idade, tempo de seguimento e diferentes estágios de desenvolvimento imunológico. Desta maneira, no desenho do estudo foi necessário efetuar a estratificação dessa população em grupos, baseado em basicamente dois critérios: o período de acompanhamento e a existência de dados moleculares.

5.2. Características da população estudada

A presença de sintomas na entrada do estudo foi relatada em mais de 80% dos pacientes. Nesse caso, foram selecionados os pacientes classificados com o espectro clínico das categorias A a C, como definido pelo CDC. Como citado acima, esse alto índice de pacientes sintomáticos pode ser explicado por uma característica da população, que procurou o serviço clínico após apresentarem sinais e sintomas da doença. Se forem considerados somente os pacientes que entraram no estudo com sintomas associados à AIDS, ou seja, somente a categoria C, observa-se taxa de 40%. Avaliando-se a evolução clínica dos pacientes, ao final do estudo somente 10% apresentaram sintomas. Essa baixa frequência pode estar relacionada a vários fatores, entre eles o tipo de esquema medicamentoso (HAART) utilizado na primeira terapia ARV.

Nos pacientes com rápida progressão para AIDS e óbito em menos de um ano de seguimento (N=3), denota-se a ocorrência de fatores em comum, como via de transmissão vertical, idade inferior a 12 meses e a ausência de terapia ARV. Entretanto, em virtude do número de pacientes ser limitado não há possibilidade de estabelecer associação ou relação causal nestes indivíduos. Os pacientes que evoluíram para óbito mais tardiamente (N=4), após 5 a 15 anos de evolução, apresentaram TCD4 inferior a 350 céls/mm³ na entrada, com queda progressiva durante a evolução e maior frequência de vírus X4 (3/4). Neste grupo de pacientes com evolução para óbito não houve associação com subtipo do HIV, tropismo viral e esquema ARV.

O tratamento em populações pediátricas é dificultado por vários fatores, entre eles a dependência dos cuidadores para a administração do medicamento, a falta de opções terapêuticas aprovadas e a toxicidade de algumas drogas. Com isto, a adesão à terapia ARV constitui um dos maiores desafios para o controle da doença nessa faixa etária. O presente estudo corrobora esta realidade, em que houve alta frequência de adesão ruim ao

tratamento (35%). Esse valor é considerado elevado, em vista do impacto da adesão ao TARV ser marcador na supressão virológica, no acúmulo de resistência aos ARV, na resposta terapêutica e na reconstituição imunológica. As análises deste estudo demonstraram que a adesão esteve significativamente associada aos dois desfechos de evolução da doença, os quais reforçam a sua importância no manejo terapêutico de pacientes.

Em relação à eficácia dos tratamentos, após a era HAART tem sido descrita a melhor sobrevida entre os pacientes infectados, principalmente em populações pediátricas (Matida, 2004). Na casuística estudada o uso de HAART como primeira escolha terapêutica resultou em maior supressão virológica (tabela 6), o que reforça a importância da escolha do esquema inicial de tratamento.

5.3. Análises moleculares

Quanto à frequência de subtipos do HIV-1 na região do envelope, os dados encontrados foram concordantes com os descritos na literatura no Brasil (Sabino, 1996; Brígido, 2005; Molina, 2009). Quanto ao subtipo C, uma variante menos frequente porém sob vigilância no país, foi detectado em três pacientes (4%). Os estudos em adultos têm descrito que a infecção por vírus do subtipo C está relacionada à taxa de progressão da doença mais lenta. Na casuística analisada, observou-se que todos os pacientes infectados com subtipo C apresentaram a assinatura GPGQ na alça V3 e tropismo viral R5, o que foi similar ao descrito na literatura para população adulta (Choge, 2006; Ferreira, 2008); entretanto, no presente estudo foi avaliado um número reduzido de pacientes e nenhuma associação pode ser analisada.

Verificou-se prevalência de 22% de assinaturas GWGR, similar aos estudos brasileiros em adultos (Ferreira, 2008; Franca, 2011). A assinatura GWGR é predominantemente encontrada no Brasil e seu aparecimento foi associado a taxas mais lentas de progressão para AIDS (Santoro-Lopes, 2000; Brito, 2006). Neste estudo foi notada a associação de GWGR com os

valores de TCD4 mais elevados, no início e ao longo do seguimento, e com tropismo R5 quando comparados a outras assinaturas. Esses achados podem ser importantes para populações pediátricas, visto que a contagem de TCD4 é um importante marcador de prognóstico e o tropismo R5 está associado com melhor evolução da doença, contudo ainda há poucos estudos em crianças que correlacionem essa assinatura com a progressão da doença.

5.4. Determinação do tropismo viral

O teste de genotipagem do HIV é realizado para avaliar a susceptibilidade aos medicamentos das classes NRTI, NNRTI e IP. O teste genotípico para predição do tropismo viral, constitui um método inovador a medida que avalia a susceptibilidade a uma classe de nova geração de drogas ARV, os antagonistas de R5. Por outro lado, a característica do receptor, R5 ou X4, tem sido associada com a progressão da doença (Raymond, 2010). Neste contexto, as informações que correlacionam tropismo com patogenese são praticamente inexistentes no Brasil, sobretudo em populações pediátricas.

A metodologia considerada como padrão-ouro para predição do tropismo viral é a fenotipagem, um método de alta complexidade e custo. No Brasil não existem centros especializados que realizem esse teste, com disponibilidade apenas em Laboratórios no exterior. Esses fatores levaram ao desenvolvimento de estratégias alternativas e mais acessíveis para avaliação do tropismo, e com isso a determinação genotípica tem sido estimulada e implementada. As ferramentas utilizadas atualmente para a predição genotípica do tropismo estão disponíveis em websites, gratuitamente.

As análises genotípicas das sequências da região do envelope podem ser realizadas por meio de metodologias simples, como a análise de carga elétrica da alça V3. Essa técnica, denominada regra 11/25, foi uma

das primeiras a serem descritas (Fouchier, 1995; Sierra, 2007) e apresenta facilidade em determinar a predição do tropismo por análise visual dos aminoácidos da alça V3. Uma limitação é a sensibilidade reduzida em relação as outras técnicas pois a regra avalia o tropismo pontualmente considerando os vírus como X4, as amostras que apresentarem aminoácidos básicos nas posição 11 e/ou 25 da alça V3.

Por outro lado, a análise de tropismo dispõe de ferramentas que utilizam modelos matemáticos mais complexos. O *WebPSSM* foi descrito por apresentar a melhor relação sensibilidade e especificidade para as ferramentas já descritas na literatura (Poveda, 2009; Garrido, 2008). O *WebPSSM* apresenta a desvantagem de necessitar da conversão da sequência para aminoácidos, e também em sequências que apresentam mistura de aminoácidos na alça V3, é necessário corrigir o alinhamento e submeter todas as possibilidades de sequências com mistura para realizar a predição. Outra desvantagem é que essa ferramenta analisa a predição somente para subtipos B e C, e não considera subtipos recombinantes e subtipo F1. Em virtude destas limitações, no presente estudo esta ferramenta de análise não foi empregada.

O *G2P* apresenta facilidade na submissão das sequências em formato fasta, e permite também realizar a predição clínica, que avalia os dados moleculares e dados clínicos como valor de TCD4 e carga viral. Seus resultados podem ser apresentados em FPR, os quais podem ser ajustados conforme a análise do estudo.

Um grupo de pesquisadores europeus, após realizar uma metanálise de diferentes trabalhos publicados nessa área, definiu um consenso para o uso de testes de tropismo. O grupo apontou que ambos os testes de fenotipagem e genotipagem são importantes e estes devem ser considerados, entretanto, avalia que os testes genotípicos oferecem alguns benefícios, como maior acessibilidade por menor custo e menor complexidade metodológica na execução (Vanderkerckhove, 2011).

Esse consenso também forneceu orientações sobre os aspectos técnicos e interpretativos: (a) reação de PCR e de sequenciamento

realizadas em triplicata e o uso da ferramenta G2P (modelo clonal) com o emprego de FPR de 10%. O mesmo procedimento deve ser feito se a amostra estiver com carga viral abaixo do nível de detecção, porém utilizando-se DNA proviral; (b) se o teste genotípico não for realizado em triplicata, o FPR da análise deve ser ajustado para 20% para garantir maior confiabilidade. Ainda segundo o consenso, os pacientes com indicação para realizar o teste de tropismo são: (1) indivíduos virgens de tratamento ARV, nos quais a toxicidade ou limitações terapêuticas podem ocorrer; (2) pacientes que apresentem falência virológica e com indicação de uso de antagonista do CCR5. Ainda de acordo com o consenso europeu, essa ferramenta apresentou resultados concordantes com os dados obtidos por métodos fenotípicos para subtipos B e não-B (Vanderkerckhove, 2011). Baseado nisso, esta foi a ferramenta de escolha para este estudo.

No presente estudo as amostras em análise não foram sequenciadas em triplicata e então o critério de FPR 20% foi usado de acordo com a sugestão do consenso. Os resultados obtidos demonstraram a possível presença de vírus X4 em 45% dos pacientes, na entrada do estudo, e associado à queda de valores de TCD4 e aparecimento de sintomas relacionados à AIDS (tabela 3).

Estudos em adultos utilizando-se ensaios fenotípicos encontraram a prevalência de 5-20% de tropismo X4 em infecções recentes (Moyle, 2005; Raymond, 2010) e em pacientes com doença avançada aproximadamente 50% dos pacientes apresentaram X4 (McGovern, 2010). No Brasil, os estudos em adultos mostraram frequência de X4 com variação de 5-30% (Ferraro, 2001; Ferreira, 2008; Franca, 2011). A presença de vírus X4 ainda é controversa, suão que conduz à discussão de seu papel na causa ou efeito de progressão da doença. O que se sabe é que seu aparecimento acontece geralmente mais tardiamente e está associado à depleção de linfócitos TCD4 (Moore, 2004).

Após a era HAART, discutiu-se a hipótese de que a supressão viral exercida pelos ARV poderia influenciar no aparecimento de vírus X4. Porém um estudo longitudinal de cinco anos realizado em 2008 (Briz, 2008), com

grupos de pacientes tratados e não tratados não observou diferenças significativas no aparecimento de X4 entre os grupos. Em 2006, Choge e cols. realizaram um estudo em crianças verticalmente infectadas e encontraram porcentagem de 38% de vírus X4. Outro estudo do Kênia encontrou prevalência genotípica de 31% e 28% de vírus X4, respectivamente, em indivíduos tratados e virgens de tratamentos (Lwembe, 2009).

Três pacientes desse estudo tiveram seu tropismo viral analisado em paralelo por meio da ferramenta G2P e também por meio de testes fenotípicos (Trofile™). Em ambas as análises observou-se a infecção por vírus duo-trópicos R5X4 em todos os pacientes.

Estudos de tropismo viral em crianças são limitados, somado ao fato de que a comparação entre eles é dificultada pela diferença de materiais biológicos utilizados (plasma/PBMC) e pelos métodos para predição do tropismo (fenotípicos/genotípicos).

5.5. Evolução clínica dos pacientes

A análise da evolução do HIV em crianças é complexa. Os fatores genéticos, virais ou relacionados à imaturidade do sistema imunológico, podem estar relacionados à patogênese em crianças, de forma diferente àquela descrita para adultos (Tiemessen, 2006, Cavarelli, 2010). Via de transmissão, subtipo viral, adesão ao tratamento, resistência aos ARV, taxas de replicação viral e contagem de linfócitos TCD4 têm sido classicamente associados ao prognóstico da doença (Zhang, 2006; Langford, 2007). No presente estudo foram avaliados alguns destes fatores na correlação entre tropismo viral e evolução.

Quanto ao desfecho de supressão virológica, houve associação da aviremia com boa adesão durante o tratamento, uso de HAART e valores elevados de TCD4 no final do seguimento. Estes dados são similares aos relatados na literatura para população adulta (Brigido, 2004); entretanto, em

crianças há limitação de resultados que possam estabelecer essas correlações.

Em relação ao desfecho de progressão, que considera fatores clínicos e imunológicos, este estudo encontrou associação significativa de boa progressão com adesão, valores de TCD4 mais elevados durante o seguimento ($p < 0,001$), fatores estes já descritos na literatura e utilizados na prática clínica como marcadores de evolução (Brigido,2004; Tiemessen,2006).

Outra associação encontrada foi boa progressão com tropismo viral R5 ($p < 0,05$). Esta informação sobre o tropismo é relevante, em vista do tempo de seguimento destes pacientes, o amplo e detalhado histórico clínico-laboratorial, e principalmente por tratar-se de uma população infantil, em que os dados são limitados na literatura, além disso, estas informações corroboram a importância do tropismo viral como marcador de progressão de doença. Estes achados em população infantil, similarmente a descrita em adultos, representam um importante auxílio no desafio do controle da infecção, e estabelece um acompanhamento clínico diferenciado subsidiado por informações moleculares virais. Da mesma forma, a caracterização de um genótipo X4 pode ser um sinalizador de comprometimento imunológico, uma vez que este tropismo tem sido associado ao pior prognóstico, com maior risco de evolução para AIDS. O teste de tropismo viral poderia ser utilizado em conjunto a todos os outros marcadores clínico e laboratoriais para auxiliar no prognóstico clínico dos pacientes.

A patogênese da infecção pelo HIV em crianças ainda constitui um dos grandes desafios para controle da epidemia. O desenvolvimento de metodologias laboratoriais, sobretudo na área genômica, pode tanto favorecer o conhecimento de características moleculares, como subsidiar com algumas respostas a essas questões. Nesta população diferenciada em suas características biológicas, o monitoramento clínico da infecção pelo HIV associado à análise de perfis genômicos relacionados à progressão de doença tornam-se relevantes. À semelhança dos estudos em adultos, este trabalho tentou contribuir no entendimento da diversidade do envelope viral

na evolução da infecção em crianças. Neste contexto, buscou-se realizar a predição do tropismo viral do HIV, por meio do teste genotípico em população infantil com monitoramento de longo seguimento realizado em um serviço pediátrico. O desafio é aprimorar métodos genotípicos de análise de tropismo viral e relacioná-los à evolução clínica com o objetivo de subsidiar a melhoria do prognóstico clínico nessa população.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

Neste estudo, a adesão terapêutica aos ARV demonstrou ser o principal fator associado a melhores desfechos clínicos, imunológicos e virológicos;

Valores de TCD4 mais baixo durante o seguimento (TCD4 nadir) foram associados à progressão ruim da doença e vírus com tropismo X4, os quais mostram a importância do acompanhamento desse marcador durante o seguimento clínico.

O uso de HAART como primeiro esquema de escolha na terapia ARV apresentou associação com a supressão virológica, o que significa sua eficácia no controle clínico da doença;

A assinatura viral da alça V3 GWGR foi associada com os valores de TCD4 mais elevados no início e durante o seguimento clínico e, também demonstrou associação com tropismo R5;

Quanto ao desfecho supressão virológica, foi observada associação com o uso de HAART no primeiro esquema ARV, boa adesão e valores de TCD4 mais elevado ao final do seguimento clínico;

Em relação ao desfecho progressão clínica, houve associação com a boa adesão ao tratamento, valores de TCD4 mais elevados durante o seguimento e tropismo viral R5;

O teste genotípico para predição do tropismo viral mostrou ser uma metodologia laboratorial de baixa complexidade e de boa interpretação, com viabilidade de acesso a pacientes para avaliação de susceptibilidade a novas drogas da classe dos antagonistas de CCR5;

A predição do tropismo viral R5 apresentou associação significativa com boa progressão da doença, o que indica seu uso como um marcador auxiliar no acompanhamento clínico de pacientes infectados pelo HIV;

Estudos longitudinais de populações pediátricas que avaliam os dados moleculares associados a dados clínicos, são importantes instrumentos para aprimorar o conhecimento da patogênese da infecção pelo HIV em crianças;

O desenvolvimento de metodologias laboratoriais na área de biologia molecular e sua aplicação como instrumentos para subsidiar informações para a atenção de saúde constitui estratégias relevantes para o controle da epidemia do HIV, no âmbito do Sistema Público de Saúde.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Almeida, Flávia Jacqueline. Caracterização molecular do HIV-1 em crianças e adolescentes. 2005. 119f. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo. São Paulo.

Almeida FJ, Berezin EN, Rodrigues R, Sáfadi MAP, Arnoni MV, Oliveira C, Brigido LFM. Diversidade e Prevalência das mutações de resistência genotípica aos Antirretrovirais entre crianças infectadas pelo HIV-1. *Jornal de Pediatria*. 2009; 85(2):104-9.

Barbosa AFT, Machado DM, Succi RCM. Síndrome da imunodeficiência adquirida na criança. Aspectos da patogênese, marcadores prognósticos e tratamento. *J Pediatr (Rio J)* 1999;75(1):3-8

Bismara, BAP. Padronização de Técnicas Moleculares para o Estudo da Resistência a Drogas Antirretrovirais em Crianças Infectadas pelo Vírus da Imunodeficiência Humana Tipo 1 (HIV-1) Via Perinatal. 2006. 166f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

Bredeek UF, Harbour MJ. CCR5 Antagonists in the Treatment of Treatment-Naive Patients infected with CCR5 Tropic HIV-1. *Eur J Med Res* 2007; 12: 427-34.

Brelot A, Alizon M. HIV-1 entry and how to block it. *AIDS*, 2001,15(5):3-11.

Brigido LFM, Rodrigues R, Casseb J, *et al.* CD4+ T-cell recovery and clinical outcome in HIV-1-infected patients exposed to multiple antiretroviral regimens: partial control of viremia is associated with favorable outcome. *AIDS Patient Care*. 2004, 18(4):189-97.

Brigido LFM, Franco HM, Custodio RM, Oliveira CAF, Ferreira JLP, Eira M, *et al.* Molecular characteristics of HIV type 1 circulating in São Paulo, Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2005; 21(7):673-82.

Brito A, Komninakis SC, Novoa P, *et al.* Women infected with HIV type 1 Brazilian variant, subtype B (B'-GWGR motif) have slower progression to AIDS, compared with patients infected with subtype B (B-GPGR motif). *Clinical Infectious Diseases*. 2006, 43(11):1476-81.

Briz V, Poveda E, Soriano V. HIV entry inhibitors: mechanisms of action and resistance pathways. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* (2006) 57, 619–627

Briz V, Poveda E, Gonzalez MM, *et al*. Impact of antiretroviral therapy on viral tropism in HIV-infected patient followed longitudinally for 5 years. *J Antimicrobial Chemotherapy*. 2008, 61:405-10.

Brumme ZL, Dong WWY, Ypi B, *et al* Clinical and immunological impact of HIV envelope V3 sequence variation after starting initial triple antiretroviral therapy. *AIDS* 2004; 18: F1-F9.

Cavarelli M, Scarlatti G. HIV-1 coreceptor usage: influence on mother-to-child transmission and pediatric. *J Transl Medicine*. 2010, 9(1):10.

Casseb J, Komninakis S, Abdalla L, *et al*. HIV disease progression: is the Brazilian variant subtype B' (GWGR motif) less pathogenic than US/European subtype B (GPGR)? *International Journal of Infectious Diseases*. 2002; 6:164-169.

Choge I, Cilliers T, Walkers P, *et al*. Genotypic and Phenotypic Characterization of Viral Isolates from HIV-1 Subtype C-Infected children with slow and rapid disease progression. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2006, 22(5):458-65.

Chueca N, Garrido C, Alvarez M. Improvement in determination of HIV-1 Tropism using the V3 gene Sequence and a Combination of bioinformatic tools. *JM Virology*. 2009, 81:763-7.

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

Clevestig P, Maljkovic I, Casper C, *et al*, The X4 Phenotype of HIV Type 1 Evolves from R5 in Two Children of Mothers, Carrying X4, and is not Linked to Transmission. *AIDS Research and Human Retroviruses* 2005; 21(5): 371-8.

Costin JM. Cytopathic Mechanisms of HIV-1. *Virology Journal*. 2007; 4:100-122.

Connor EM, Sperling RS, Gelber R, *et al*. The Pediatric AIDS Clinical Trials Group Protocol 076 Study Group. Reduction of Maternal-Infant Transmission of Human Immunodeficiency Virus Type 1 with Zidovudine Treatment. *New England Journal of Medicine*. 1994; 331:1173-1180.

Delobel P, Nugeyre MT, Cazabat M. Population-based sequencing of the V3 region of Env for predicting the coreceptor usage of human immunodeficiency virus type 1 quasispecies. *JC Microbiology*. 2007: 1572-80.

Delwart EL, Herring B, Rodrigo AG, Mullins JI. Genetic subtyping of human immunodeficiency virus using a heteroduplex mobility assay. *PCR Methods Appl.* 1995 (4):202-16.

Franca RFO, Castro-Jorge LA, Neto RJP, *et al.* Genotypic Characteristics of HIV Type 1 based on gp120 hypervariable region 3 of isolates from Southern Brasil. *AIDS Res Human Retroviruses.* 2011, 27(0)1-8.

Ferraro GA, Mello MAG, Sutmoller F. Biological Characterization and chemokine receptor usage of HIV type 1 isolates prevalent in Brazil. *AIDS Res Human Retroviruses.* 2001,17(13):1241-7.

Ferreira JLP, Thomaz M, Rodrigues R, *et al.* Molecular characterization 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):800-8.

Fitzgibbon JE, Gaur S, Gavai M, *et al.* Effect of the HIV-1 Syncytium-inducing phenotype on disease stage in vertically-infected children. *J Medical Virology.* 1998. 55: 56-63.

Fouchier RAM, Brouwer M, Broersen SM, Schuitemaker H. Simple Determination of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Syncytium-Inducing V3 Genotype by PCR. *Journal of Clinical Microbiology.* 1995; 33:906-911.

Garrido C, Roulet V, Chueca N, Poveda E, *et al.* Evaluation of Eight Different Bioinformatics Tools To Predict Viral Tropism in Different Human Immunodeficiency Virus Type 1 Subtypes. *Journal of Clinical Microbiology.* 2008; 46(3): 887–891.

Geretti AM. HIV-1 subtypes: epidemiology and significance for HIV management. *Curr Opin Infect Dis.* 2006;19:1-7.

Grivel JC, Shattock RJ, Margolis LB. Selective transmission of R5 HIV-1 variants: where is the gatekeeper? *J Transl Medicine.* 2010, 9 (1):1-6.

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

Kuhmann SE, Hartley O. Targeting Chemokines Receptors in HIV: A Status Report. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology,* 2008; 48: 425-61.

Jensen MA, van'tWout AB. Predicting HIV-1 coreceptor usage with sequence analysis. *AIDS Rev,* 2003. 5(2):104-12.

Langford SE, Ananworanich J, Cooper DA, Predictors of disease progression in HIV infection: a review. *AIDS Research and Therapy.* 2007; 4:11

Luzuriaga K, Wu H, McManus M, *et al.* Dynamic of Human Immunodeficiency Virus Type I Replication in Vertically Infected Infants. 1999; 73(1): 362-7.

Lwembe R, Lihana RW, Ochieng W, *et al* Changes in the HIV type 1 envelope gene from non-subtype B HIV type 1 –Infected children in Kenya AIDS Research and Human Retroviruses 2009; 25: 141-7.

Matida LH, Improving Survival Among Brazilian Children With Perinatally-Acquired. Brazilian J Infec Disease. AIDS, 2004. 8(6):419-23.

McBurney SP, Ross TM. Viral Sequence diversity: challenges for AIDS vaccine designs. 2008; 7(9): 1405-17.

McGovern RA, Thielen A, Mo T, *et al.* Population-based V3 genotypic tropism assay: a retrospective analysis using screening samples from the A4001029 and MOTIVATE studies. AIDS. 2010, 24(16):2517-25.

Menendez-Arias L. Molecular basic of human immunodeficiency virus drug resistance: An update. Antiviral Res. 2009, 85(1):210-31.

Ministério da Saúde - Brasil. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de DST/AIDS. Recomendações para Profilaxia da Transmissão Vertical do HIV e Terapia Antirretroviral em Gestantes. Brasília, 2006. Disponível em <www.aids.gov.br> Data de acesso: 28/11/2010.

Ministério da Saúde - Brasil. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de DST/AIDS. Guia de Tratamento Clínico da Infecção pelo HIV em Pediatria. 3ª edição. Brasília, 2009. Disponível em <www.aids.gov.br> Data de acesso: 28/11/2010.

Ministério da Saúde. <www.aids.gov.br> Data de acesso 13/01/2011.

Molina RM, Torina AG, Biffi K, *et al.* Prevalence of HIV-1 Subtypes in Brazilian Children with perinatally acquired infection. J Intern Associat Physic in AIDS Care. 2009, 8(2):106-112.

Moore JP, Kitchen SG, Pugach P, Zack JA. The CCR5 and CXCR4 Coreceptors – Central to Understanding the Transmission and Pathogenesis of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection. AIDS Research Human Retroviruses.2004; 20(1) 111-26.

Morgado MG, Guimarães ML, Castro-Galvão B. HIV-1 Polymorphism: a Challenge for Vaccine Development – A Review. 2002; 97(2): 143-150.

Moyle GJ, Wildfire A, Mandalia S. Epidemiology and Predictive Factors for Chemokine Receptor Use in HIV-1 Infection. J Infect Disease. 2005,191:866-72.

Oliveira CM, Almeida FJ, Rodrigues R, *et al.* High frequency of BF mosaic genomes among HIV-1-infected children from Sao Paulo, Brazil. *Arch Virol*, 2008; 153: 1799-83

Ortigão-de-Sampaio MB, Castello-Branco LRR. Imaturidade imunológica fetal e neonatal: implicações na evolução clínica da infecção pelo HIV-1 em crianças. 1997; 43(1):29-34.

Poveda E, Seclen E, Gonzalez MDM, *et al.* Design and validation of new genotypic tools for easy and reliable estimation of HIV tropism before using CCR5 antagonists. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2009;63: 1006–1010

Ray N. Maraviroc in the treatment of HIV infection. *Drug Design, Development and Therapy*. 2008;2:151-61.

Raymond S, Delobel P, Mavigner M, *et al.* CXCR4-using viruses in plasma and peripheral blood mononuclear cells during primary HIV-1 infection and impact on disease progression. *AIDS*. 2010;24:2305-12.

Ribeiro RM, Hazenberg MD, Perelson AS, *et al.* Naive and Memory Cell Turnover as drivers of CCR5-to-CXCR4 Tropism Switch in Human Immunodeficiency Virus Type 1: Implications for Therapy. 2006; 80(2): 802-9.

Rubini N. Alterações imunológicas em crianças com infecção pelo HIV. *J Pediatr (Rio J)* 1999;75(3):147-8

Sabino EC, Diaz R, Brigido LFM, *et al.* Distribution of HIV-1 subtypes seen in an AIDS clinic in São Paulo city, Brazil. *AIDS* 1996;10:1579-84.

Santoro-Lopes GS, Harrison LH, Tavares MD, *et al.* HIV Disease Progression and V3 Serotypes in Brazil: Is B Different from B-Br?. *AIDS Res and Hum Retrov*. 2000;16:953-958.

Shafer RW. Genotypic testing for human Immunodeficiency virus type 1 drug resistance. *Clinical Microb Review*. 2002, 15(2):247-77.

Sierra S, Kaiser R, Thielen A, Lengauer T. Genotypic Coreceptor Analysis. *Eur J Med Res*. 2007; 12: 453-462.

Sing T, Low AJ, Beerenwinkel N, *et al.* Predicting HIV coreceptor usage on the basis of genetic and clinical covariates. *Antiv Therapy*. 2007, 12:1097-1106.

Skrabal K, Low A, Dong W, *et al.* Determining Human Immunodeficiency Virus Coreceptor Use in a Clinical Setting: Degree of Correlation between Two Phenotypic Assays and a Bioinformatic Model. *J Clin Microbiology*. 2007, 45(2):279-84.

Stebbing J, Gazzard B, Douek DC. Where Does HIV Live? *N Engl J Med* 2004; 350:1872-1880

Strebel K. Virus-host interactions: role of HIV proteins Vif, Tat and Rev. *AIDS*, 2003. 17(4):25-34.

Tagliamonte M, Tornesello ML, Buonaguro FM, et al. Conformational HIV-1 envelope on particulate structures: a tool for chemokine coreceptor binding studies. *J Transl Medicine*. 2010. 9(1)1-10.

Tiemessen CT, Kuhn L. Immune Pathogenesis of Pediatric HIV-1 infection. *Current Science Inc*. 2006; 3: 13-19.

UNAIDS/WHO. Joint United Nations Program on HIV/AIDS (UNAIDS)/World Health Organization (WHO). 2009 Report on the Global AIDS Epidemic. Disponível em <http://www.unAIDS.org>. Data de acesso 11/01/2011

Vandekerckhove LPR, Wensing AMJ, Kaiser R, et al. European guidelines on clinical management of HIV-1 tropism testing. *The Lancet Infect Disease*. 2011.

World Health Organization (WHO). Laboratory Guidelines for enumerating CD4 T lymphocytes in the context of HIV/AIDS, 2007. Disponível em <http://www.who.int/en/>. Data de acesso 11/01/2011.

Zdanowicz MM. The Pharmacology of HIV Drug Resistance. *American Journal of Pharmaceutical Education*. 2006; 70(5): 1-9.

Zhang H, Hoffmann F, He J, *et al*. Characterization of HIV-1 subtype C envelope glycoproteins from perinatally infected children with different courses of disease. 2006, 3:73.

ANEXOS

ANEXO 1

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO

(EXCLUSIVO PARA MENORES DE 18 ANOS)

Projeto: “Caracterização molecular do env do HIV-1 em crianças e adolescentes de São Paulo/SP”

O Laboratório de Genotipagem do Instituto Adolfo Lutz, em colaboração com a Santa Casa de Misericórdia de São Paulo está realizando um estudo para analisar a importância do gene do envelope viral na evolução clínica e resposta ao tratamento as terapias antirretrovirais em crianças e adolescentes.

No organismo de uma pessoa que está infectada pelo HIV ocorre uma grande multiplicação viral. Ao longo dos anos desta infecção podem ocorrer mudanças, ou também conhecidas como mutações, que podem comprometer a resposta de eficácia do tratamento antirretroviral (coquetel). Essas mutações ocorrem nos genes do HIV. Genes são estruturas bem pequenas que estão no interior das células de organismos vivos. Eles carregam informações geneticamente herdadas, para criar novos organismos vivos sejam animais, plantas ou mesmo o HIV. Desta forma, o HIV torna-se diferente e pode ser transmitido com mutações já previamente instaladas ou ocorrer ao longo do tratamento quando este diminui sua eficácia.

O Teste de Genotipagem do HIV identifica alterações no gene do vírus HIV que podem estar relacionadas à resistência às medicações. Esse teste já faz parte da rotina uma vez que resultado desse teste pode auxiliar na conduta médica para a introdução de novos esquemas terapêuticos. A falta de níveis eficazes de medicamento no sangue, por falta de ingestão (adesão) ou de absorção do remédio (causas biológicas) e a modificação da resistência do vírus (causas virais), espontânea ou devido à infecção por um vírus resistente, são algumas das possíveis causas dessas falhas. Outras regiões genética do vírus ainda são menos conhecidas.

O objetivo do estudo é avaliar aspectos do vírus tanto informações provenientes do teste de Genotipagem como de outras regiões genéticas virais, como o gene do envelope. Essas informações podem subsidiar a elaboração de melhores terapias de resgate. Essas consistem em mudança do esquema de medicamentos antirretrovirais (coquetel), para que a pessoa infectada pelo HIV continue bem e distante das doenças oportunistas que o HIV desencadeia.

As crianças e adolescentes que participarem deste estudo serão acompanhados normalmente por seus médicos, não implicando em interferências na sua conduta clínica. O estudo se limita a observar, por um período de 1 a 5 anos, a evolução dos exames usuais do paciente e sua condição clínica, e a realização, em alguns casos, de exames adicionais. O término do estudo não interferirá no acompanhamento clínico, que deverá ser continuado normalmente.

A participação da criança ou adolescente no estudo implicará no seguinte:

- 1) Anotação pelo seu médico de informações clínicas 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. Entrevistas adicionais poderão ser solicitadas, mas você não é obrigado a responder parte ou todas essas, ou mesmo fazer essa entrevista adicional. Serão utilizados códigos para sua identificação, sendo permitido o acesso apenas ao respectivo médico e aos responsáveis pelo estudo.
- 2) Eventual coleta de material biológico (1 tubo de sangue), o correspondente a menos que uma colher de sopa, poderá ser solicitada para alguns pacientes. Essa coleta será eventual pois na maioria dos casos amostras coletadas para exames de rotina, como para o Teste de Genotipagem poderão ser usadas para se obter as informações genética do vírus ou de célula necessárias para melhor entender a doença causada pelo HIV. 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 testes de genotipagem, dosagem de medicamentos, CD4, Carga Viral e análise de regiões do vírus ou de genes associados à evolução da doença, em especial nos genes do envelope e polimerase e genes celulares utilizados pelo vírus para infectar as células. Embora alguns desses exames adicionais possam não ter aplicabilidade prática hoje, os resultados serão enviados ao médico da criança que informará você dos resultados, sempre que forem realizados. Será criado um banco de parte do sangue da criança, que será guardado pelo período máximo de 5 anos após o término do estudo. Não será realizado nenhum outro exame que não esteja descrito neste projeto. Caso algum exame não previsto seja realizado, você será consultado e novo Termo de Consentimento será aplicado solicitando ou não seu consentimento.
OBS: Se ocorrer a necessidade desta coleta adicional, ela será realizada no braço, como para outros exames, podendo haver os problemas inerentes dessas coletas, como leve dor no local da picada da agulha ou hematoma (mancha roxa) no local da picada. Todas as medidas serão tomadas para que não ocorram problemas. As amostras serão coletadas no Setor de coleta do seu serviço clínico e sempre que possível a coleta será realizada junto com a coleta dos exames de rotina da criança.
- 3) Os exames de rotina de CD4 e Carga Viral serão solicitados para que você colha regularmente nos retornos previstos em seu seguimento, geralmente a cada 3 - 4 meses após a introdução ou mudança da terapia.

Se durante o estudo, surgir algum teste que possa ser feito com esse material armazenado, e que seja considerado por você ou pelo médico da criança como benéfico à saúde mas que não possa ser realizado no estudo, você poderá solicitar o material biológico coletado pelo Laboratório e, de acordo com sua vontade, destiná-lo a outro uso, respeitando as normas do Comitê de Ética das Instituições envolvidas e a Legislação em vigor.

Este estudo não garante que haja benefícios diretos para a criança, mas as informações coletadas e analisadas em conjunto, poderão contribuir muito para o combate da AIDS e no uso mais adequado

dos medicamentos antirretrovirais. Caso você não queira que a criança participe deste estudo, sua recusa não ocasionará em nenhum prejuízo ao atendimento médico da criança.

Após leitura desse texto, compreendi os objetivos do estudo e autorizo a participação do menor abaixo identificado.

Nome do Responsável/Cuidador:

Assinatura do aplicador TCLE

Nome completo do paciente:

Assinatura:

São Paulo, ____/____/____

Se você tiver qualquer dúvida sobre a pesquisa e seus direitos enquanto participante, entre em contato com seu médico, ou com o Dr. Luis Brígido, fone (11) 3068-2982, ou com a Dra. Flavia J. Almeida, no Ambulatório da Pediatria da Santa Casa, fone 2176-7000 coordenadores deste estudo e responsáveis pelo cumprimento das condições aqui apresentadas.

ANEXO 2

Classificação pelo CDC das categorias clínicas e imunológicas dos pacientes

Categorias Imunológicas da classificação da infecção pelo HIV em crianças e adolescentes menores de 13 anos (Classificação CDC, 1994).

Alteração Imunológica	Contagem de CD4 (células/mm ³)		
	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

Classificação da infecção pelo HIV em crianças e adolescentes menores de 13 anos (Classificação CDC, 1994).

Alteração Imunológica – Ausente (1)	
N1	Ausência de sinais e/ou sintomas clínicos
A1	Sinais e/ou sintomas clínicos leves
B1	Sinais e/ou sintomas clínicos moderados
C1	Sinais e/ou sintomas clínicos graves
Alteração Imunológica – Moderada (2)	
N2	Ausência de sinais e/ou sintomas clínicos
A2	Sinais e/ou sintomas clínicos leves
B2	Sinais e/ou sintomas clínicos moderados
C2	Sinais e/ou sintomas clínicos graves
Alteração Imunológica – Grave (3)	
N3	Ausência de sinais e/ou sintomas clínicos
A3	Sinais e/ou sintomas clínicos leves
B3	Sinais e/ou sintomas clínicos moderados
C3	Sinais e/ou sintomas clínicos graves

ANEXO 3.

Questionário aplicado a cada consulta do paciente durante o seguimento.

Santa Casa de São Paulo - Departamento de Pediatria
Serviço de Infectologia pediátrica - Seguimento Ambulatorial

Nome: _____ Idade: _____ Data: __/__/__

SIDA N A B C 1 2 3

Data da última consulta: ____/____/____

Intercorrências desde a última consulta:

Medicação atual:

- CHECAR DOSE NA APOSTILA E ANOTAR A DOSE POR PESO OU SUPERFÍCIE CORPÓREA E HORÁRIOS
- CHECAR O USO COM OU SEM ALIMENTAÇÃO
- CHECAR SE A MEDICAÇÃO ESTÁ SENDO ARMAZENADA ADEQUADAMENTE (EX: GELADEIRA = DDI, D4T, Kaletra solução e Kaletra cp)

Abordagem da aderência:

- Nos últimos 3 dias quantas doses esqueceu de tomar?

- O acompanhante sabe as doses e horários?

- Existe dificuldade para tomar a medicação?

- Adolescente - alguém vê o paciente tomando a medicação?

- ADERÊNCIA (após discussão com preceptor):
BOA RUIM DUVIDOSA

Exames laboratoriais:

Carga viral mais recente: Data ___/___/___ Valor _____

CD4 mais recente: Data ___/___/___ Valor _____

Outros exames laboratoriais:

Vacinação (CHECAR A CARTEIRINHA):

Alimentação:

DNPM:

Revelação do diagnóstico: (para crianças maiores - sabe o diagnóstico?

Faz perguntas?)

Exame físico:

HD: ___Doença Estável ___Piora clínica ___Piora virológica ___Piora imunológica

Intercorrências atuais:

Conduta:

REFORÇO DA ADERÊNCIA (Fazer em todas as consultas)

Medicação e doses

Solicitação de exames _____

Interconsulta _____

Vacinação _____

Outros:

ANEXO 4.**Recomendações de tratamento ARV em populações pediátricas. Fonte. Ministério da Saúde, 2009**

Idade	Critérios	Recomendação
<12 meses	Independentemente de manifestações clínicas, CD4 e carga viral	Tratar
≥12 e <36 meses	Critérios clínicos: categoria CDC B* ou C Critérios laboratoriais: - CD4: <25% ou <750 céls/mm ³ - Carga viral: >100.000 cópias/mm ³	Tratar Tratar Considerar tratamento
≥36 e <60 meses	Critérios clínicos: categoria CDC B* ou C Critérios laboratoriais: - CD4: <20% ou <500 céls/mm ³ - Carga viral: >100.000 cópias/mm ³	Tratar Tratar Considerar tratamento
>5 anos	Critérios clínicos: Categoria CDC B* ou C Critérios laboratoriais: - CD4: <15% ou <350 céls/mm ³ - Carga viral: >100.000 cópias/mm ³	Tratar Tratar Considerar tratamento

ANEXO 5: PARECER COMITÊ ÉTICA – INSTITUTO ADOLFO LUTZ



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



Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos - CEPIAL
Av. Dr. Arnaldo, 355 – Sala 83 - Cerqueira César - 01246-902
Fone: 3068-2859

São Paulo, 24 de novembro de 2009.

Protocolo: 39/2009

Projeto de Pesquisa nº: **CCD-BM 20/08 – Caracterização molecular preliminar do ENV do HIV-1.**

Pesquisador Responsável: **Luís Fernando de Macedo Brígido**

Prezado Pesquisador

O Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Adolfo Lutz – CEPIAL analisou e deliberou em reunião de novembro de 2009, em concordância com a Resolução CNS 196/96 e suas resoluções complementares, o projeto acima apresentado na categoria **APROVADO**.

Cabe lembrar que em conformidade com a Resolução 196/96 são deveres do pesquisador :

- a) comunicar, imediatamente, qualquer alteração do projeto e só prosseguir com essa alteração depois da manifestação do CEPIAL;
- b) manter sob sua guarda, pelo prazo de 5 anos e em local seguro, os dados da pesquisa contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEPIAL, para o caso de eventual auditoria;
- c) comunicar formalmente ao CEPIAL quando do encerramento deste projeto;
- d) elaborar e apresentar relatórios parciais e finais;
- e) justificar perante o CEPIAL a interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

Luz Marina Trujillo
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos
Instituto Adolfo Lutz - CEPIAL

PARECER DO COMITÊ ÉTICA – SANTA CASA



IRMÃDADE DA SANTA CASA DE MISERICÓRDIA DE SÃO PAULO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS
Rua Santa Isabel, 305 - 4º andar Santa Cecília CEP: 01221-010 São Paulo – SP
PABX: 21767000 Ramal: 8061 – Telefax: 33370188 E-mail: eticamed@santacasasp.org.br

São Paulo, 19 de abril de 2010.

Projeto nº 015/10
Informe este número para
identificar seu projeto no CEP

Ilmo.(a) Sr.(a)

Dr.(a). Flávia Jacqueline Almeida

Departamento de Pediatria

O Comitê de Ética em Pesquisa da ISCMSP, em reunião ordinária, dia **11/12/2009** e no cumprimento de suas atribuições, após revisão do seu projeto de pesquisa: **"Caracterização molecular preliminar do env do HIV-1 e correlação clínica em crianças e adolescentes"**, emitiu parecer inicial em pendência e nesta data enquadrando-o na seguinte categoria:

- Aprovado (inclusive TCLE);**
- Com pendências** há modificações ou informações relevantes a serem atendidas em até 60 dias, (enviar as alterações em **duas cópias**);
- Retirado**, (por não ser reapresentado no prazo determinado);
- Não aprovado:** e
- Aprovado (inclusive TCLE - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido)**, e encaminhado para apreciação da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – MS - CONEP, a qual deverá emitir parecer no prazo de 60 dias. **Informamos, outrossim, que, segundo os termos da Resolução 196/96 do Ministério da Saúde a pesquisa só poderá ser iniciada após o recebimento do parecer de aprovação da CONEP.**

Atenciosamente

Prof. Dr. Nelson Keiske Ono

Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa - ISCMSP

Sr. Relator, rubrique as páginas no local do carimbo

SSV

