

FLÁVIA GOMES FALEIRO FERREIRA

RESISTÊNCIA GENOTÍPICA DO HIV-1 EM
CRIANÇAS VERTICALMENTE INFECTADAS
ANTES DO INÍCIO DA TERAPIA
ANTIRRETROVIRAL E APÓS A PRIMEIRA
FALHA TERAPÊUTICA

Belo Horizonte
2009

FLÁVIA GOMES FALEIRO FERREIRA

RESISTÊNCIA GENOTÍPICA DO HIV-1 EM
CRIANÇAS VERTICALMENTE INFECTADAS
ANTES DO INÍCIO DA TERAPIA
ANTIRRETROVIRAL E APÓS A PRIMEIRA
FALHA TERAPÊUTICA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Medicina.

Área de Concentração: Saúde da Criança e do Adolescente

Orientador: Prof. Jorge Andrade Pinto

Co-orientador: Prof. Unai Tupinambás

Belo Horizonte
2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Reitor: Prof. Ronaldo Tadêu Pena

Vice-Reitora: Prof^a. Heloisa Maria Murgel Starling

Pró-Reitora de Pós-Graduação: Prof^a. Elizabeth Ribeiro da Silva

Pró-Reitor de Pesquisa: Prof. Carlos Alberto Pereira Tavares

FACULDADE DE MEDICINA

Diretor da Faculdade de Medicina: Prof. Francisco José Penna

Vice-Diretor da Faculdade de Medicina: Prof. Tarcizo Afonso Nunes

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde Área de Concentração em Saúde da Criança e do Adolescente

Coordenador do Centro de Pós-Graduação: Prof. Carlos Faria dos Santos Amaral

Subcoordenador do Centro de Pós-Graduação: João Lúcio dos Santos Jr.

Chefe do Departamento de Pediatria: Prof^a. Maria Aparecida Martins

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde – Área de Concentração em Saúde da Criança e do Adolescente: Prof. Joel Alves Lamounier

Subcoordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde - Área de Concentração em Saúde da Criança e do Adolescente: Prof^a. Ana Cristina Simões e Silva

Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde – Área de Concentração em Saúde da Criança e do Adolescente:

Prof^a. Ivani Novato Silva
Prof. Jorge Andrade Pinto
Prof^a. Lúcia Maria Horta Figueiredo Goulart
Prof^a. Maria Cândida Ferrarez Bouzada Viana
Prof. Marco Antônio Duarte
Prof^a. Regina Lunardi Rocha
Gustavo Sena Sousa (Repr. Discente)

Para João,
com todo o amor.

Agradecimentos

Ao Professor Jorge Andrade Pinto, o meu reconhecimento e a minha admiração, pela contribuição à minha formação.

Ao Professor Unaí Tupinambás, pelo incentivo constante, sempre com boas e novas idéias.

À Fabiana, grande amiga, pela dedicação, boa vontade e ajuda constante em todas as fases deste trabalho.

Aos meus pais, Antônio e Cileia, pela direção e exemplo de vida.

Aos meus irmãos Paulo e Fernanda, pelo apoio infinito, pela alegria e confiança sempre presentes.

À Agdemir e Silvia Cleto, pela disponibilidade e dedicação no processamento das amostras.

Aos acadêmicos do curso de Medicina da UFMG, Carolina, Elisa e Arthur, pelo tempo e dedicação a esse trabalho.

Aos colegas Jeferson, Jerre e Manoel, pelo apoio logístico e pela disponibilidade sempre.

Marcelle, obrigada pelas ajudas estatísticas, sempre de última hora.

À Madu, Mônica, Silvia Andrade, Juliana e Silvia Inácio, pela amizade e auxílio.

Aos profissionais do laboratório DIP e do Centro de Treinamento e Referência em Doenças Infecciosas e Parasitárias Orestes-Diniz, pelo companheirismo, pela ajuda e oportunidade de aprendizado.

*O todo sem a parte não é todo.
A parte sem o todo não é parte,
Mas se a parte o faz todo sendo parte
Não se diga que é parte sendo o todo.*

Gregório de Matos (1633-1696) em
“Ao braço do mesmo Menino Jesus quando appareceo”

*Dedico este trabalho
às crianças, adolescentes,
pais e cuidadores do CTR-DIP,
com otimismo e responsabilidade,
fazem valer a VIDA.*

RESUMO

A combinação agressiva de terapia antirretroviral com pelo menos três drogas ARVs em combinação com pelo menos duas classes de drogas é recomendada com objetivo de máxima supressão viral, preservação e/ou restauração da função imunológica associada a mínima toxicidade relacionada às drogas. Este trabalho é parte de um projeto de pesquisa do Grupo de AIDS Materno Infantil da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais e foi conduzido no período de janeiro de 2006 a dezembro de 2009. Trata-se de um estudo observacional descritivo com objetivo de avaliar a prevalência da resistência antirretroviral em crianças infectadas pelo HIV-1. É apresentado no modelo de artigo para publicação, de acordo com as recomendações do Colegiado do Curso de Pós-Graduação em Saúde de Criança e do Adolescente da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais. Inicialmente descreveu-se no primeiro artigo teve como objetivo a prevalência da resistência genotípica antes do início da terapia antirretroviral (ARV) - resistência primária e a prevalência dos subtipos virais do HIV nas crianças infectadas verticalmente pelo HIV. Testes de resistência de 41 crianças foram analisados, a mediana de idade foi 6,0 anos (IQR 25%-75%: 3.9-9.2) e a mediana de idade da primeira consulta clínica no serviço foi 3,84 anos (IQR 25%-75%: 1.23-6.11). A exposição ARV materna durante o pré-natal ocorreu em apenas 3 (7,3%) mães. Segundo o critério da OMS, resistência primária estava presente em 4/41 (9,8%) das crianças. O subtipo B foi o mais prevalente (63,4%). A detecção de resistência primária em crianças dá suporte para a mais recente recomendação do Consenso Brasileiro: realizar o teste de resistência em todas as crianças

infectadas pelo HIV, antes do início da terapia ARV, independentemente da idade do diagnóstico ou da exposição aos ARVs durante o pré-natal. O segundo artigo teve como objetivo descrever a prevalência da resistência genotípica após a primeira falha terapêutica em crianças infectadas pelo HIV-1 e avaliar a resposta imunológica, virológica e clínica após a troca baseada na genotipagem. No período de janeiro de 2002 a dezembro de 2007, 50 crianças realizaram o exame de genotipagem após a primeira falha terapêutica. A mediana de idade foi de 7,6 anos (IQR 25%-75%: 6.3-10.5), a mediana de idade do início do primeiro esquema ARV foi 2.2 anos (IQR 25%-75%: 1.0-4.5). A mediana de tempo de exposição aos ARVs foi de 5.11 anos (IQR 25%-75%: 3.57-6.91). O esquema ARV em uso era 2ITRN + 1 IP (62%), 2 ITRN (18%), 2 ITRN + 1 ITRNN (18%) e 3 ITRN (2.0%). O subtipo B foi mais prevalente (76%). A prevalência de mutações foi alta: 84% dos pacientes apresentavam pelo menos uma TAM. A mediana de TAM foi 3 (IQR 25%-75%: 2-4) para todos os pacientes e não foi diferente quando comparado com o regime ARV utilizado previamente ($p=0.60$). Todos os pacientes que receberam ITRNN apresentaram pelo menos uma mutação relacionada a esta classe de ARV e a mutação K103N foi a mais prevalente (71.4%). O nelfinavir foi o IP mais utilizado (85%), D30N e L90M estavam presentes em 57.1% e 39.3%, respectivamente. Houve uma alta prevalência de mutações em vigência do primeiro esquema ARV. Estes dados mostram a necessidade de realizar o teste de resistência mais precoce, possibilitando um segundo esquema ARV mais eficaz.

Palavras-chave: Infecções por HIV. AIDS (doença) em crianças. Terapia antirretroviral de alta atividade. Testes de resistência.

ABSTRACT

The combination of aggressive antiretroviral therapy with at least three ARV drugs in combination with at least two classes of drugs is recommended for the maximum viral suppression, preservation and / or restoration of immune function associated with minimal drug-related toxicity

This work is part of a research project of the Maternal Child AIDS Group, School of Medicine, Federal University of Minas Gerais (Grupo de AIDS Materno Infantil da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais) and was conducted from January 2006 to December 2009. This is a descriptive observational study to evaluate the prevalence of antiretroviral resistance in children infected with HIV-1. It is presented in the model of article for publication in accordance with the recommendations of the Board of the Post-Graduate Health Child and Adolescent School of Medicine, Federal University of Minas Gerais (Colegiado do Curso de Pós-Graduação em Saúde de Criança e do Adolescente da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais). Initially the first article aimed at the prevalence of genotypic resistance before starting antiretroviral treatment (ARV) - primary resistance and prevalence of subtypes of HIV in children vertically infected with HIV. 41 children were analyzed for resistance testing, the median age was 6.0 years (IQR 25% -75%: 3.9-9.2) and the median age of first clinical consultation was 3.84 years (IQR 25% - 75%: 1:23 to 6:11). The maternal ARV exposure during the prenatal period occurred in only 3 (7.3%) mothers. According to the WHO criteria, the primary resistance was present in 4 / 41 (9.8%) children. Subtype B was the most prevalent (63.4%). The detection of primary resistance in children supports the

most recent recommendation of the Brazilian Guidelines: having resistance testing in all HIV-infected children before the start of ARV therapy, irrespective of age at the diagnosis or exposure to ARVs during prenatal care. The second article aimed to describe the prevalence of genotypic resistance after the first treatment failure in children infected with HIV-1 and evaluate the immunological, virological and clinical response after the exchange based on genotyping. 50 children underwent the genotyping after the first treatment failure, from January 2002 to December 2007. The children median age was 7.6 years (IQR 25% - 75%: 6.3-10.5), the median age of onset of the first ARV regimen was 2.2 years (IQR 25% -75%: 1.0-4.5). The median duration of exposure to ARVs was 11.5 years (IQR 25% -75%: 3.57-6.91). The ARV regimen in use was 2ITRN + 1 PI (62%), 2 NRTI (18%), 2 NRTIs + 1 NNRTI (18%) and 3 NRTIs (2.0%). Subtype B was the most prevalent (76%). The prevalence of mutations was high: 84% of patients had at least one TAM. The average TAM was 3 (IQR 25% -75%: 2-4) for all patients and was not different when compared with the previously used ARV regimen ($p = 0.60$). All patients had received at least one NNRTI mutation linked to this class of ARV and the K103N mutation was the most prevalent (71.4%). Nelfinavir was the most used IP (85%); D30N and L90M were present at 57.1% and 39.3%, respectively. There was a high prevalence of mutations in the first term of the ARV regimen. These data demonstrate the need to complete the early resistance test, allowing for a more effective second ARV regimen.

Keywords: HIV Infections. AIDS (disease) in children. High Activity Antirretroviral Therapy (HAART). Resistance Tests.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Árvore filogenética do vírus de Imunodeficiência Humana Adquirida (HIV) baseada na região <i>pol</i> , <i>gag</i> e <i>env</i> .	30
Figura 2 –	Estrutura do genoma do HIV-1.	32
Figura 3 –	Fluxograma das etapas de análise genotípica de resistência a antirretrovirais apartir de plasma de pacientes infectados pelo HIV.	52
Figura 4 –	Fluxograma da descrição da população estudada.	69
Figuras do artigo:	Prevalence of primary drug resistance associated mutations among HIV-1 vertically infected children in Belo Horizonte, Brazil.	
Figura 1 –	Phylogenetic tree B subtype (n=25).	88
Figura 2 –	Phylogenetic tree Non-B subtype (n=11).	89
Figuras do artigo:	Prevalence and analyses of HIV-1 resistance mutations profiles in children failing their first ARV regimen.	
Figura 1 –	Fluxogram of genotypic tests performed in HIV infected children (<18 years old) during the period January 2002 until December 2007.	95
Figura 2 –	Antiretroviral exposure before genotypic test in a pediatric cohort.	102
Figura 3 –	Evolution of antiretroviral regimen used during the period of 96 to 2005.	103
Figura 4a –	Boxplot of HIV-1 viral load (log) at different times: initiation of ARV therapy, genotypic test, 6 and 12 months after changed the ARV regimen Friedman test - $p < 0.001$.	105

Figura 4b –	Boxplot of CD4 percent levels at different times: initiation of ARV therapy, genotypic test, 6 and 12 months after changed the ARV regimen.	106
Figura 4c –	Boxplot of Z-score for weight-age at different times: genotypic test, 6 and 12 months after changed the ARV regimen Friedman test – $p < 0.001$.	106
Figura 5 –	Prevalence of resistance mutations according Subtype B or Non-B.	107
Figura 6 –	Prevalence of drug resistance after first virologic failure in children HIV-1 Infected.	108
Figura 7 –	The prevalence of resistance to antiretroviral drugs according to Stanford Algorithm.	109

LISTA DE TABELAS

- 1 – Guia do tratamento clínico de infecção pelo HIV-1 em crianças. Consenso Brasileiro. 44
- 2 – Estudos nacionais sobre resistência primária. 59
- 3 – Estudos sobre resistência em crianças. 61

Tabelas do artigo: Prevalence of primary drug resistance associated mutations among HIV-1 vertically infected children in Belo Horizonte, Brazil.

- 1 – Clinical and laboratorial characteristics of overall study population and according to genotype resistance test. 85
- 2 – Protease (PR) and reverse transcriptase (RT) mutations of HIV and ARV exposure for prevention of mother-to-child transmission (PMTCT). 86

Tabelas do artigo: Prevalence and analyses of HIV-1 resistance mutations profiles in children failing their first ARV regimen.

- 1 – Clinical, Immunological and Virological Characteristics of 50 Patients according the ARV Regimen at Genotypic Test. 104

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3TC	Lamivudina
ABC	Abacavir
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Humana
APV	Amprenavir
ARV	Antirretroviral
ATV	atazanavir
CD4	Contagem de linfócitos T CD4
CDC	Classificação CDC (<i>Center for Disease Control</i>)
CI50%/CI90%	Concentração Inibitória mínima de 50% ou 90%
CRF	Circulating Recombination Forms
CTR - DIP	Centro de Treinamento e Referência em Doenças Infecto - Parasitárias Orestes Diniz
D4T	estavudina
ddI	Didanosina
DLV	Delavudina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EFV	Efavirenz
ETC	Etricitabina
FM-UFMG	Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais
<i>HAART</i>	Terapia antirretroviral altamente ativa
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
<i>HIV RNA</i>	Carga viral
IAS	International AIDS Society
IDV	Indinavir
IF	Inibidor de fusão
IP	Inibidores de Protease
IQR	Interquartil
ITRN	Inibidores análogos da transcriptase reversa nucleosídeos/tideos
ITRNN	Inibidores não análogos da transcriptase reversa
LPV	Lopinavir
MDR	Multidrug resistance (resistência da droga a várias classes)
NFV	Nelfinavir
NIH	Institutos Nacionais dos Estados Unidos
PBH	Prefeitura de Belo Horizonte
<i>PCR</i>	Reação de Cadeia de Polimerase
PENTA	Paediatric European Network for Treatment of AIDS
PR	Protease
RENAGENO	Rede Nacional de Genotipagem
RNA	Ácido ribonucleico
RTV	Ritonavir
SQV	Saquinavir
SUS	Sistema Único de Saúde
TAM-1	Via mutacional 1 dos análogos a timidínicos: M41L, L210W, T215Y

TAM-2	Via mutacional 2 dos análogos a timidínicos: D67N, K70R, T215F, K219Y/E
TARV	Terapia antirretroviral
TDF	Tenofovir
TR	Transcriptase reversa
<i>UNAIDS</i>	Programa das Nações Unidas para o HIV/AIDS
ZTC	Zalcitabina
ZDV	Zidovudina

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	20
1	Epidemiologia da infecção pelo HIV-1	25
2	Estrutura e organização genômica do vírus de imunodeficiência humana adquirida (HIV-1)	28
3	Mecanismos de ação dos ARVs e desenvolvimento de resistência	32
3.1	Resistência aos inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeos (tídeos) ITRN	34
3.2	Resistência aos inibidores da transcriptase reversa não-análogos de nucleosídeos - ITRNN	36
3.3	Resistência aos inibidores da protease	37
3.4	Resistência aos inibidores da integrase	39
3.5	Inibidores da fusão/entrada	39
4	Tratamento antirretroviral em crianças infectadas pelo HIV-1	40
5	Testes de resistência viral	49
5.1	Teste de genotipagem	50
6	Resistência primária	55
7	Resistência em crianças infectadas pelo HIV-1	57
	OBJETIVOS	66
	METODOLOGIA	67
	RESULTADOS	69
	REFERÊNCIAS	71
	Artigo: Prevalence of Primary Drug Resistance Associated Mutations among HIV-1 Vertically Infected Children in Belo Horizonte, Brazil.	77

Artigo: Prevalence and Analyses of HIV-1 Resistance Mutations Profiles in Children Failing Their First ARV Regimen.	91
CONSIDERAÇÕES FINAIS	117
ANEXOS	119
1. Laudo de Genotipagem	
2. Questionário/instrumento de coleta para dados	
3. Modelo de Primeira Consulta de Criança no CTR-DIP	
4. Modelo de Consulta de Retorno no CTR-DIP	

INTRODUÇÃO

A doença mundialmente conhecida como Síndrome da Imunodeficiência Humana Adquirida (AIDS) foi descrita pela primeira vez em 1981 e naquela época, ninguém poderia imaginar ou antecipar o tamanho e a proporção da pandemia quase três décadas depois. O vírus da Imunodeficiência Humana Adquirida (HIV) foi reconhecido em 1983. Em 1982, foi reconhecido o primeiro caso de transmissão vertical e em 1983 houve o primeiro relato de criança infectada no Brasil.

O Programa das Nações Unidas para o HIV/AIDS (UNAIDS, 2008) estimou que, ao final de 2007, 33 milhões de pessoas estavam vivendo infectadas pelo HIV em todo mundo. Destas, 2,0 milhões são crianças menores de 15 anos. Em 2007, havia 2,7 milhões de novas pessoas infectadas pelo HIV e 2,0 milhões de pessoas morreram decorrentes da infecção pelo HIV. Em 2007, foi estimado 370.000 novas infecções em menores de 15 anos. Hoje, para cada pessoa infectada pelo HIV, que inicia o uso de antirretrovirais (ARV), outras cinco tornam-se infectadas pelo HIV-1.

Até fevereiro de 2009, um total de 25 drogas ARVs foram aprovadas para uso em adultos e adolescentes infectados pelo HIV, 17 destas foram aprovadas para o tratamento em pacientes pediátricos, 16 estão disponíveis com formulação pediátrica ou cápsulas com tamanho apropriado. Destas 25 drogas antirretrovirais aprovadas, três não são mais produzidas devido a melhorias na formulação, por exemplo, o amprenavir foi substituído pelo fosamprenavir ou devido ao uso limitado, por exemplo, delavirdina e zalcitabina.

Estas drogas estão agrupadas de acordo com o mecanismo de ação, no ciclo de replicação do HIV, a saber:

- inibidores análogos da transcriptase reversa nucleosídeos/tideos (ITRN): abacavir (ABC), didanosina (ddl), etricitabina (ETC) estavudina (d4T), lamivudina (3TC), tenofovir (TDF), zalcitabina (ddC) e zidovudina (ZDV);

- inibidores análogos da transcriptase reversa não nucleosídeos (ITRNN): 1ª geração: delavirdina (DLV), efavirenz (EFV) e nevirapina (NVP) e 2ª. Geração: Etravirina;

- inibidores da protease (IP): fosamprenavir (APV), atazanavir (ATZ), lopinavir (LPV), indinavir (IDV), nelfinavir (NFV), ritonavir (RTV) e saquinavir (SQV);

- inibidores da entrada (incluem inibidores da fusão e antagonistas CCR5): Enfurvitide, Maraviroc, Vicriviroc;

- inibidores da integrase: Raltegravir.

A combinação agressiva de terapia antirretroviral com pelo menos três drogas ARVs composta de pelo menos duas classes de drogas é recomendada para terapia inicial, com objetivo da máxima supressão viral, preferencialmente em níveis indetectáveis, por longo período, enquanto preserva e restaura a função imunológica e com o mínimo de toxicidade relacionada às drogas (WORKING, 2009). A terapia combinada diminui a progressão da doença e melhora a sobrevida, resultando em uma resposta virológica e imunológica mais potente e prolongada, retardando o aparecimento das mutações virais que conferem resistência às drogas usadas. Vários estudos clínicos mostraram melhora significativa nos marcadores de progressão da doença: diminuição da

carga viral e aumento dos linfócitos T CD4+ em crianças após o início da terapia antirretroviral altamente ativa (HAART) (SHARLAND, 2004).

A patogênese da infecção pelo HIV em crianças difere em vários aspectos importantes da infecção do adulto influenciando o manejo clínico (MILLER, *et al.*, 2002). Estas diferenças ocorrem tanto na história natural da infecção pelo HIV-1 quanto na resposta a terapia antirretroviral (TARV). Após a transmissão vertical, altas taxas de replicação viral são mantidas por um período prolongado com diminuição gradual da carga viral somente nos primeiros anos de vida. Idealmente a TARV deveria suprimir a replicação viral para níveis indetectáveis. Assim neste cenário, a TARV parece ser menos efetiva em crianças que em adultos em reduzir a carga viral abaixo dos níveis de detecção. Observa-se ainda, crianças em uso de TARV frequentemente apresentam aumento de CD4 mesmo na ausência da supressão virológica máxima (resposta discordante). A repopulação imune na presença de replicação viral pode aumentar o risco de aparecimento de variantes virais resistentes às drogas (DE ROSSI, 2004). A susceptibilidade do antirretroviral é um dos principais fatores na resposta clínica à terapia (ENGLUD, *et al.*, 2004).

A presença de variantes do HIV resistentes às drogas dificulta muito a escolha do regime de resgate dos pacientes. A genotipagem tem sido o padrão ouro para a troca da TARV em adultos infectados com falência terapêutica. O regime de resgate para adultos com exposição prévia a drogas/ARV escolhidos após o exame de genotipagem produz melhor resposta virológica comparados com os regimes escolhidos com base na história prévia de exposição aos ARVs (COHEN, *et al.*, 2002).

A utilidade do exame de genotipagem na escolha do novo regime ARV ainda não está muito bem estudado em crianças com infecção perinatal.

Resistência à droga é um fator importante na falência terapêutica, mas outros aspectos como adesão ao regime ARV, perfil farmacocinético e mecanismos celulares de resistência são também reconhecidos. Como coadjuvante da resistência, limitadas informações sobre a prevalência e problemas relacionados à resistência as drogas nessa população são descritas (ENGLUND, *et al.*, 2004).

Estabelecido em 1988, o Centro de Treinamento e Referência em Doenças Infecto-Parasitárias Orestes Diniz (CTR – DIP), órgão vinculado à Faculdade de Medicina da Universidade Federal Minas Gerais (FM/UFMG) e à Prefeitura de Belo Horizonte (PBH), é uma instituição de referência para tratamento de crianças infectadas pelo HIV na região metropolitana de Belo Horizonte e para outras cidades do estado de Minas Gerais.

O ambulatório conta com uma equipe multidisciplinar composta por médicos (clínicos, infectologistas, pediatras, ginecologistas e dermatologistas), enfermeiros, psicólogos, nutricionistas, assistentes sociais e dentistas que dão assistência aos pacientes e suas famílias. Cerca de 2500 pacientes HIV positivos são acompanhados no serviço. A Unidade Pediátrica do CTR-DIP já atendeu, desde a sua implantação em 1989, mais de 1800 crianças e adolescentes com história de exposição vertical ao HIV. No momento, 647 crianças estão em seguimento clínico ambulatorial, entre expostos verticalmente (294 pacientes) e com infecção comprovada (353 pacientes).

São admitidas em média 30 crianças por mês para acompanhamento clínico. Os pacientes encaminhados ao CTR-DIP são rotineiramente

agendados para uma primeira consulta com um dos médicos do serviço (KAKEHASI, 2001). No primeiro ano de vida, os pacientes expostos ou infectados têm avaliação clínica mensal durante os primeiros seis meses e depois, têm o retorno agendado trimestralmente. Os pacientes que têm infecção confirmada pelo HIV são avaliados imuno (através de CD4) e virologicamente (carga viral – bDNA) a intervalos aproximados de três meses. Se necessário, é feita a reavaliação antes do período programado. Outros exames são solicitados conforme o protocolo elaborado pelo grupo de AIDS pediátrica ou a indicação clínica de cada paciente.

Todos os pacientes infectados pelo HIV obtêm sem custos extras as medicações na própria farmácia do ambulatório, que é um dos pólos de distribuição da rede pública municipal.

Este trabalho é parte de um projeto de pesquisa do Grupo de AIDS Materno Infantil da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais e foi conduzido no período de janeiro de 2006 a dezembro de 2009. Trata-se de um estudo observacional descritivo com objetivo de avaliar a prevalência da resistência antirretroviral em crianças infectadas pelo HIV-1.

Este trabalho é apresentado sob a forma de artigos científicos para publicação, de acordo com as recomendações do Colegiado do Curso de Pós-graduação em Saúde da Criança e do Adolescente da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais.

A revisão bibliográfica foi realizada no período de 2005 a 2009, tendo sido utilizadas referências obtidas através do Medline e em revistas médicas clássicas.

Uma busca na literatura especializada registra várias pesquisas sobre a resistência aos ARVs, sendo a maioria em adultos. Existem poucos estudos avaliando a resistência genotípica aos ARVs na população pediátrica.

1 - Epidemiologia da infecção pelo HIV

Apesar de ser mundialmente distribuída, cerca de 90% da infecção pelo HIV acomete a população de países em desenvolvimento, em particular a África Sub-Saariana. Esta região abriga 70% dos adultos e 80% das crianças infectadas de todo mundo, e responde por cerca de 75% das 20 milhões de mortes atribuídas ao HIV desde o início da epidemia, com cenários de devastação de comunidades africanas inteiras, diminuição da expectativa média de vida e da força econômica de muitas nações. Entretanto, as taxas de prevalência variam entre os diferentes países africanos, de 2% da população adulta em países do oeste africano chegando a cerca de 20% entre os da região sul. Na África Sub-Saariana, o padrão de transmissão é predominantemente heterossexual, com alta proporção de mulheres infectadas e, conseqüentemente, grande número de menores de 15 anos infectados ou órfãos. Na América Latina cerca de 1,7 milhões estavam infectados pelo HIV no final de 2007 de acordo com dados da UNAIDS (UNAIDS, 2008).

Descrita pela primeira vez em nosso país em 1980, já foram notificados 506.499 casos ao Ministério da Saúde até junho de 2008 (BRASIL, 2009). Sabe-se, entretanto, que tal número é muito maior devido ao atraso das notificações e a necessidade de preenchimento diagnóstico de AIDS para

notificação que não descreve o número de portadores do vírus assintomáticos. Os indicadores epidemiológicos têm demonstrado aumento crescente da epidemia entre mulheres, constatada com taxa de incidência observada em 2007 de 13,9 casos por 100 mil mulheres. Cerca de 172.995 casos de mulheres infectadas pelo HIV foram notificadas no período de 1983 a junho de 2008, com conseqüente aumento da doença entre a população pediátrica uma vez que grande parte da transmissão nesta camada se dá pela via vertical: até junho de 2008, foram notificados 13.728 casos de Aids na população com menos de 13 anos de idade, 84,5% via transmissão vertical (BRASIL, 2009).

O Governo Brasileiro adotou, desde meados de 1991, política que visa garantir o acesso à TARV para pessoas portadoras do HIV. Atualmente, são atendidos mais de 200.000 pacientes. Esta política tem causado grande impacto na epidemia de HIV-AIDS, reduzindo sua morbi-mortalidade, embora aproximadamente 50% dos pacientes que iniciam TARV apresenta falha terapêutica após seis meses do início do tratamento. Esta proporção é ainda maior nos pacientes já experimentados que trocaram a terapia pelo menos uma vez. Portanto, a viabilidade deste programa está ameaçada pelo aparecimento de isolados virais resistentes selecionados durante o tratamento. O aparecimento de mutações de resistência aos ARVs é causa e efeito da supressão viral incompleta (SHAFER, 2003). Esses isolados variantes além de não responderem à TARV, podem ser transmitidas, representando um potencial problema de saúde pública.

Para atenuar o impacto da resistência viral, uma nova tecnologia foi desenvolvida.

O teste de genotipagem do HIV detecta mutações associadas com a resistência fenotípica do HIV aos antirretrovirais. Este teste é feito a partir de virions que têm seu RNA amplificado por reação de polimerase em cadeia (PCR) e seqüenciado em equipamentos automatizados com auxílio de raios laser. A seqüência de aminoácidos do virion obtida é comparada com a seqüência do vírus selvagem padrão para identificar onde ocorreram as mutações. Essas mutações são reconhecidamente associadas a resistência a determinados ARVs definido em estudos anteriores.

Vários estudos clínicos e moleculares foram desenvolvidos na Europa e nos Estados Unidos para validar a utilidade do exame de genotipagem do HIV-1. O principal objetivo destes estudos era avaliar o impacto desta nova metodologia no resgate terapêutico orientado segundo as mutações encontradas.

Dados de custos de genotipagem apresentados por Chaix e colaboradores (CHAIX et al., 2000), sugerem que os gastos no grupo de pacientes submetidos a genotipagem foram semelhantes aos do grupo sem acesso a esse exame. A queda dos custos onde foram realizados os exames de genotipagem foi devida à redução nos gastos com ARVs, principalmente os IPs. Além disso, os autores apontam para a vantagem do uso racional desta classe de drogas, diminuindo seus efeitos colaterais.

O Departamento Nacional de DST/AIDS e hepatites virais do Ministério da Saúde decidiu implantar por meio de um estudo operacional, uma rede nacional de laboratórios aptos a executar o exame de genotipagem (Rede Nacional de Genotipagem – RENAGENO).

Em 2002-2004, um estudo realizado em Belo Horizonte comprovou a eficácia do exame de genotipagem na população adulta no Centro de Referência Orestes Diniz - CTR-DIP (TUPINAMBÁS, 2006). Em vista da escassez de estudos conclusivos em populações pediátricas, o presente projeto propõe-se a avaliar a prevalência da resistência aos antirretrovirais na população pediátrica na Unidade Pediátrica do CTR-DIP.

2 - Estrutura e organização genômica do Vírus da Imunodeficiência Humana Adquirida (HIV-1)

A epidemia pelo HIV é uma das doenças emergentes mais importantes do século, muito se tem estudado sobre sua epidemiologia, estrutura do vírus, meios diagnósticos e terapia profilática e terapêutica. O HIV é da subfamília do lentivírus, e da família dos retrovírus, que durante infecção crônica no hospedeiro ocasiona progressiva disfunção do sistema imune. Existem dois principais tipos de vírus entre humanos: o HIV-1 e o HIV-2, sendo primeiro o predominante no mundo e, o segundo identificado principalmente na costa leste africana. A organização do genoma viral é complexa e está didaticamente dividida em genes estruturais (*gag*, *pol* e *env*), genes regulatórios (*tat* e *rev*), genes acessórios (*vif*, *vpv*, *vpr* e *nef*), além das terminações repetitivas longas (do inglês LTR). Os genes estruturais vão codificar as proteínas do cerne viral (*gag*), do envelope (*env*) e as enzimas responsáveis pela verificação viral – TR e PR e integrase (*pol*) (figura 2). Os regulatórios potencializam a expressão dos genes virais interagindo com o núcleo da célula infectada: facilitam o transporte

do RNA viral do núcleo para o citoplasma e aumentam o nível de transcrição dos genes do HIV. Os genes acessórios parecem atuar no poder de infectividade viral (*vif*) e podem alterar o ciclo de replicação da célula infectada (*vpr*). As LTR's desempenham importante função na integração do genoma viral e celular. O uso da maquinaria celular por estes genes produz no processo final uma partícula infecciosa denominada vírion de tamanho médio de 100 a 150nm de diâmetro, esférico. Cepas virais exibem grande diversidade genética, que influenciam na sua transmissibilidade, infectividade e imunogenicidade (HU 1996, HIRSCH, 1998). O seqüenciamento genético das principais proteínas virais, especialmente do envelope viral, tem permitido classificar os subtipos virais e correlacioná-los em árvores filogenéticas (figura 1). O HIV-1 é subdividido em grupos M de "main", principal grupo na epidemia mundial, O de "outlier" e N de "Non-M-Non-O". Linhagens distintas dentro do grupo M foram identificadas de acordo com o sequenciamento das regiões *env* e *gag* e designadas A a D, F a H, J e K (ROBERTSON, 2000). Existem algumas linhagens virais que apesar de diferentes entre si, não são geneticamente distintas o suficiente para caracterizar diferentes subtipos e, são denominados de sub-subtipos (exemplo F1 e F2). Descreve-se ainda outras formas recombinantes (do inglês CRF - circulating recombination forms).

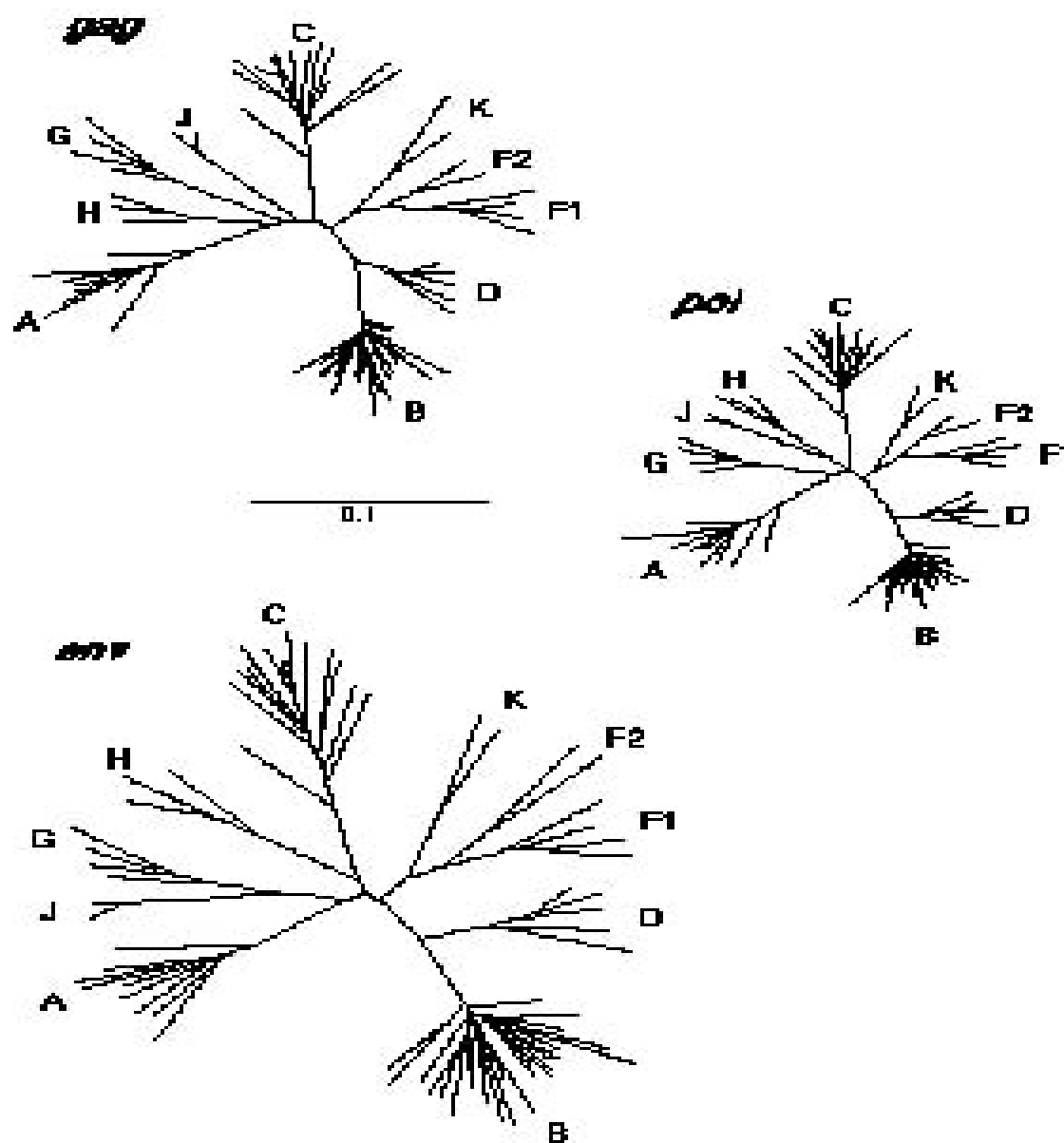


FIGURA 1 - Árvore filogenética do vírus da Imunodeficiência Humana Adquirida (HIV), baseada na região *pol*, *gag* e *env*

Fonte: <http://hiv-web./anl.gov/content/hiv-db./REVIEWS>

A infecção pelo HIV é caracterizada pela alta replicação viral. Avaliando a história natural da infecção pelo HIV (FAUCI, 1996), nota-se inicialmente alta viremia plasmática especialmente na síndrome retroviral aguda, seguido pelo decréscimo paulatino até a estabilidade na fase crônica da infecção até ao retorno a altos níveis detectáveis no desenvolvimento da doença AIDS. Estima-se que em pacientes virgens de tratamento 10^7 a 10^8 células linfóides tornam-se infectadas (HAASE, 1999); de fato, o tecido linfóide parece ser o maior reservatório do vírus no corpo humano, especialmente as células dendríticas foliculares.

Outra característica da replicação viral é a incapacidade da enzima transcriptase reversa (TR) de corrigir a seqüência de nucleotídeo durante a transcrição do RNA para cDNA (ROBERTS, 1988). O genoma viral transcrito pode conter “erros” de transcrição diversos: substituições de bases, duplicações, inserções e recombinações. Preston et al. (PRESTON, 1988) evidenciaram que a TR substitui erroneamente bases nucleotídeas numa freqüência de 1×10^{-9} durante a polimerização da fita modelo de DNA que, in vivo, poderia corresponder a 1 a 10 mutações por genoma do HIV transcrito. Este fato propicia que diferentes vírus com diferentes seqüências de nucleotídeos infectem uma mesma célula ocasionando conseqüentemente grande diversidade viral. A recombinação genética pode gerar cepas virais com maior poder adaptativo dependendo da mutação presente.

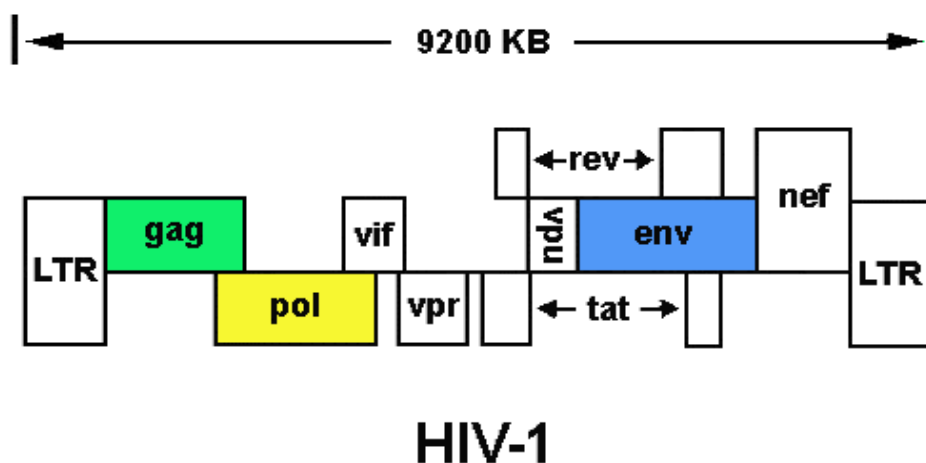


FIGURA 2 - Estrutura do genoma do HIV-1.

Fonte: Los Alamos National Laboratory

Disponível em: <<http://hiv-web.lanl.gov/content/hiv-db/MAP/hivmap.html>>

3 - Mecanismo de ação dos ARV's e desenvolvimento de resistência

A resistência genotípica a drogas antirretrovirais é definida pela presença de mutações virais que reduzem a susceptibilidade a drogas quando comparada com o vírus selvagem. (SHAFER, 2003) Sabe-se que o desenvolvimento de resistência é consequência do aparecimento de mutações em proteínas virais, especialmente das enzimas transcriptase reversa e protease, que são alvos dos antirretrovirais.

O aparecimento de isolados resistentes aos ARVs é causa e efeito da supressão viral incompleta (SHAFER, 2003). A emergência de isolados virais resistentes está diretamente relacionada às altas taxas de replicação viral. Com aproximadamente 10 bilhões de partículas virais produzidas diariamente,

associado à ausência de mecanismos de autocorreção da transcriptase reversa viral, gera-se milhares de mutações virais por dia. As mutações podem resultar em defeitos virais incompatíveis, assim como pequena ou nenhuma consequência ao ciclo de vida do vírus. A pressão seletiva dos ARVs seleciona isolados variantes que, por acúmulo de mutações, apresentam melhor capacidade replicativa naquele meio (*fitness*) e passam a predominar, determinando a falha terapêutica.

Geralmente cada droga ARV induz um grupo de mutação específica, resultando na diminuição da sensibilidade desta droga ao HIV, e também pode causar resistência cruzada a drogas da mesma classe antirretroviral. Com a expansão do número de drogas dentro da mesma classe, surge um consenso que qualquer TARV combinada pode e deve ser usada para alcançar a supressão máxima da replicação viral (SHAFER, SCHAPIRO, 2008).

A indução de resistência ocorre devido às próprias características virais: altos níveis de replicação e heterogeneidade da população num mesmo indivíduo infectado. A transcrição reversa do RNA viral para o DNA é altamente propensa a erros, habitualmente substituições, mas também duplicações, inserções, deleções e recombinações dos nucleotídeos ocorrem numa frequência alta (ROBERTS, 1998). Estima-se que um ponto de mutação simples possa ocorrer entre 10^4 a 10^5 vezes ao dia em indivíduos não tratados (COFFIN, 1995). Mutações em sequências do ácido nucléico causarão substituições de aminoácidos quando o RNA mensageiro for traduzido numa proteína. Algumas dessas alterações são consideradas “silenciosas”, pois apesar da alteração do aminoácido não há alteração na sequência nucleotídea não alterando o produto final – a transcrição protéica. Entretanto, algumas

mutações podem alterar de tal maneira o conteúdo genético que esta variação cria variantes geneticamente distintas. Assim, um indivíduo infectado tem uma população viral complexa com diversos variantes geneticamente distintos – quasiespecies – com diferentes mutações entre si. Neste cenário, vírus com variabilidade conferida pela mutação(ões) predominará sobre as outras quasiespecies. Soma-se ainda a alta taxa de replicação viral, a acumulação de variantes provirais durante o curso da infecção pelo HIV e a recombinação genética quando vírus de diferentes seqüências infectam uma mesma célula (CLAVEL, 2004). A evolução de isolados resistentes a drogas é parcialmente explicada pela geração de variantes geneticamente modificadas.

A presença de resistência é importante preditor do insucesso terapêutico – falência virológica. Entretanto, fatores como má adesão, níveis insuficientes de drogas, farmacogenômica, efeitos adversos e esquemas com potencial antiviral pouco potente devem ser considerados (FERREIRA, 2004).

A resistência viral aos ARV é medida por mudanças no alvo molecular desses ou em proteínas virais outras que indiretamente interferem com a atividade da droga (CLAVEL, 2004; SHAFER, 2003). Dependendo do mecanismo de ação de cada antirretroviral, ocorrerá mutação que tornará o vírus apto a manter sua replicação e persistir infectando o hospedeiro.

3.1- Resistência aos inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeos (tideos) - ITRN

As mutações associadas à resistência aos ITRN incluem M184V, mutações associadas aos timidínicos (TAM), mutações que causam multirresistência e, as recentemente descritas, mutações acessórias não-polimórficas.

Embora a maioria das mutações associadas à resistência aos ITRN não ocorra no centro ativo da enzima, elas alteram a sua conformação espacial, dificultando a ação dos medicamentos. Existem dois mecanismos de resistência: diminuição da afinidade da enzima pelos análogos nucleotídeos e/ou através do aumento da pirofosforólise da enzima (removendo o substrato que já tinha sido incorporado na cadeia pró-viral) (ARION, 2000, SHAFER, SHAPIRO, 2008).

- Mutações M184V. É a mutação mais frequente, causa alta resistência ao 3TC e pouca resistência ao ddI e ABC e aumenta a susceptibilidade ao AZT, d4T e TDF. A significância clínica da mutação M184V é influenciada pela presença ou ausência de outras mutações relacionadas aos ITRNs.

- TAMs. As mutações associadas aos timidínicos são selecionadas pelos timidínicos AZT e d4T. As TAMs causam diminuição da susceptibilidade a estes ITRNs e também ao ABC, ddI e TDF. As TAMs são comuns em pacientes que iniciaram o tratamento antirretroviral antes da era HAART e mantiveram supressão viral incompleta em regimes contendo os timidínicos d4T e AZT. As TAMs acumulam dois caminhos mutacionais, também conhecida por TAM 1 e TAM 2. O caminho mutacional 1, TAM 1, inclui as mutações M41L, L210W e T215Y e causa resistência aos timidínicos e resistência cruzada aos ABC, ddI, e TDF. O caminho mutacional 2, TAM 2, inclui as mutações D67N, K70R, T215F e K219Q/E e o significado clínico ainda em estudo.

- Mutações que causam multirresistência: (1) inserção no códon 69, geralmente ocorre na presença de várias TAMs e está associada à resistência intermediária aos 3TC e FTC e resistência total a todos os outros ITRN; (2) complexo Q151M: geralmente acompanhada por duas ou mais das mutações

A62V, V75I, F77L, e F116Y, causa resistência total ao AZT, d4T, DDI, e ABC e resistência intermediária ao TDF, 3TC e FTC. Ainda não foi definido qual o melhor esquema terapêutico para ser usado em pacientes que apresentam Ins69 ou o complexo Q151M.

3.2- Resistência aos inibidores da transcriptase reversa não-análogos de nucleosídeos – ITRNN

Em tratamentos que contêm os ITRNN (efavirenz, nevirapina, delavirdina), a resistência aparece rapidamente se a replicação viral não for rapidamente suprimida. Isto acontece, pois a droga possui uma baixa barreira genética, isto é, apenas uma mutação é capaz de induzir alto grau de resistência às drogas desta classe (HIRSH, 2003).

As mutações associadas à resistência aos ITRNN podem ser classificadas em quatro categorias:

(1) mutações primárias – K103N/S, V106A/M, Y181C/I/V, Y188L/C/H e G190A/S/E: mutações que causam alta resistência a uma ou mais drogas ITRNN e são as primeiras a se desenvolverem durante o tratamento;

(2) mutações secundárias – L100I, K101P, P225H, F227L, M230L e K238T: mutações que geralmente ocorrem em combinação com uma resistência primária, mas tem um papel importante na resistência cruzada e na escolha de um novo ITRNN de 2ª. geração, por exemplo a Etravirina;

(3) mutações menores não-polimórficas – A98G, K1091E, V108I e V179D/E: podem ocorrer sozinhas ou em combinações com outras mutações e causam uma pequena redução na susceptibilidade dos ITRNN;

(4) mutações acessórias polimórficas – K101Q, I135T/M, V179I e L283I: modulam os efeitos das outras mutações relacionadas aos ITRNN, aumentando a resistência aos ITRNN.

Um fenômeno aparentemente paradoxal que pode acontecer com os ITRNN é o aumento da susceptibilidade viral a estes medicamentos, que é definido como IC_{50} menor que 2,5 vezes o valor para vírus selvagens de referência. É descrita quando ocorrem múltiplas mutações relacionadas aos ITRN na ausência de mutações específicas para os ITRNN, geralmente em pacientes sem experiência prévia com drogas desta última classe (HAUBRICH, 2002). Está relacionada com presença de hipersusceptibilidade, uso prolongado de ITRN, a ocorrência de mutações associadas ao AZT e ao abacavir que são: M184V, M41L, L210W e 215Y (SHULMAN, 2001). Este fenômeno parece ter significado biológico e sua presença aumenta a probabilidade de boa resposta virológica em regimes de resgate contendo efavirenz (HAUBRICH, 2005).

3.3- Resistência aos inibidores da protease:

As mutações no gene da protease inibem a ação das drogas impedindo sua ligação no sítio ativo da enzima. Estas alterações são detectadas através do sequenciamento do gene da protease em comparação com a protease do vírus de referência. A resistência a esta classe de drogas acontece após o acúmulo de várias mutações.

Geralmente a mutação principal (mutação primária) reduz a capacidade replicativa viral, sendo necessárias outras mutações compensatórias (mutações secundárias) que restauram a capacidade de adaptação viral (NIJHUIS,1998). Portanto, as mutações que se localizam próximas ao sítio

ativo da enzima interferindo com a ligação do inibidor com a enzima conferem alto grau de resistência (mutação primária) e, aquelas fora do sítio ativo, são as mutações secundárias (CHEN, *et al.*, 1995).

Um terceiro mecanismo de resistência envolve mutação no local de clivagem da protease, isto é, fora do sítio de ação. As mutações de protease dificultam a eficácia da clivagem das poliproteínas e as mutações no sítio de clivagem atenuam estas mutações, facilitando a ligação dos substratos com a protease. Os inibidores da protease são as únicas drogas onde mutações relacionadas com resistência são também encontradas fora do sítio de ação das drogas (ZHANG, 1997).

Algumas mutações estão associadas com o aumento da susceptibilidade para uma ou mais inibidor da protease, incluindo: I50L, que diminui a susceptibilidade a todos os IPs com exceção do atazanavir; I50V e I54L aumentam a susceptibilidade ao tipranavir, N88S aumenta a susceptibilidade para o fosamprenavir e L76V aumenta a susceptibilidade ao atazanavir, saquinavir e tipranavir.

Apesar da probabilidade de resistência cruzada entre os diversos IP, o tratamento seqüencial pode ser possível em determinadas situações. Certas drogas possuem caminho mutacional distinto das demais, particularmente o nelfinavir e possivelmente o atazanavir (KEMPER, 2001). Todas as drogas mantêm sua atividade contra isolados virais com a mutação da D30N selecionada pelo nelfinavir, que é a mutação mais frequente após falha com este inibidor.

A presença de duas ou mais mutações principais, que são: D30N, V32I, L33F/I, M46I/L, I47V/A, G48V, I50V/L, I54MI, Q58E, T74P, V82A/F/T/S, I84V,

N88S e L90M, geralmente confere algum grau de resistência cruzada a todas as drogas desta classe (LORENZI,1999; JOHNSON, *et al*; 2008). A estratégia hoje utilizada para postergar o aparecimento de isolados multirresistentes é a associação do ritonavir em doses baixas com outros IP. Isto resulta em concentrações plasmáticas suficientemente altas, capazes de suprimir isolados que contêm número limitado de mutações. Assim, a resistência viral não depende apenas da potencia intrínseca da droga, mas também dos níveis plasmáticos (SHAFER, SHAPIRO, 2008).

3. 4- Resistência aos inibidores da integrase

A única droga aprovada até o momento é o raltegravir que inibe a transferência ligando o alvo do sítio do DNA na enzima. Dados de susceptibilidade da droga *in vitro* e dados de pacientes que iniciaram o uso desta droga mostraram que não há resistência cruzada entre os inibidores de integrase e de outros inibidores do HIV-1.

As mutações relacionadas aos inibidores da integrase são N155H e Q148H/R/K e cada uma diminui a susceptibilidade do raltegravir. Resistência total ocorre com o acúmulo de mutações adicionais, E92Q e duas mutações polimórficas L74M e G163R.

3.5- Resistência aos Inibidores da fusão/entrada

Os inibidores de entrada são moléculas que se ligam na superfície celular ou na superfície viral, impedindo o acoplamento e penetração do HIV à célula hospedeira. A enfuvirtida se liga ao complexo HR-1 da glicoproteína 41.

Mutações na região HR-1 (entre os códons 36 e 45 do gene *env*) impedem a ligação da enfuvirtida em seu sítio de ação, tornando o vírus resistente.

Os inibidores do CCR5 atuam no co-receptor celular CCR5, impedindo sua ligação na glicoproteína 120 viral, mas ocorre apenas no HIV que tem tropismo com esse receptor, denominado de vírus R5. Várias substituições na região do gene *env* que codifica a porção V3 da *gp120* estão associadas aos fármacos desta classe, maraviroc e vicriviroc.

4 - Tratamento antirretroviral em crianças infectadas pelo HIV-1

Desde o início do tratamento das crianças infectadas pelo HIV, houve inúmeros avanços no manejo clínico que resultaram na terapia combinada de ARVs. A mortalidade do HIV diminuiu mais de 80% desde o início do tratamento com inibidores de protease, e as infecções oportunistas e outras infecções relacionadas ao HIV diminuíram drasticamente depois da era HAART. Avanços nos estudos clínicos e no acompanhamento laboratorial, incluindo o teste de resistência e a perspectiva de medir níveis séricos da droga, deixaram os pediatras mais cuidadosos na escolha do primeiro esquema ARV mais eficaz e potente com a possibilidade de reservar drogas e classes de drogas para um segundo ou terceiro regime ARV. A estratégia terapêutica atual é início precoce do tratamento ARV capaz de suprimir a replicação viral para prevenir a progressão da doença, preservar a função imunológica e reduzir o desenvolvimento da resistência. Ao mesmo tempo, a disponibilidade de novas drogas e formulações, com esquemas posológicos

mais fácies, melhora a adesão. Crianças vivendo com a infecção pelo HIV estão crescendo, trazendo novos desafios à adesão, à resistência aos ARVs e ao manejo de múltiplas drogas. (WORKING, 2009)

Embora a patogênese da infecção pelo HIV e os princípios da virologia e da imunologia sobre o uso de ARVs sejam similares para todos os pacientes infectados pelo HIV, existem algumas considerações para as crianças e adolescentes infectados pelo HIV, por exemplo, a aquisição da infecção durante o período perinatal ou no período neonatal; diferenças na dinâmica da contagem de linfócitos CD4+ dependendo da idade, mudanças nos parâmetros farmacocinéticos com a idade devido à constante maturação de órgãos e sistemas envolvidos no metabolismo das drogas, diferenças nas manifestações clínicas e virológicas da infecção perinatal, comprometendo o desenvolvimento neurológico e imunológico destes pacientes.

Em países em desenvolvimento, devido à menor disponibilidade de programas de prevenção da transmissão materno-infantil, mais de 1500 novas infecções ocorrem todos os dias em crianças menores de 15 anos, pela transmissão vertical. Apenas 15% de todos os pacientes infectados pelo HIV são crianças, mas a grande maioria não tem acesso à HAART, a qual reduz drasticamente a morbi-mortalidade. (GIAQUINTO, MORELLI *et al.*; 2008)

De acordo com consensos internacionais desenvolvidos pela Organização Mundial de Saúde (ANTIRETROVIRAL, 2006), pela Rede Européia de Tratamento em AIDS Pediátrica (PENTA- *The Paediatric European Network for Treatment of AIDS*)(SHARLAND, 2004), pelos Institutos Nacionais de Saúde (NIH – *National Institutes of Health*) (WORKING, 2009) dos Estados Unidos, pelo Consenso Brasileiro o tratamento de escolha para crianças

infectadas pelo HIV recomenda-se a combinação de duas drogas da classe dos ITRN e mais uma terceira droga potente de outra classe, que pode ser tanto ITRNN ou quanto IP associado com o ritonavir em dose baixa. Existem vários desafios no tratamento da criança infectada pelo HIV, incluindo a incerteza de qual é o melhor momento de iniciar o tratamento, a necessidade de mais formulações pediátricas e falta de estudos farmacocinéticos para as novas drogas. O esquema ARV deve ser individualizado para cada paciente, pois depende de vários fatores, por exemplo, idade da criança, disponibilidade de formulações pediátricas, potência, complexidade e toxicidade de cada regime, farmacogenômica, a condição sócio-cultural e econômica, a capacidade dos pais/responsáveis e da criança a manterem uma boa adesão durante todo o tratamento e o passado de exposição aos ARVs.

O Brasil destaca-se pela política do Ministério da Saúde para assistência aos pacientes, adultos e crianças, infectados pelo HIV. Em 1991, o Sistema Único de Saúde (SUS) iniciou a distribuição das drogas ARVs aos pacientes que preenchem o critério de indicação de tratamento. Hoje, cerca de 200.000 pacientes estão em tratamento ARV no Brasil.

Mesmo com grandes avanços na TARV nos últimos anos, algumas questões ainda não estão totalmente esclarecidas, principalmente em crianças. Dentre as principais, destacam-se o questionamento do melhor momento para se iniciar o tratamento dependendo da idade da criança, qual a melhor combinação de medicamentos, qual o melhor momento de trocar o esquema em uso, levando em consideração as opções terapêuticas para cada faixa etária. O Ministério da Saúde, ao longo dos últimos anos, disponibilizou diretrizes para o melhor acompanhamento das crianças infectadas. (BRASIL,

2009) A tabela abaixo mostra a evolução/mudanças nestas diretrizes de acordo com os avanços no manejo e seguimento das crianças infectadas. Tabela 1.

A avaliação da resposta à TARV baseia-se em parâmetros laboratoriais e clínicos. A falha a um esquema ARV é definida, como uma resposta subótima ou falta de uma resposta sustentada à terapia usando critérios clínicos, virológicos e imunológicos, que foram atualizados ao longo dos anos como mostra a tabela abaixo, comprovando o grande desafio que é o tratamento de crianças infectadas pelo HIV-1.

**TABELA 1 - GUIA DE TRATAMENTO CLÍNICO DA INFECÇÃO PELO HIV-1
EM CRIANÇAS
Consenso Brasileiro**

	FEVEREIRO 2001	2004	2006
Quando iniciar tratamento anti-retroviral?	- baseiam-se na classificação da infecção pelo HIV em criança, conforme critério CDC: N1 e A1: acompanhamento clínico e laboratorial regulares, sem tratamento; N2 e B1: pode-se considerar tratamento e a introdução da terapia dependerá da evolução clínica e laboratorial; A2-3, B2-3, C1-3, N3: iniciar tratamento.	- baseiam-se na classificação da infecção pelo HIV em criança, conforme critério CDC: N1 e A1: acompanhamento clínico e laboratorial regulares, sem tratamento; N2 e B1: pode-se considerar tratamento e a introdução da terapia dependerá da evolução clínica e laboratorial; A2-3, B2-3, C1-3, N3: iniciar tratamento.	<p>≤ 11 meses de idade: Critérios clínicos: categoria B* ou categoria C; Critérios laboratoriais: CD4: <25% ou < 1.500cél/mm³ CV >1.000.000 – considerar tto.</p> <p>12 a 35 meses de idade: Critérios clínicos: categoria B* ou categoria C; Critérios laboratoriais: CD4: <20% ou < 750cél/mm³ CV >250.000 – considerar tto.</p> <p>36 a 59 meses de idade: Critérios clínicos: categoria C; Critérios laboratoriais: CD4: <15% ou < 350cél/mm³ CV >1.000.000 – considerar tto.</p> <p>≥ 5 anos de idade: Critérios clínicos: categoria C; Critérios laboratoriais: CD4: <15% ou < 200cél/mm³ CV >250.000 – considerar tto.</p>
Crianças menores de 12 meses	Indicação do início da terapia deve seguir os mesmos critérios das outras faixas etárias	Indicação do início da terapia deve seguir os mesmos critérios das outras faixas etárias	

Parâmetro imunológico	- variações na contagem percentual de linfócitos T CD4+ são parâmetros mais estáveis; - deterioração imunológica relacionada à progressão da doença.	- variações na contagem percentual de linfócitos T CD4+ são parâmetros mais estáveis; - deterioração imunológica relacionada à progressão da doença.	- variações na contagem percentual de linfócitos T CD4+ são parâmetros mais estáveis; - deterioração imunológica relacionada à progressão da doença.
Parâmetro virológico	- definição do prognóstico não deve ser pautada somente na carga viral; mas na contagem de CD4 e na evolução clínica – especialmente em < 30 meses; - em maiores de 30 meses, CV > 100.000 cópias/mL e CD4<15% = preditor de progressão ou morte	- definição do prognóstico não deve ser pautada somente na carga viral; mas na contagem de CD4 e na evolução clínica – especialmente em < 30 meses; - em maiores de 30 meses, CV > 100.000 cópias/mL e CD4<15% = preditor de progressão ou morte	
Esquemas terapêuticos recomendados	- Categorias N2, A2, B1 e B2a: terapia dupla: AZT+DDI; - Categorias N3, A3, B2a, B3 e C1-3: terapia tripla: 2ITRN+1IP: NFVouRTV 2ITRN+1ITRNN: NVP ou EFV;	- Categorias N2, A2, B1 e B2a: terapia dupla: AZT+DDI; - Categorias N3, A3, B2a, B3 e C1-3: terapia tripla: 2ITRN+1IP: NFVouRTV 2ITRN+1ITRNN: NVP ou EFV;	Terapia tripla Esquema preferencial: 2ITRN + 1ITRNN (AZT+3TC, D4T+3TD, ABC+3TC + NVP se < 3 anos EFV se > 3 anos).

<p>Mudança na terapia anti-retroviral</p>	<p>Clínico: Deterioração neurológica; Falha no crescimento e/ou desenvolvimento neuropsicomotor; Mudança na categoria clínica.</p> <p>Imunológico: Mudança na categoria imunológica; Se CD4<15%: decréscimo persistente de 5 ou mais percentuais; Redução de >20% na contagem absoluta ou percentual de CD4 em duas mensurações;</p> <p>Viroológico: A variabilidade de acordo com a idade deve ser considerada; - < 2 anos de idade: alterações maiores de 5 vezes (0,7log); - > 2 anos de idade: alterações maiores de 3 vezes (0,5log).</p>	<p>Clínico: Deterioração neurológica; Falha no crescimento e/ou desenvolvimento neuropsicomotor; Mudança na categoria clínica.</p> <p>Imunológico: Mudança na categoria imunológica; Se CD4<15%: decréscimo persistente de 5 ou mais percentuais; Redução de >20% na contagem absoluta ou percentual de CD4 em duas mensurações;</p> <p>Viroológico: A variabilidade de acordo com a idade deve ser considerada; - < 2 anos de idade: alterações maiores de 5 vezes (0,7log); - > 2 anos de idade: alterações maiores de 3 vezes (0,5log).</p>	<p>Clínico: Deterioração neurológica; Falha no crescimento e/ou desenvolvimento neuropsicomotor; Mudança na categoria clínica.</p> <p>Imunológico: Mudança na categoria imunológica; Se CD4<15%: decréscimo persistente de 5 ou mais percentuais; Redução de >20% na contagem absoluta ou percentual de CD4 em duas mensurações;</p> <p>Viroológico: A variabilidade de acordo com a idade deve ser considerada; - < 2 anos de idade: alterações maiores de 5 vezes (0,7log); - > 2 anos de idade: alterações maiores de 3 vezes (0,5log).</p>
--	---	---	---

<p>Resposta virológica inferior à minimamente aceitável</p>	<p>- terapia tripla: redução de < 1,0 log em relação ao basal; - terapia dupla: redução de <0,7 log em relação ao basal. - aumento persistente de carga viral depois do início do tratamento: - <2 anos: >0,7log; - >2 anos: >0.5log</p>	<p>- terapia tripla: redução de < 1,0 log em relação ao basal; - terapia dupla: redução de <0,7 log em relação ao basal. - aumento persistente de carga viral depois do início do tratamento: - <2 anos: >0,7log; - >2 anos: >0.5log</p>	<p>- terapia tripla: redução de < 1,0 log em relação ao basal; - terapia dupla: redução de <0,7 log em relação ao basal. - aumento persistente de carga viral depois do início do tratamento: - <2 anos: >0,7log; - >2 anos: >0.5log - retorno persistente da carga viral à detecção depois de um período de indetecção.</p>
<p>Reconstituição Imunológica</p>	<p>-</p>	<p>- Após início TARV, controle da replicação viral e aumento progressivo de linfócitos T CD4: infecções oportunistas e distúrbios imunológicos aparecem, duração média de 4 a 12 semanas.</p>	<p>- Após início TARV, controle da replicação viral e aumento progressivo de linfócitos T CD4: infecções oportunistas e distúrbios imunológicos aparecem, duração média de 4 a 12 semanas.</p>
<p>Teste de genotipagem</p>	<p>-</p>	<p>- falha virológica, imunológica ou clínica em esquema duplo; - 1ª falha virológica em esquema triplo com ITRNN; - 1ª falha virológica em esquema triplo com IP; - 2ª falha virológica em esquema triplo com IP.</p>	<p>- antes do início de tto em crianças < 12 meses, nascidas de mães expostas à TARV durante a gestação ou ao parto, e que não tenham indicação imediata de TARV; - pacientes com falha virológica, imunológica ou clínica.</p>

<p>Conceito de sucesso terapêutico</p>		<p>- CV indetectável nem sempre é alcançada. Diminuição persistente de 1,5 a 2 log associada à boa evolução clínica e estabilidade da resposta imunológica.</p>	<p>- diminuição persistente de 1,5 a 2 log associada à boa evolução clínica e estabilidade da resposta imunológica; - redução da CV a 1log após 8 a 12 semanas de tto; - elevação de 5 pontos percentuais na contagem de linfócitos T CD4 para ptes na categoria C; - elevação ou manutenção na mesma contagem para os de categoria 1 ou 2.</p>
---	--	---	---

FONTE: <http://www.aids.gov.br>

5 - Testes de resistência viral

O teste de resistência viral oferece a oportunidade de individualizar a terapia, identificando e evitando o uso de drogas que tenham sua atividade diminuída devido à resistência viral. Atualmente, existem dois tipos de análise da resistência viral: os testes de fenotipagem e os de genotipagem.

Os testes de fenotipagem são mais facilmente compreendidos, pois são parecidos com outros testes clássicos de resistência realizado em outros patógenos, como a bactéria. Os testes de fenotipagem avaliam a habilidade de drogas específicas ou de associações de drogas em inibir a replicação viral dentro cultura de células previamente estabelecidas. Isolados virais da amostra do paciente tem a região *pol* amplificada por reação em cadeia de polimerase (polimerase chain reaction - PCR) que é incorporada a outro inóculo viral produzido no laboratório (sem esta região). Este vírus recombinante é cultivado em diferentes concentrações das drogas sob teste (FRENKEL, 2004). Habitualmente, cultura viral com um inóculo fixo de HIV1 é apresentado à concentração das drogas antirretrovirais diluídas em série. A concentração da droga capaz de inibir a replicação viral em 50% (Concentração Inibitória de 50% - CI50%) ou em 90% (CI90%) são as medições de avaliação da susceptibilidade viral. Estes testes não determinam, entretanto, a quantidade exata da droga necessária para inibir a replicação viral *in vivo*. Apesar disso, a fenotipagem é muito importante para avaliar a interação entre várias mutações associadas com a resistência a uma droga ou uma classe da droga.

Os testes de resistência baseados na análise genotípica estão mais disponíveis, e podem ser realizados num menor período de tempo e com

menor custo em relação à fenotipagem. Ensaios de resistência genotípica amplificam sequências de ácidos nucleicos dos códons do HIV responsáveis pela produção de enzimas alvos de TARV: protease e transcriptase reversa. Subseqüentemente, compara-se a seqüência de aminoácido encontrada naquela região do ácido nucleico amplificada com uma referência de consenso obtendo-se assim uma lista de mutações. As mutações observadas são analisadas dentro do contexto biológico e clínico e a associação à resistência aos antirretrovirais é estabelecida. O grande desafio é a interpretação dos resultados, mostrando uma complexa rede de mutações, com potencial de interações entre as mesmas.

Existem duas maneiras de analisar as mudanças genotípicas na protease (PR) e na transcriptase (TR). A abordagem mais comum é o uso de regras baseadas em algoritmos (estabelecem a associação de determinadas mutações com a resistência a determinada droga), mas há diferenças entre eles nas regras utilizadas para avaliação de susceptibilidade de cada droga. A segunda maneira é relacionar os dados da genotipagem e da fenotipagem – fenotipagem virtual. A fenotipagem virtual é feita pela comparação da genotipagem da amostra sob teste com banco de dados que inclui centenas a milhares de diferentes perfis de resistência derivados de amostras que foram submetidas a ambas genotipagem e fenotipagem de forma pareada.

5.1 - Teste de Genotipagem

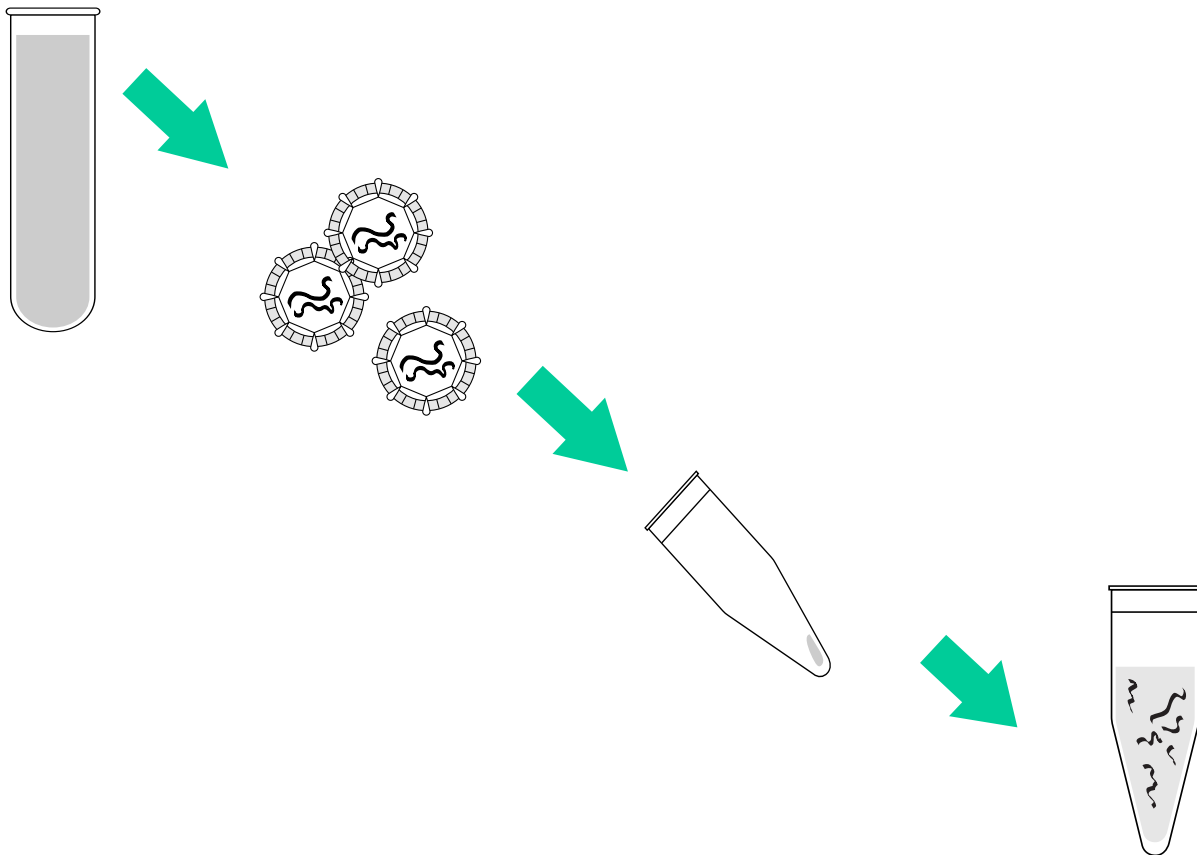
O teste de genotipagem do HIV-1 pode ser realizado utilizando o sistema ViroSeq™ Genotyping System versão 2.0 (Applied Biosystems) que inclui os módulos de extração de RNA viral plasmático, reação de transcrição reversa,

amplificação por PRC do gene pol (protease e transcriptase reversa) e reação de sequenciamento automático do produto amplificado. FIGURA 3. Todas as etapas são realizadas conforme protocolo do fabricante. O módulo de sequenciamento utiliza Dye Terminator Chemistry, ou seja, marcação fluorescente na extremidade 3' do nucleotídeo de terminação com fluorocromos específicos para cada base. Portanto, uma amostra de DNA é sequenciada em uma única reação. O analisador genético ABI PRISM® 3100, faz a resolução eletroforética das amostras e gera cromatograma para cada seqüência.

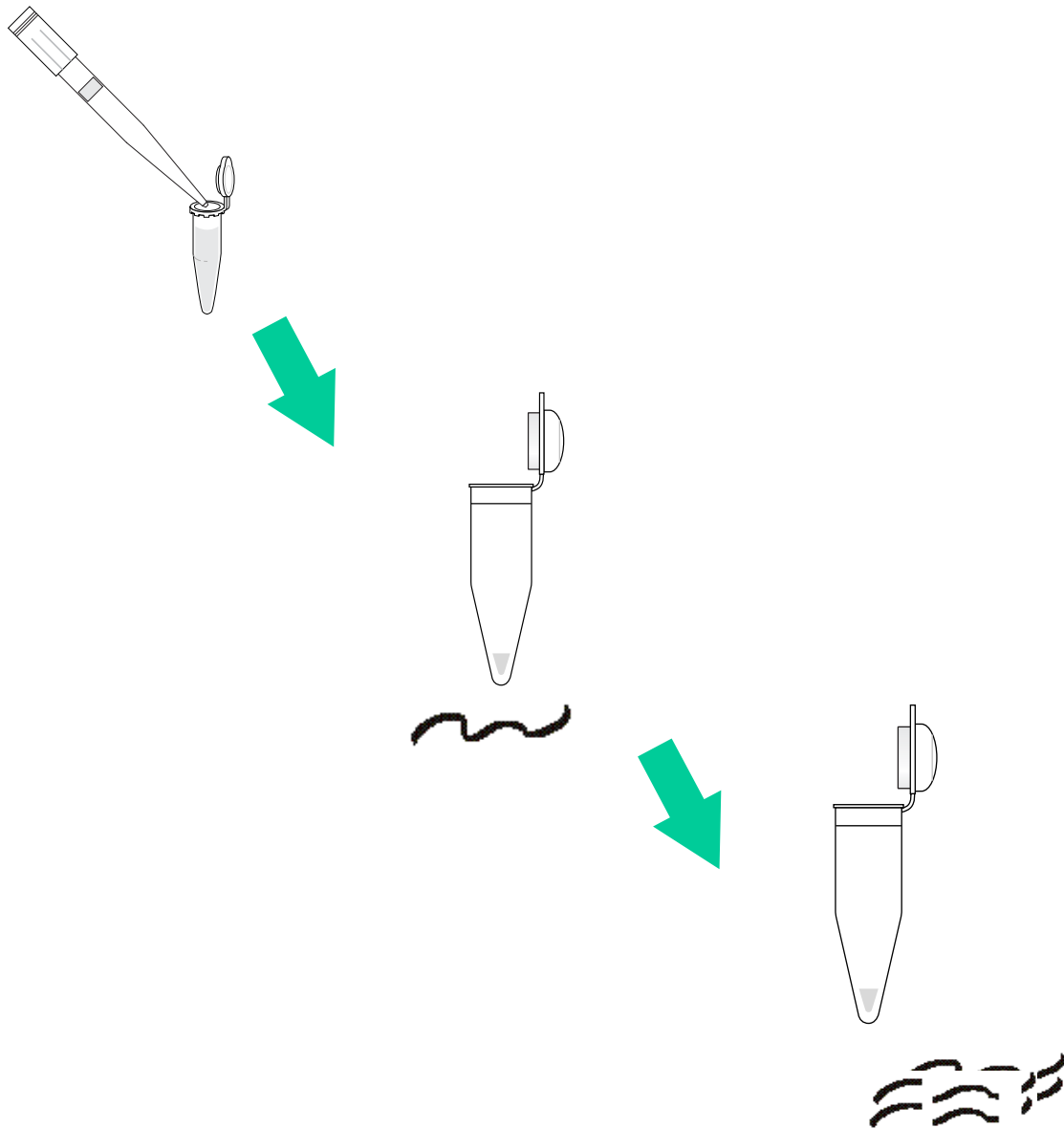
O programa de computador gera não somente a montagem da seqüência viral, mas faz também uma análise completa de polimorfismos genéticos encontrados, baseado na comparação com a seqüência depositada prototípica de um isolado de HIV-1 do tipo B conhecidamente sensível aos anti-retrovirais (isolado HXB2). As seqüências dos genes da RT e protease são traduzidas, alinhadas com a cepa MN e têm as mutações relacionadas à resistência aos ITRN, ITRNN e IP identificadas. A interpretação das mutações é realizada utilizando dados do fabricante, as análises da Sociedade Internacional de AIDS (IAS)(JONHSON, *et al.*; 2008), algoritmo da Stanford e o algoritmo da RENAGENO.

FIGURA 3 – Fluxograma das etapas da análise genotípica de resistência a antirretrovirais a partir de plasma de pacientes infectados pelo HIV.

Etapa 1 - Resuspender em RNA Diluente → Lise de partículas virais → Precipitação do RNA viral (utilização da técnica NASBA)



Etapa 2 - Tradução do RNA para DNA viral com a utilização da enzima transcriptase reversa → Amplificação por PCR (região pol)



Etapa 3 - Perfil de Mutações

Amplificação da região da transcriptase reversa e da protease



Sequenciamento nucleotídeo



Comparação com amostra de HIV de referência, com perfil de susceptibilidade conhecido = Perfil de mutação da amostra em análise



Análise mutações baseada em consensos estabelecidos por virologistas em banco de seqüências internacionais.

6 - Resistência Primária

A resistência viral dos ARVs pode ser primária ou secundária. A resistência secundária é aquela que emerge em decorrência da pressão de seleção exercida pela medicação antirretroviral. A resistência primária está presente mesmo antes do uso da medicação pelo indivíduo infectado. Isto pode ocorrer pela transmissão de isolados resistentes ou mesmo pela geração e fixação de mutantes resistentes em um indivíduo infectado decorrente do alto índice replicativo do HIV-1 (SHAFER, *et al.*; 2007). A presença de resistência primária está provavelmente mais relacionada à transmissão de isolados de HIV-1 resistentes aos antirretrovirais do que à geração espontânea.

Estudos indicam que as mutações associadas a resistência primária persistem por longos períodos de tempo mesmo na ausência de tratamento (LITTLE, *et al.*; 2002). A explicação para isso reside no fato de que, no momento em que uma pessoa se infecta, esse processo é causado por uma população viral muito homogênea, e não por uma mistura de isolados virais, em um fenômeno conhecido como transmissão seletiva. Desta forma, não haveria uma população de vírus selvagens preexistentes que pudessem emergir na ausência de ARVs. Mesmo com o aparecimento diário e ao acaso de isolados no paciente com resistência primária, estes isolados não se fixariam pela grande diversidade de variedades mutantes produzidas diariamente neste indivíduo (DIAZ, 2005).

Apesar da resistência primária e secundária terem um efeito importante de saúde pública, a resistência primária tem o efeito de diminuir a efetividade do primeiro esquema antirretroviral na população geral. Indivíduos com

resistência primária iniciam a terapia ARV com uma baixa barreira genética à resistência, um alto risco de falência virológica e podem desenvolver resistência aos outros ARVs do regime que poderiam estar totalmente ativos.

Na Europa, Estados Unidos e Brasil, estudos de prevalência realizados em centros especializados mostraram prevalências de resistência as drogas variando de 5 a 15% em pessoas recentemente diagnosticadas e 10-25% em pessoas com infecção aguda. Entretanto, tem sido difícil comparar os estudos devido às diferenças metodológicas do desenho e as estimativas baseadas em diferentes listas de mutações de resistência. Foi, portanto, desenvolvida uma lista padrão de mutações para caracterizar a epidemiologia da transmissão da resistência. Estas mutações devem ser reconhecidas como causa ou contribuição de resistência, não polimórficas em pessoas virgens de tratamento e devem ser aplicadas para todos os subtipos do HIV-1. (SHAFER, *et al.* 2007)

Nos estudos brasileiros sobre resistência primária (MEDEIROS, *et al.*; 2006; GONSALEZ, *et al.*; 2007; PEDROSO, *et al.*; 2007), listados na Tabela 2, a maioria na população adulta, encontramos uma enorme variação da prevalência de resistência primária 0-2,4% para as mutações relacionadas ao gene da protease e 1,6% a 11,4% para as mutações relacionadas ao gene da transcriptase.

7 - Resistência em crianças infectadas pelo HIV-1

Crianças são, em particular, uma população única em relação à infecção pelo HIV: elas tem um grande risco de desenvolver resistência por várias razões. A primeira: crianças mais jovens permanecem com uma carga viral mais alta, comparados com adolescentes e adultos. Segundo, há vários desafios em relação às doses dos ARVs, limitações de formulações aumentam o risco de concentração plasmática das drogas em níveis subterapêuticos, manutenção da replicação viral e resistência (GUPTA, 2009). Estudo multicêntrico na Europa (COHERE, 2008) demonstrou menor probabilidade de resposta virológica à HAART em crianças na idade de 6-12 anos e 13-17 anos, após o início do primeiro esquema HAART quando comparados com adultos. Embora a prevalência de resistência após a falência virológica do primeiro esquema ARV não foi diretamente comparada entre adultos e crianças, estudos menores sugerem que o aparecimento de resistência durante a falência virológica é similar em adultos e crianças quando ITRNN é usado no esquema HAART. Neste contexto, níveis de carga viral mais altas, principalmente em crianças mais novas, gera maior resistência na população pediátrica.

Chakraborty et al., demonstra que apenas 21% das crianças com carga viral detectável, em uso de HAART, realizaram o teste de resistência, o que poderia subestimar a prevalência de resistência na população em uso de ARVs. Portanto, o teste de resistência deve ser considerado o mais precoce possível durante a falência virológica (CHAKRABORTY, 2008).

O estudo PENTA – PERA 8 foi o primeiro estudo multicêntrico que avaliou a utilidade clínica do teste de resistência em crianças com falência

viroológica (GREEN, 2006). Não houve diferença estatística evidenciando a resposta virológica aos esquemas ARVs escolhidos pelos pediatras com ou sem a ajuda do teste de resistência. Este resultado é explicado pelo histórico de exposição ARV da população estudada: uma média de 3 diferentes ITRN foram usados nos últimos 5 anos, e aproximadamente 3/4 das crianças iniciaram esquemas ARVs com mono ou dupla terapia. E outras análises sugeriram que o grande benefício do teste de resistência está na população de crianças expostas a poucos ARVs no passado.

A tabela 3 sumariza trabalhos publicados sobre o perfil de resistência em crianças infectadas pelo HIV e apesar das diferenças metodológicas e da forma de análises do perfil de mutação em cada estudo, podemos perceber que a prevalência de mutações na população pediátrica é alta. As limitações da disponibilidade de ARVs e o longo período de exposição aos ARVs são grandes desafios no tratamento destas crianças. Tabela 3.

TABELA 2. Estudos Nacionais sobre Resistência Primária

Autor	Desenho/Local	Protease	Transcriptase reversa	Subtipo
De Medeiros LB et al. 2007	<ul style="list-style-type: none"> - 84 pacientes adultos (18-40 anos); - ART naive (virgens de tratamento); - Classificação das mutações segundo IAS 2002; - Recife/PE - Fevereiro /2002 a Janeiro/2003 	<p>Ausência de mutações primárias</p> <p>Mutações secundárias:</p> <ul style="list-style-type: none"> - L63P 40/84 (47.6%); - M36I 29/84 (34,5%); - L10I/V 14/84 (16,7%); - V77I 13/84 (15,5%); - K20R 9/84 (10,7%); - A71T/V 8/84 (9,5%); - I54P 1/84 (1,2%). 	<p>03/84 (3.6%)</p> <ul style="list-style-type: none"> - M41L: 2/84 (2.4%) - K219E: 1/84 (1.2%) <p>Mutações acessórias:</p> <ul style="list-style-type: none"> V118I 5/84 (5,9%) E44D 1/84 (1.2%) 	<ul style="list-style-type: none"> B 61/84 (72,6%) F 19/84 (22,6%) B/F 3/84 (3,6%) C 1/84 (1,2%)
Pedroso C et al 2007	<ul style="list-style-type: none"> - análise de amostras estocadas no laboratório de virologia: 140 amostras <ul style="list-style-type: none"> • 08 de doadores de sangue • 132 da clínica de AIDS (sendo 26 de crianças HIV infectadas via vertical) - ART naive; - Salvador/BA - após o ano de 2000 	<ul style="list-style-type: none"> - L63P 48% - M36I 52/140 (39%) - L10V/I 30/140 (23%) <p>7/140 (5%) das amostras com ao menos uma mutação associada à resistência aos IP</p> <p>Crianças: I50V 01/26</p> <p>MDR (3 classes) 6/140 (4,8%)</p>	<p>15/140 (11,4%) das amostras com ao menos uma mutação associada à resistência aos ITRNN</p> <p>13/140 (9,8%) das amostras com ao menos uma mutação associada à resistência aos ITRN</p> <p>Crianças: 07/26 (26,9%)</p> <ul style="list-style-type: none"> - 05 das amostras com ao menos uma mutação associada à resistência aos ITRNN - 03 das amostras com 	<ul style="list-style-type: none"> B 114/140 (84%) F 12/140 (8%) C 3/140 (2,5%) Recombinantes 22/140 - B/F 20/140 (20%) - B/C 1/140 (0.5%)

			ao menos uma mutação associada à resistência aos ITRN (não fala sobre quais as mutações foram encontradas)	
Gonzalez CR et al. 2007	<ul style="list-style-type: none"> - 123 pacientes adultos - ART naïve - São Paulo/SP - Março de 2002 a dezembro de 2006 - classificação mutações segundo Stanford online HIV Drug Resistance Database (2007) 	<ul style="list-style-type: none"> - L90M 2/123 - M46L 1/123 IP 1/123 (0,8%) MDR (3 classes) 3/123 (2,4%) 	<ul style="list-style-type: none"> - A62AG 1/123 - D67G/N 2/123 - T69D 1/123 - V75L/M 2/123 - M184V 2/123 - K103N 3/123 - P225H 1/123 <li style="text-align: center;">↓ ITRN 2/123 (1,6%) ITRNN 2/123 (1,6%) 	<ul style="list-style-type: none"> B 101/123 (82%) F 8/123 (6,5%) C 7/123 (5,7%) Recombinante 5,8% - B/F 5/123 (4,1%) - B/C 2/123 (1,7%)
Brindeiro RM ET AL. 2003	<ul style="list-style-type: none"> - ART naïve - 13 centros de testagem e aconselhamento HIV - 535 participantes 	<ul style="list-style-type: none"> - 8 (2,24%) Mutações acessórias L63P/V/T/A/I [153/345 (44.3%)], M36I/L [149/345 (43.2%)], L10I/F/V [82/345 (23.8%)], V77I [60/345 (17.4%)], A71V/T [11/345 (3.2%)], K20M/R [10/345 (2.9%)], V82I [4/345 (1.2%)] 	<ul style="list-style-type: none"> ITRN 8 (2,36%) ITRNN 7 (2,06%) 	

TABELA 3. Estudos sobre Resistência em Crianças

Autor	Desenho/Local	Protease	Transcriptase reversa	Subtipo
Linde, R, et al, 2001	-Alemanha -16 crianças – teste de fenotipagem e genotipagem em 4 pctes -todos receberam Nelfinavir	-D30N -3/4	-M184V-3/4	Não cita
Servais, J, et al, 2002	- Bélgica - 21 crianças com falência virológica, 1º. Esquema HAART com PI - mediana de 3 drogas, e duração de exposição de 26.5 meses -junho de 1997 – abril 2000 -teste de genotipagem e fenotipagem - IAS	-Pctes c/RTV: 13/18, resistência primária- 82, 54 e 90 Conclusão: em pctes mutifalhadas, regime de resgate tem uma pior resposta com NFV ou RTV	-T215Y/F e M184V, 20/21	Não cita
Mullen, J. et al, 2002	-janeiro de 1996-junho de 2000 -Londres, Inglaterra -26 testes de genotipagem- apenas 21 sequenciadas -virus selvagem em 2 pctes	-7/21(33%) mutações	-19/21(90%) -10/11 (91%) – resistência ao3TC -7/11(64%) resist. ZDV -6/8 (75%)- resist. NVP	-23/25 subtipo não B
Englund, J. A et al, 2004	-PACTG 152 -52 crianças, divididas em 2 grupos com ou sem progressão da doença Mutações ITRN estão relacionadas com aumento do risco de progressão da doença		Naive: -K70R e T215Y -5/52 -L74V-1/52 Pós-tratamento 21/28, uma mutação que causa resistência ao ZDV -13/34 –L74Vou M184V (resit.DDI)	

			-Q151M-1 pte	
Machado, E.S et al, 2004	<ul style="list-style-type: none"> - novembro de 1999 a janeiro de 2002 -Rio de Janeiro/Brazil -<14 anos de idade - classificação das mutações segundo Stanford - 75 exames de genotipagem -26 terapia dupla (1) <ul style="list-style-type: none"> - 11 ITRN exposto- uso prévio de monoterapia (2) -duração da terapia media 26.4 e 38.2 meses, grupo 1 e 2 -prevalência de resistência foi de 75.6% - 8/37 – sem evidência de mutações - Subgrupo terapia tripla: 38 ptes (multi-experimentados) <ul style="list-style-type: none"> - prevalência de mutações – 89.4% 	<ul style="list-style-type: none"> Subgrupo terapia tripla: -L90M -V82A/T - I54V/L - M46I/L - D30N - resistência a ≥ 1 PI- 63.6% 	<ul style="list-style-type: none"> - terapia dupla: média de mutação 2.84 -mais encontradas: T215F/Y; D67N; M41L; K70R 	<ul style="list-style-type: none"> Subgrupo terapia dupla -32/37 – subtipo B Subgrupo terapia tripla: - 31/37 – subtipo B Total; 21.3% non-B
Chaix, ML et al, 2005	<ul style="list-style-type: none"> -outubro de 2000- setembro 2003 -Cote-d'Ivoire - IAS- mutação -ANRS- perfil resistência viral -38 exames de genotipagem -virus selvagem – 11/38-29% -virus resistente pelo menos 01 droga -27/38 (71%), exposição média 11 meses 	<ul style="list-style-type: none"> -90M, 46L, 88S, 54V – 11/29 -38% exposto ao NFV 	<ul style="list-style-type: none"> -ins69- encontrada em 01 pte -M184V- 16/26 -62% -NNRTI -7/9 -78% 	CRF02_AG-36/38-95%
Machado, D M et al 2005	<ul style="list-style-type: none"> - 2000 – 2001 - São Paulo/Brazil - < 18 anos - TARV com 3 drogas e falência virológica 	<ul style="list-style-type: none"> -D30N 2/33 -M46I 2/33 -V82A 2/33 - L90M 2 /33 	<ul style="list-style-type: none"> Resistência -ZDV -33% -DDI - 14% -3TC e D4T-11.1% - ABC -8% 	Não cita

	<ul style="list-style-type: none"> - 33 exames de genotipagem - mediana de 12 meses de TARV - IAS – 2000 		<ul style="list-style-type: none"> -NVP-44% -EFV – 38.8% 	
Averbuch, D. et al, 2006	<ul style="list-style-type: none"> -Israel, imigrantes da Etiópia -fevereiro de 1997 – maio de 2003 -135 amostras (2.5 amostras/criança)-55 crianças -Stanford 	<ul style="list-style-type: none"> IP naïve: 6/37 -mutações primárias: M46I, V82A, I84A/F, N88D -mutações secundárias M36I-97%, I93L-94%, L63P/T/S -56%. Experimentados -K20R -37%, I54V-13%, L90M-13% -D30N -10% 	<ul style="list-style-type: none"> - ITRN naïve: 4/21 – R211K -ITRNN naïve: 30/47 mutação ou polimorfismos - experimentados M184V-83% (33/40) -K103N -39% -Y181C-39% 	Sub-tipo C
Green , H. et al, 2006 PERA- PENTA8	<ul style="list-style-type: none"> -estudo multicêntrico, randomizado, com teste resistência X sem teste resistência -pctes multifalhados -junho de2000 – julho de 2003 -184 crianças – 84 sem teste e 87 com teste. - sem evidência de resposta virológica/imunológica nos grupos com ou sem resistência – Pctes multifalhados 	<ul style="list-style-type: none"> -IP-60% pelo menos 01 mutação 	<ul style="list-style-type: none"> -ITRN- 98% (\geq mutação) - ITRNN-33% (\geq mutação) -M184V-64% -M41L-63% -T215-53% -D67N-52% L210W-44% 	Não cita
Delaugerre, C et al, 2007	<ul style="list-style-type: none"> -prevalência de resistência -França - IAS, 2005 	<ul style="list-style-type: none"> -L63P-63% -M36I-61% -L10I-44% 	<ul style="list-style-type: none"> -M41L-44% -T215Y/F-40% -M184V-39% 	Subtipo B -66% A-9% CRF02-7%

	<ul style="list-style-type: none"> - interpretação – ANRS- algoritmo francês - janeiro de 2001 a dezembro de 2003 - 119 crianças - media de exposição aos ARVs – 6.5 drogas, mediana de 8 anos - resistência a qq droga- 82.4%, ITRN -76,5%, ITRNN 48.7%, PI-42.9 % - resistência a 2 classes – 31,9% e 3 classes- 26.9% - fatores de risco: idade, exposição ARV; 1º. Tto não-HAART, tempo de exposição aos PI - fatores de risco para 3classes: meninos, tempo de exposição aos IPs 	<ul style="list-style-type: none"> -K20R-33% -M46I-27% -A71V-26% -V77V-25% - L90M-23% -V82A -18% 	<ul style="list-style-type: none"> -D67N-38% -L210W-20% -K219Q-30% -K103N-27% -Y181C-21% -G190AA-12% 	<ul style="list-style-type: none"> F-5% H-2% C, D,G,J -1%, cada
Jean-Chrysostome Cody, et al. 2008	<ul style="list-style-type: none"> - África - TARV após 2006 - 26 testes de genotipagem - ART no mínimo por 6 meses segundo WHO (d4T/3TC/NVP); - Classificação das mutações segundo ANRS 2008 (www.hiv.frenchresistance.org); - vírus selvagem em 6 (23%) - 20 (77%)- resistência a pelo menos um ARV 	<ul style="list-style-type: none"> - ≥ 3 mutações em 100% das amostras - mutações primarias 3pctes <ul style="list-style-type: none"> - M46I - V82F - L90M 	<ul style="list-style-type: none"> -M184V : 18 (69%) - TAM: 4 (15%) -NNRTI: 14 (54%) -Y181C: 14 (54%) 	Não -B 100%
Chakraborty, R. et al, 2008	<ul style="list-style-type: none"> -Inglaterra - janeiro de 1998 – dezembro de 2004 - IAS - 243 testes de genotipagem, 200 crianças <ul style="list-style-type: none"> - 44- pctes naive - 299 – pctes experimentados - sub-utilização dos testes de genotipagem – apenas 23,3% das crianças que falharam 	<ul style="list-style-type: none"> -2.0% -resistência apenas aos IPs - D30N-11% - M46I/L – 16.3% - L90M – 14.8% 	<ul style="list-style-type: none"> -13.4% -resistência apenas ITRN - 13.7% -resistência apenas ITRNN -M41L-28.4% -D67N-30.7% -K70R – 21.6% -M184V-36.7% 	

	<ul style="list-style-type: none"> -naive -6.8% com mutações maiores ITRN ou ITRNN -experimentados: <ul style="list-style-type: none"> -14.1% - resistência as 3 classes -exposição de 5 drogas (mediana) - mediana de 3.8 anos exposição aos ARVs 		<ul style="list-style-type: none"> -L210W -19.3% - K219Q – 12.9% -K103N – 25.8% Y181C/I-31.4% 	
Almeida, F. J, 2009	<ul style="list-style-type: none"> -novembro de 2000 a março 2004 -São Paulo, Brazil - classificação das mutações: IAS e Stanford - 47 crianças, transmissão vertical <ul style="list-style-type: none"> - 24 naive - 23 – failed ARV therapy - Media de tratamento foi de 60 meses - media de ARVs usados: 4 	<ul style="list-style-type: none"> -Grupo de pacientes naive - Nenhuma mutação primaria - mutação secundária: <ul style="list-style-type: none"> L10I- 16,7% K20R-12.5% M36I – 33.5 L63P -37.5% A71T- 8.3% V77I – 25% V82I -4% I93L – 12.5% - Grupo de pacientes experimentados <ul style="list-style-type: none"> 47.8% -polimorfismo 47.8% - mutações primarias -V82, I54 e L90 -21.7 M46 -17.4% 	<ul style="list-style-type: none"> - Grupo de pacientes naive <ul style="list-style-type: none"> -V118I-8,3% -K219N-4.1% -Grupo de pacientes experimentados: <ul style="list-style-type: none"> -95.6% (22/23) com resistência aos ITRN -60.8% (14/23) com resistência aos ITRNN -T215 -69.6% -M184V – 56.5% -D67N – 47.8% -M41L-43.5% -K219-34.8% -K103N -39.1% -Y181-17.4% 	<ul style="list-style-type: none"> -Subtipo B -78.3% -Subtipo C 4.3% -Subtipo F 13% -BF -4.4%

OBJETIVOS

Objetivos primários:

- Avaliar a utilidade do teste de genotipagem do HIV-1 no regime antirretroviral de resgate em crianças em falha terapêutica;
- Avaliar a prevalência da resistência antirretroviral em crianças infectadas pelo HIV após a 1ª. falha terapêutica;
- Avaliar a prevalência da resistência primária em crianças infectadas pelo HIV, virgem de tratamento antirretroviral.

Objetivos secundários:

- Determinar a variação de carga viral (CV), da contagem de linfócitos T-CD4 e a evolução clínica após troca do esquema terapêutico de resgate com seis e doze meses;
- Descrever o perfil de resistência genotípica das crianças com uma falha terapêutica ou virgens de tratamento;
- Descrever os sub-tipos do HIV-1 e a ocorrência de mutações entre os sub-tipos;
- Comparar a utilidade do teste de genotipagem do HIV-1 em pacientes após 1ª falha ou em falhas terapêuticas subseqüentes.

METODOLOGIA

POPULAÇÃO ESTUDADA

Estabelecido em 1989, o Centro de Treinamento e Referência em Doenças Infecto-Parasitárias, CTR - DIP, órgão vinculado ao Hospital das Clínicas da UFMG e à Secretaria Municipal da Saúde, é a principal instituição de referência para tratamento de crianças infectadas pelo HIV na região metropolitana de Belo Horizonte.

No primeiro ano de vida, os pacientes expostos ou infectados têm avaliação clínica mensal durante os primeiros seis meses e depois, têm o retorno agendado a cada três meses. Os pacientes que têm infecção confirmada pelo HIV são avaliados imunologicamente (através de CD₄) e virologicamente (carga viral – PCR RNA) a intervalos aproximados de três meses. Se necessário, é feita a reavaliação antes do período programado. Outros exames são solicitados conforme a rotina elaborada pelo grupo de AIDS pediátrica ou a necessidade do paciente, por indicação do médico assistente.

O Programa Nacional de DST/AIDS do Ministério da Saúde implantou uma rede nacional de laboratórios capacitados para executar o exame de genotipagem (Rede Nacional de Genotipagem - RENAGENO). O laboratório DIP da Faculdade de Medicina está capacitado desde fevereiro de 2002.

O fluxo para a realização do teste de genotipagem ocorre da seguinte forma:

- Médico assistente decide solicitar o exame de genotipagem, após falência terapêutica do seu paciente e preenche um formulário próprio (em anexo);
- Médico treinado pelo Ministério da Saúde – Médico Referência em Genotipagem – avalia e autoriza o pedido;
- Paciente colhe sangue (aproximadamente 5 ml);
- Amostra é encaminhada e processada pelo laboratório;
- Resultado é analisado e laudado pelo Médico de Referência quando sugere esquemas antirretrovirais para aquele paciente.

CRITÉRIOS DE INCLUSÃO:

- Pacientes com diagnóstico de HIV/AIDS, em acompanhamento pela equipe de pediatria no CTR - DIP, sob tratamento antirretroviral regular;
- Diagnóstico de falha terapêutica caracterizada por critérios do Consenso de Tratamento Clínico da Infecção pelo HIV em Crianças do Programa Nacional de DST/AIDS do Ministério da Saúde (PN-DST/AIDS);
- Exame de genotipagem realizado neste serviço durante o período de janeiro de 2002 a dezembro de 2007;
- Assinatura de termo de consentimento de forma livre e esclarecida.

CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO:

- Recusa dos pais ou responsáveis legais em assinar o consentimento.

RESULTADOS

DESCRIÇÃO DA POPULAÇÃO

O primeiro exame de genotipagem na população pediátrica no laboratório DIP foi realizado em julho de 2002. Até dezembro de 2007 foram realizados 162 exames, 41 em crianças virgens de tratamento, 50 em crianças após a primeira falha terapêutica e 71 exames em crianças após 2 ou mais falhas terapêuticas.

Figura 4.

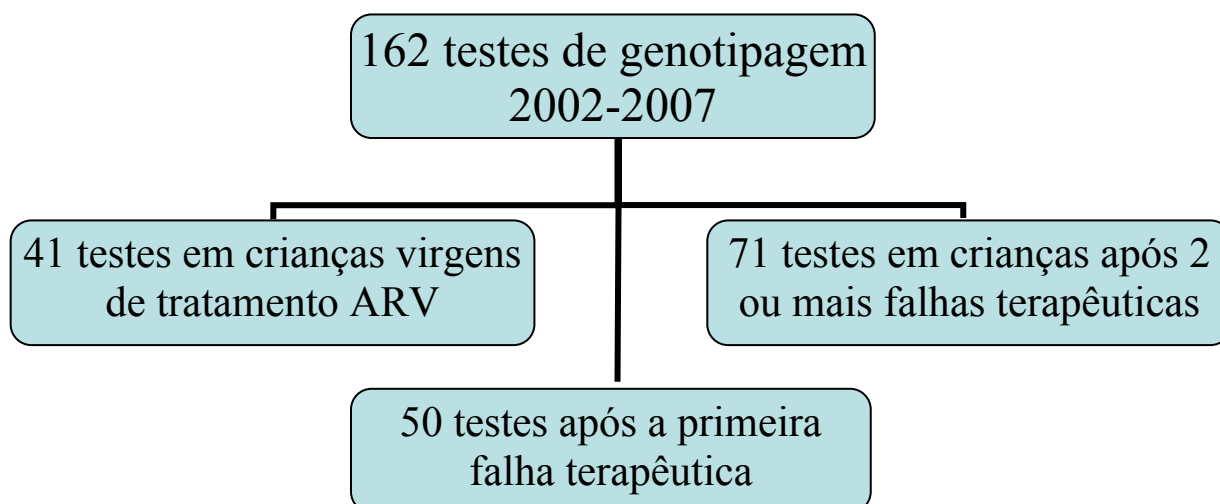


FIGURA 4: Fluxograma da descrição da população estudada

Dos 121 pacientes pediátricos que realizaram o exame após falha terapêutica, 61 (50,4%) são do sexo feminino; a mediana de idade dos pacientes no momento da genotipagem é 8,8 anos (IQR 25%-75%: 6,8 – 11,3). Observou-se

longo período de exposição aos ARVs, mediana de 6,4 anos (IQR 25%-75%: 4,5 – 8,0).

A classificação clínica imunológica dos pacientes era:

- A1 – A3: 14 pacientes (11,6%)
- B1- B3: 43 pacientes (35,6%)
- C1 – C3: 64 pacientes (52,8%)

Dos pacientes que fizeram o teste de genotipagem, 50 (41,3%) estavam na primeira falha terapêutica, 30 (24,8%) estavam na segunda falha, 15 (12,4%) na terceira falha e 26 (21,5%) tinham mais três falhas terapêuticas. O uso de mono ou terapia dupla foi usado em 51,3% dos pacientes antes do início da HAART. O uso de AZT foi o mais prevalente (98,2 %), seguido pelo ddI (87,6%), 3TC (58,4%) e D4T (50,4%), respectivamente. Em relação aos ITRNN, 39,8% Efavirenz. Em relação aos IPs , Nelfinavir (60,2%), Ritonavir (25,7%) e Lopinavir/ritonavir (9,7%).

Esquema antirretroviral;

- 2 ITRN: 10 (8,3%)
- 3 ITRN: 1 (0,8%)
- 2ITRN + 1ITRNN: 32 (26,4%)
- 2ITRN + 1IP: 69 (57,2%)
- 4 ARVs: 9 (7,4%)

O perfil das principais mutações encontradas nesta população foi: M41L (55,8%), D67N (54%), K70R (30,1%), M184V (32,7%), L210W (37,2%),

T215YF (65,5%), K219QE (37,2%), Ins 69 (1,8%), Q151M (1,8%), K103N (35,4%), D30N (24,8%), M46IL (15%), I54V (16,8%), N88S (21,2%) e L90M (27,4%). As mutações K65R e a deleção 67 não foram encontradas nesta população.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, F. J. *et al.* Diversity and prevalence of antiretroviral genotypic resistance mutations among HIV-1 infected children. *J. Pediatr.* v. 85, n. 2, p. 104-9, 2009.
- ANTIRETROVIRAL therapy of HIV infection infants and children in resource-limited settings: towards universal access: recommendation for a Public Health approach. Geneve: OMS, 2006. Disponível em: <<http://who.int/hiv/pub/guidelines/WHOpaediatric.pdf>>. Acesso em 26 maio 2009
- ARION, D.; SLUIS-CREMER, N.; PARNIAL, M. A. Mechanism by which phosphonoformic acid resistance mutations restore 3'-azido-3'deoxythymidine (AZT) sensitivity to AZT-resistance HIV-1 reverse transcriptase. *J. Biol. Chem.* n. 275, p. 9251-5, 2000.
- AVERBUCH, D. *et al.* Diminished selection for Thymidine-Analog mutations associated with the presence of M184V in Ethiopian children infected with HIV subtype C receiving Lamivudine-Containing therapy. *Pediatr. Infect. Dis. J.* v. 25, n. 11, p. 1049-56, Nov. 2006
- BRASIL. Ministério da Saúde. Programa Nacional de DST e AIDS. *Boletim epidemiológico*. DST – AIDS. Brasília: MS, 2009. Disponível em: < <http://www.aids.gov.br/data/documents> >. Acesso em 26 nov. 2009.
- BRENNER, B. *et al.* A V106M mutation in HIV-1 clade C viruses exposed to efavirenz confers cross-resistance to non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *AIDS* . n. 17, p. F1-F5, 2003.
- BRINDEIRO, R. M. *et al.* Brazilian network for HIV drug resistance surveillance (HIV-BResNet): a survey of chronically infected individuals. *AIDS*. v. 17, n. 2, p. 1063-9, May 2003
- CHAIX, C.; GRENIER-SENNEILIER, C. *et al.* Economic evaluation of drug resistance genotyping for the adaptation of treatment in HIV infected patients in the VIRADPT study. *J. Acquir. Defic. Synd.* v. 24, n. 3, p. 227-31, july, 2000
- _____; ROUET, F. *et al.* Genotypic human immunodeficiency virus type 1 drug resistance in highly active antiretroviral therapy children in Abidjan, Côte d'Ivoire. *Pediatr. Infect. Dis. J.* v. 24, n. 12, p. 1072-6, Dec. 2005.
- CHAKRABORTY, R. *et al.* HIV-1 Drug resistance in HIV-1 infected children In The United Kingdom from 1998 to 2004. *Pediatr. Infect. Dis. J.* v. 24, n. 5, p. 457-9, May, 2008.
- CHEN, Z. *et al.* Three-dimensional structure of mutant HIV-1 protease displaying cross-resistance to all protease inhibitors in clinical trials. *J. Biol. Chem.* v. 270, n. 37, p. 21433-6. Sep. 1995

- CLAVEL F.; HANCE, A. J.. HIV Drug Resistance. *N. Engl. J. Med.* v. 350, n. 10, p. 1023-35, 2004.
- COHEN, N. J. *et al.* Response to changes in antiretroviral therapy after genotyping in human immunodeficiency virus-infected children, *Pediatr. Infect. Dis. J.* v. 24, n. 7, p. 647-53, July, 2002.
- CONFFIN, J. M. HIV population dynamics in vivo: implications for genetic variation, pathogenesis, and therapy. *Science*, n. 267, p. 483-9, 1995.
- DE ROSSI, A. Virological and immunological response to antiretroviral therapy In HIV-1 infected children; genotyping and phenotypic assays in monitoring virological failure. *N. Microbiol.* v. 27, n. 2, Sup.1, p. 45-50, 2004.
- DELAUGERRE, C. J. *et al.* Prevalence and risk factors associated with antiretroviral resistance in HIV-1 infected children. *J. Med. Virol.* v. 79, n. 9, p. 1261-9, 2007.
- DIAZ, R. S. Orientações para o manuseio de testes de resistência anti-retroviral no paciente infectado pelo HIV. São Paulo: Abbott, [2005?]. 205 p.
- ENGLUND, J. C. *et al.* Mutations linked to drug resistance human immunodeficiency virus type 1 biologic phenotype and their association disease progression in children receiving nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Pediatr. Infect. Dis. J.* v. 23, n. 1, p. 15-22, Jan. 2004.
- ESTRUTURA do genoma do HIV-1. Disponível em:
< <http://hiv-web.lanl.gov/content/hiv-db/MAP/hivmap.html>> . Acesso em: mar 2000
- FAUCI, A. S. *et al.* Immunopathogenic mechanisms of HIV infection. *Ann. Int. Méd.* v. 124, n. 7, p. 654-63, Apr. 1996.
- FERREIRA, F. G. F. *Determinantes da adesão à terapia anti-retroviral em crianças infectadas pelo HIV.* 2004. 120 f. Dissertação (Mestrado em Medicina – Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2004.
- FRENKEL, L. M.; TOBIN, N. A. Understanding HIV Drug Resistance. *Ther. Drug. Monit.* v. 26, n. 2, p. 116-21, Apr. 2004
- GIAQUINTO, C. *et al.* Current and future antiretroviral treatment options in paediatric HIV Infection. *Clin. Drug. Investig.* v. 28, n. 6, p. 375-97, 2008. review.
- GONSALEZ, C. R. *et al.* Drug resistance among chronic HIV-1 infected patients naive for use of antiretroviral therapy in Sao Paulo city. *Virus Res.* v. 129, n.2, p. 87-90, Aug. 2007.

GREEN, H. *et al.* A randomized controlled trial of genotypic HIV drug resistance testing in HIV-1 infected children: the PERA (PENTA 8) Trial. *Antiv. Ther.* v. 11, n. 7, p. 857-67, 2006.

GUIDELINES, P. (2004). "PENTA guidelines for the use of antiretroviral therapy in paediatric HIV infection.

GUPTA, R.K.; GIBB, D. M.; PILLAY, D. Management of paediatric HIV-1 resistance. *Curr. Opin. Infect. Dis.* v. 22, n. 3, p. 256-63, June 2009.

HAASE, A. T. Population biology of HIV-1 infection: viral and CD4⁺ T cell demographics and dynamics in lymphatic tissues. *Ann. Rev Immunol.* v.17, p. 625-56, Apr.1999.

HALBRICH, R.H. *et al.* A randomized, prospective study of phenotype susceptibility testing versus standard of care to manage antiretroviral therapy: CCTG 575. *AIDS.* v. 19, n.3, p. 295-302, Feb. 2005

HIRSCH, M. S. *et al.* Antiretroviral drug resistance testing in adults infected with human immunodeficiency virus type 1: recommendations of an International AIDS Society-USA Panel. *Clin. Infect. Dis.* v. 37, p. 113-28. 2003

HU, G. D. *et al.* Some insights into mechanism for binding and drug resistance of wild tpe and 150V V82A and I84V mutations in HIV-1 protease with GRL-98065 inhibitor from molecular dynamic simulations. *Eur. J. Med. Chem.* Oct. 13, 2009.

JOHNSON, V. A. *et al.* Update of the drug resistance mutations in HIV-1: December 2008. *Topics in HIV Medicine.* v. 16, n. 5, p. 138-45. Dec. 2008.

KAKEHASI, F. *Determinantes e tendências da transmissão vertical do vírus da imunodeficiência humana adquirida (HIV-1) na região metropolitana de Belo Horizonte, no período de janeiro de 1996 a dezembro de 2000.* 2001. 152 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2001.

LINDE, R. *et al.* Low incidence of genotypic and phenotypic resistance in paediatric HIV-infected patients on long-term first-line antiretroviral triple therapy. *AIDS.* v. 15, n. 8, p. 1077-9, May 2001.

LITTLE, S. J. *et al.* Antiretroviral-Drug resistance among patients recently infected with HIV. *N. Engl. J. Med.* v. 347, n. 6, p. 385-94. Aug. 2001.

MACHADO, D. M. *et al.* Analysis of HIV-Type 1 protease and reverse transcriptase in Brazilian children failing highly active antiretroviral therapy (HAART). *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.* v. 47, n. 1, p. 1-5. Jan./Feb. 2005.

- MEDEIROS, L. B. *et al.* Primary resistance of human immunodeficiency virus type 1 in a reference center in Recife, Pernambuco, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* v. 101, n. 8, p. 845-9, Dec. 2006.
- MILLER, L. G. *et al.* Patient preferences regarding antiretroviral therapy. *Int. J. STD AIDS.* v. 13, p. 593-601, 2002.
- MULLEN, J., S. *et al.* Antiretroviral drug resistance among HIV-1 infected children failing treatment. *J. Med. Virol.* v. 68, n. 3, p. 299-304, 2002.
- PEDROSO, C. *et al.* High Prevalence of Primary Antiretroviral Resistance among HIV-1 infected adults and children in Bahia, a Northeast State of Brazil. *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr.* v. 45, n. 2, p. 251-3, June 2007.
- PRESTON, B. D.; POEIESZ, B. J.; LOEB, L. A. Fidelity of HIV-1 reverse transcriptase. *Science*, v. 242, p. 1168-71, 1998.
- PROIETTI, A. B. F. C. Genetic variability of HIV-1 isolates from Minas Gerais. Brazil. *Rev. Microbiol.* v. 30, n. 2, p. 141-3, abr./jun. 1999.
- ROBERTS, J. D.; BEBENEK, K.; KUNKEL, T. A. The accuracy of reverse transcriptase from HIV-1. *Science*, v. 242, p. 1171-74, 1998
- ROBERTSON, D. L, *et al.* HIV-1 nomenclature proposal. *Science.* v. 288, p. 5463-5, 2000
- SERVAIS, J. M. *et al.* Resistance testing in children changing human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitor. *Pediatr. Infect. Dis. J.* v. 21, n. 3, p. 214-20, Mar. 2002.
- SHAFER, R. W. *Genotypic testing for HIV -1 drug resistance.* Stanford: UCSF, 2004. Disponível em: < <http://hivinsite.ucsf.edu/inSite?page=03-02-07>> Acesso em: 00 maio 2008
- _____, R. W.; RHEE, S. Y. *et al.* HIV-1 protease and reverse transcriptase mutations for drug resistance surveillance. *AIDS.* v. 21, n. 2, p. 215-23, Jan. 2007.
- SHAFER, R. W.; SCHAPIRO, J. M. HIV-1 Drug resistance mutations: an updated framework for the second decade of HAART. *AIDS* ver. v. 10, n. 2, p. 67-84, Apr./June. 2008.
- SHARLAND, M, *et al.* PENTA guidelines for the use of antiretroviral therapy, 2004. *HIV Med.* v.5 n. suppl 2, p. 61-86, JULY 2004.
- SHULMAN N, Z. *et al.* Phenotypic hypersusceptibility to non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors in treatment-experienced HIV-infected patients: impact on virological response to efavirenz-based therapy. *AIDS* . v.15, p. 1125-32, 2001

TUPINAMBÁS, U. *et al.* Treatment switch guided by HIV-1 genotyping in Brazil. *Braz. J. Infect. Dis.* v. 10, n.2, p. 82-8, Apr. 2006.

UNAIDS (2008). AIDS Epidemic Update Disponível em: <www.unaids.org. >
Acesso em: 10JUN 2009.

WESTIN, M. R. *Análise do perfil de mutação, subtipos e vias mutacionais do HIV-1 associados à resistência aos antirretrovirais através de genotipagem no período de 2002 a 2006, em pacientes com falha terapêutica do CTR-DIP –Orestes Diniz – implicações imunológicas.* 185 f. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Medicina - Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2009.

WORKING Group on Antiretroviral Therapy and Medical Management of HIV-Infected Children. *Guidelines for the Use of Antiretroviral Agents in Pediatric HIV Infection:* February 23, 2009. 139 p. Disponível em:
<http://aidsinfo.nih.gov/ContentFiles/PediatricGuidelines.pdf>. Acesso em: 26 fev. 2009.

ZHANG, Y-M. *et al.* Drug resistance during indinavir therapy is caused by mutations in the protease gene and in its gag substrate cleavage sites. *J. Virol.* v. 71, n. 9, p. 6662-70, Sep. 1997.

O trabalho a seguir, intitulado “**Prevalence of primary antiretroviral resistance among HIV-1 vertically infected children in Belo Horizonte, Brazil**”, tem como objetivo avaliar a prevalência da resistência primária aos antirretrovirais e foi aceito para publicação na revista *AIDS Research and Human Retroviruses* (*in press*).

O trabalho exposto logo em seguida, intitulado “**Prevalence and analyses of HIV-1 resistance mutations profiles in children failing their first ARV regimen,**” tem como objetivo avaliar a prevalência à resistência aos antirretrovirais em crianças infectadas pelo HIV-1, após a primeira falha do tratamento.

Esses trabalhos estão sendo apresentados no modelo de artigo para publicação científica, de acordo com as recomendações do Colegiado do Programa de Pós-graduação em Saúde da Criança e do Adolescente da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais

Prevalence of Primary Drug Resistance Associated Mutations among HIV-1 Vertically Infected Children in Belo Horizonte, Brazil.

Ferreira, F. G. F.; Pinto, J. A.; Kakehasi, F. M.; Cleto, S.; Tupinambás, U; Aleixo, A. W.; Cardoso, C.S.

Abstract. In the past few years there has been increasing concern about the transmission of drug-resistant HIV. This study aimed to describe the frequency of primary mutations associated with HIV-1 drug resistance and the prevalence of genetic HIV subtypes in a population of vertically-infected children before the initiation of HAART. At the time of genotypic test, the median age was 6.0 years (IQR 25%-75%:3.8-9.2) and median age at first Clinic visit was 3.84 years (IQR 25%-75%: 1.23-6.11). Antepartum maternal ARV exposure for prevention of mother-to-child transmission (PMTCT) occurred on three (7.3%) mothers. According to the WHO criteria, primary ARV resistance mutations were detected in four out of 41 (9.8%) children. Subtype B was the most prevalent (63.4%). Detection of primary HIV-1 resistance mutations in children lends support for the recent National Guidelines recommendation to perform resistance testing in all newly diagnosed children, regardless of age at diagnosis and antenatal ARV exposure.

The prevalence of drug resistance associated mutation (DRM) in treatment naïve HIV-1-infected individuals has implications for therapeutic options outcome.[1]. Individuals infected with resistant HIV often have limited options for antiretroviral therapy and may also present an attenuated response to therapy

due to a lower genetic barrier to resistance, a higher risk of virologic failure, and a high risk of developing resistance even to those drugs in their regimen that were originally fully active.[2, 3] When the resistance occurs without the prior use of antiretroviral, it constitutes the primary resistance and is generally transmitted at the time of acquisition of the viral infection.[4] Primary resistance appears to be increasing in the United States and other countries where antiretroviral therapy is widely available. The prevalence of transmitted drug-resistant HIV has been estimated to range widely from 2.1% to 51.5% in antiretroviral (ARV) naïve recently and chronically infected subjects in studies with variable populations, designs, methods and definitions of resistance.[2, 5] In Brazil, Gonzalez et al, analyzed 123 naïve adults, ARV drug resistance mutations were detected in 8 (6.5%)[6]. Medeiros et al. revealed a low prevalence of primary mutations of resistance related to NRTI (3.6%) and no primary mutations related to NNRTI or PI were detected.[4] Pedroso et al, detected resistance mutation in 18.9%, among 114 adults and 26.9%, among 26 naïve children[7]. This study aimed to describe the frequency of primary mutations associated with HIV-1 drug resistance and the prevalence of genetic HIV subtypes in a population of vertically-infected children before the initiation of HAART.

Antiretroviral naïve children were identified among the population in follow-up at the Federal University of Minas Gerais Pediatric HIV Clinic, in Belo Horizonte, Brazil. Subjects with a pre-ARV treatment plasma sample stored at our repository between 2003 and 2007 were included in the analysis.

We investigated the proportion of samples suggesting at least 1 major protease inhibitor (PI), non-nucleoside reverse transcription inhibitor (NNRTI) or

nucleoside reverse transcription inhibitor (NRTI) mutation according to the list proposed for genotypic transmitted drug-resistant HIV surveillance by WHO.[8] HIV-1 resistance genotyping and subtype determination- The ViroSeq™ HIV-1 Genotyping System (Celera Diagnostic, Abbott Laboratories, US) was used for the identification of resistance-associated mutations in the HIV-1 polymerase (*pol*) gene according to the manufacturer. All sequences obtained from samples were subjected to quality control assessments using the Blast-Renageno resistance analysis program (web site- <http://www.aids.gov.br/renageno>) to exclude sample mix-ups or contamination.

Subtype and drug resistance analysis- The HIV-1 subtyping was based on polymerase (*pol*) gene sequences (The 297 nucleotides of Protease and the first 1003 nucleotides from RT). The sequences were submitted to REGA HIV Subtyping tool available at Bioafrica website (<http://www.bioafrica.net>) and then phylogenetic analysis was done in MEGA 3.1 software, using the method Neighbour-Joining (NJ) with Kimura's parameter model. The amino acid sequences of RT (positions 1 to 335) and PR (positions 1 to 99) genes, were deduced from the nucleic acid sequences, and compared to a subtype B consensus sequence from the Stanford HIV RT as well Protease Sequence database (<http://hivdb.stanford.edu/hiv/>). Established drug-resistance positions were defined by use of the International AIDS Society-USA expert panel mutations list. Protease and RT substitutions were categorized as NRTI, NNRTI, and PI mutations.

CD4⁺ T cell counts were estimated by flow cytometry (FacsCalibur) and plasma HIV-1 RNA levels were determined by bDNA, version 3.0. The study was approved by local Ethics Review Board.

Samples from 41 children were evaluated. As shown in Table 1, the median age at the time of genotypic test was 6.0 years (IQR 25%-75%: 3.8-9.2), 48.8 % were on CDC disease stage B, median viral load was 4.6 log (IQR 25%-75%: 4.0-4.9) and median CD4 count was 556 cell/mm³ (IQR 25%-75%: 352-834). Median age at first Clinic visit was 3.84 years (IQR 25%-75%: 1.23-6.11). Antepartum maternal ARV exposure for prevention of mother-to-child transmission (PMTCT) occurred on three (7.3%) mothers. Two received Zidovudine (ZDV) + Lamivudine (3TC) + Lopinavir/ritonavir (LPV/Rit) and one received ZDV monotherapy. Six (14.6%) mothers were exposed intrapartum to ZDV. ZDV neonatal prophylaxis occurred in eight (19.5%) participants and breastfeeding at any period of time reported by and 29 (70.7%) participants. HIV-1 subtype B was the most prevalent (63.4%), followed by subtype F (24.4%) and subtype C (2.4%). Clinical, laboratorial and demographic characteristics of the four subjects in the “resistant” group were similar to the 37 subjects with no major protease and transcriptase mutations, the “susceptible” group (Table 1).

Primary DRMs was found in 4 of 41 subjects (9.8%; 95% confidence interval: 2.7-23.1). Three subjects presented DRMs associated to reverse transcriptase (M41L alone, K103N alone and D67N, K70R, M184V, T215Y and K103N), and one subject presented DRM associated to protease (L90M alone). No simultaneous resistance mutations related to PI and NNRTI were detected. The subject that presented 3 TAMs (D67N, K70R, T215Y), M184V and the K103N mutations, was antenatally exposed to ZDV+3TC+LPV/r , was not breast-fed and received prophylactic ZDV for 6 weeks.

Positions 63 (L63P/S/I/N/T/Q, 32/41) were the most frequently observed polymorphisms in the PR gene, followed by positions 36 (M36I/L, 22/41), 93 (I93L/M, 12/41), 10 (L10I/V, 08/41), 77 (V77I, 7/41). In the TR gene, mutations T69S/N/T and A62V/A/P were observed in 2 subjects (4.9%), G333E/G 1/41 and K211K/E/S 26/41. A98G/S and V179D/F/T/I/V were observed in 3 (7.3%) and 4 (9.8%) subjects, respectively (Table 2).

The prevalence of primary DRMs in this study was 9.8%. As reported by others [2, 3, 9, 10], our findings indicate similar transmission rates of mutations and polymorphisms, although comparisons between studies are limited by differences in study design and reference lists of resistance mutations in which estimates have been based on.

Our study searched for primary drug resistance in chronically infected children, therefore, some of the DRMs might no longer be detected, in the absence of the drug selection pressure. However, persistence of DRMs was observed in children as old as 10 years. Studies have demonstrated the persistence of mutations of primary resistance for years as dominant quasispecies and possibly for longer as minority and archived species, supporting the rationale for testing the chronically infected subjects. [4, 11]

In a prospective observational study carried out at Belo Horizonte, MG, the rate of HIV-1 vertical transmission declined from 20% to 3% during the seven-year period (1998-2005), the relative reduction was 85%. The ARV during pregnancy increased from 66.7% in 1998 to 89.9% in 2005, HAART increased from 11.1% in 1998 to 76.1% in 2005.[12]

According to Shafer [8, 13], L90M occurs in 0.2% and 0.1% of subtypes B and C isolates, respectively in naïve subjects and contributes to or directly confers *in vitro* and *in vivo* resistance to all PI. L33I/V are polymorphisms found in untreated persons and their effect on drug resistance is not known. Mutations at positions 10, 20, 36, and 71 each occur in up to 10% of untreated persons infected with subtype B viruses. Position 63 is the most polymorphic protease mutation; in untreated persons about 45% of isolates have 63L. Mutations at positions 77 and 93 occur in 25% of untreated persons.[13]

Substitutions at position 69 are the most commonly occurring NRTI resistance mutations other than the TAMs and M184V, and may contribute to resistance to each of the NRTIs when they occur together with TAMs. M41L is one of the most commonly transmitted drug resistance mutations occurring in 0.9% of ARV-naïve isolates. G333E/G cause two-fold reduction in ZDV susceptibility when it occurs in combinations with multiple TAMs. A98G cause 2-fold resistance to each of the NNRTI. A98S is common polymorphism that not causes NNRTI resistance. V179D causes low-level resistance to each of the NNRTIs. V179I is a common polymorphism that occurs in 2% of untreated persons and it does not cause resistance to any of the approved NNRTI.

In the United Kingdom, Chakraborty et al. reported that 6.8% of the samples (3 of 44) in “naïve” children before the commencement of HAART contained major primary resistance mutations to NRTIs and NNRTIs. None of the biologic mothers of the three children with DRMs had documented evidence of antenatal prophylaxis with ARV [9]. In Argentina, Vignoles et al. described a high percentage (9%) of recently diagnosed infants with primary ART resistance mutations: at least one primary mutation associated with resistance to reverse

transcriptase and protease inhibitors.[10] This higher frequency of resistance was found among children aged < 12 months. In a study from Sao Paulo, Brazil, with 24 ARV-naïve children none had genotypic evidence for significantly reduced ARV susceptibility [14].

Although limited by the small sample size, the relatively high prevalence of primary HIV-1 DRMs in this cohort of perinatally infected children supports the recent Brazilian National AIDS Program recommendation to perform resistance testing in all newly diagnosed children, regardless of age at diagnosis and antenatal ARV exposure. More studies are necessary to assess the impact of vertically transmitted resistant strains on the virological response to therapy.

Table 1: Clinical and Laboratorial Characteristics of Overall Study Population and According to Genotypic Resistance Test

Characteristics	Population (n=41)	Resistant (n=4)	Susceptible (n=37)	P
<i>Age</i>				
Median (years)	6.00	5.40	6.00	p = 0.593
25-75% IQR	(3.74 – 9.15)	(1.15 – 10.13)	(3.85 – 9.15)	
<i>Age of HIV diagnostics</i>				
Median (years)	3.84	1.06	4.05	p= 0.234
25-75% IQR	(1.23 – 6.11)	(0.33 -5.28)	(2.08 – 6.11)	
<i>CDC classification (%)</i>				
N1- N3	2/41 (4.9)	1/4 (25)	1/37 (2.7)	
A1-A3	15/41 (36.6)	1/4 (25)	14/37 (37.8)	
B1-B3	20/41 (48.8)	1/4 (25)	19/37 (51.4)	
C1-C3	4/41 (9.8)	1/4 (25)	3/37 (8.1)	
<i>HIV-1 Subtype (%)</i>				
Subtype B	26/41 (63.4)	3/4 (75)	23/37 (62.2)	p = 0.533
Non-B Subtype	15/41 (36.6)	1/4 (25)	14/37 (37.8)	
<i>Breastfeeding (%)</i>				
	29/39 (74.4)	3/4 (75)	26/35 (74.3)	p = 0.892
<i>PMTCT Prophylaxis (%)</i>				
	8/41(19.5)	1/4 (25)	7/37 (18.9)	p = 0.596
<i>Viral load (log) –Children < 1 year (N= 6)</i>				
Median	6.0	6.0	6.0	p = 0.704
25-75% IQR	5.24 - 6.1	N/A	5.18 – 6.2	
<i>Viral load (log) – Children: 1 < 3years (N=11)</i>				
Median	4.74	5.0	4.57	p = 0.327
25-75% IQR	4.48 – 5.0	4.75 – 5.6	4.32-4.74	
<i>Viral load (log) – Children: 3 < 5 years (N= 22)</i>				
Median	4.38	4.31	4.31	P = 0.703
25-75% IQR	4.11 – 4.86	4.41 -4.81	4.06-4.88	
<i>Viral load (log) – Children ≥ 5 years (N=30)</i>				
Median	4.34	4.82	4.30	p = 0.459
25-75% IQR	4.20 - 4.72	4.74 – 4.91	4.19-4.64	
<i>CD4 (percent) - Children <11 months (N=5)</i>				
Median	34	30	35	P = 0.828
25-75% IQR	23 - 42	N/A	20.5 - 45	
<i>CD4 (percent) - Children: 12 -35 months (N=12)</i>				
Median	26	29	26	P = 0.850
25-75% IQR	22 - 34	22 - 36	21.5 - 33.5	
<i>CD4 (percent) - Children: 36- 60 months (N=30)</i>				
Median	25.5	25.4	25.5	P = 0.946
25-75% IQR	19.8 - 31.5	21 - 29.7	19.3 - 32.5	
<i>CD4 (percent) - Children > 60 months (N=30)</i>				
Median	22	18.5	22	P= 0.589
25-75% IQR	16.3 - 27.5	2 - 35	17 - 27	

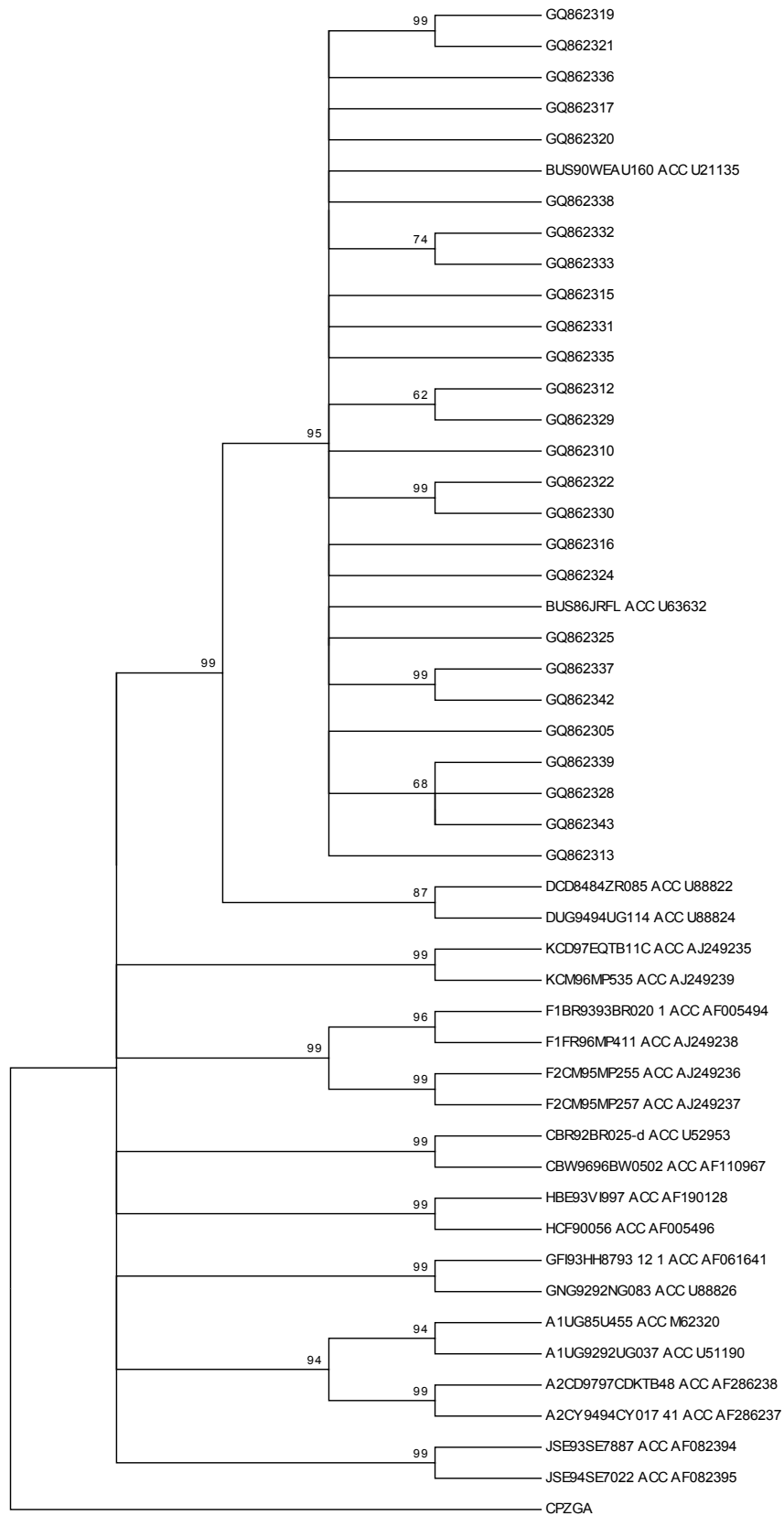
Table 2: Protease (PR) and Reverse Transcriptase (RT) mutations of HIV and ARV exposure for prevention of mother-to-child transmission (PMTCT)

ID*	Age	Breast feeding	PMTCT neonatal	PMTCT maternal	HIV subtype	PR mutation	RT mutation
GQ862343	6 m	NO	YES	ZDV+ 3TC+LPV/RTV plus ZDV EV	B	L63P	<i>K103N, D67N, K70R, M184V, T215Y, R211K</i>
GQ862304	3y	YES	NO	NO	B^{PR}/C^{RT}	L10V, M36I, L63P, <i>L90M</i> , I93I	R211K
GQ862319	12y	NO	NO	NO	B	V82VI	V179I, R211K
GQ862335	5y	YES	NO	NO	B	L63R, V82I	V179D,
GQ862328	10y	YES	NO	NO	B	L63P, I93L	<i>M41L</i>
GQ862310	10y	YES	NO	NO	B	I13V, M36I, L63LP	
GQ862334	3y	YES	NO	NO	F	K20R, M36I, I62V, L63I	R211K
GQ862340	7y	YES	NO	NO	F ^{PR} /K ^{RT}	L10I, I13V, M36I, L63A	R211EK
GQ862336	9y	YES	NO	NO	B	I62V, L63P, V77I, I93L	R211S
GQ862305	12y	YES	NO	NO	B	M36I, L63PS	
GQ862333	3y	YES	NO	NO	B	L63P, I64M, I93L	A98S, R211K
GQ862320	7y	YES	NO	NO	B	L33V, I64V	R211R
GQ862317	8y	YES	NO	NO	B	L63P	
GQ862321	4y	NO	YES	ZDV EV only	B	I93L	V179I, R211K
GQ862339	7y	YES	NO	NO	B	M36I, L63A, I93L	<i>K103N</i>
GQ862332	9y	YES	NO	NO	B	I93L	
GQ862324	3y	NO	YES	ZDV EV only	B	M36I, L63S, I93L	G333EG, R211K
GQ862322	7y	YES	NO	NO	B	I13V, M36I, D60E, I62V, L63P	
GQ862330	10y	UKN	NO	NO	B	D60E, L63P	
GQ862338	5y	YES	NO	NO	B	L63P	E44K
GQ862331	3y	NO	YES	ZDV monotherapy	B		A98S, R211K
GQ862308	8y	NO	NO	NO	F	L10V, M36I, L63S, V77I	R211K
GQ862318	12y	YES	NO	NO	F	M36I, L63H, I93L	T69S, R211K
GQ862341	2y	YES	NO	NO	F	L10I, M36I, L63P, I93L	A62V, R211K
GQ862342	2m	NO	YES	ZDV EV only	B	L63P, I64V, V77I	R211K
GQ862309	7y	YES	NO	NO	F	L10I, M36I, L63T	R211R
GQ862315	5y	YES	NO	NO	B	D60E, I62V, L63T, I93L	R211K
GQ862337	4y	NO	YES	NO	B	L63P, I64V, V77I	R211K
GQ862323	8y	YES	NO	NO	F	L10V, M36I, L63T, I64V	V179IV, R211K
GQ862326	5y	UKN	NO	NO	F	M36I, L63R	R211K
GQ862307	6y	YES	NO	NO	F	L10I, I13V, M36I, L63S	A62AP, T69NT, R211K
GQ862316	6y	YES	NO	NO	B	I13V, M36I, L63S	R211K
GQ862306	4y	YES	NO	NO	F	M36I, L63E	R211I
GQ862313	4y	YES	NO	NO	B	M36I, V77I	A98S
GQ862325	12y	YES	NO	NO	B	<i>L33F</i> , I62V, L63I,	R211K

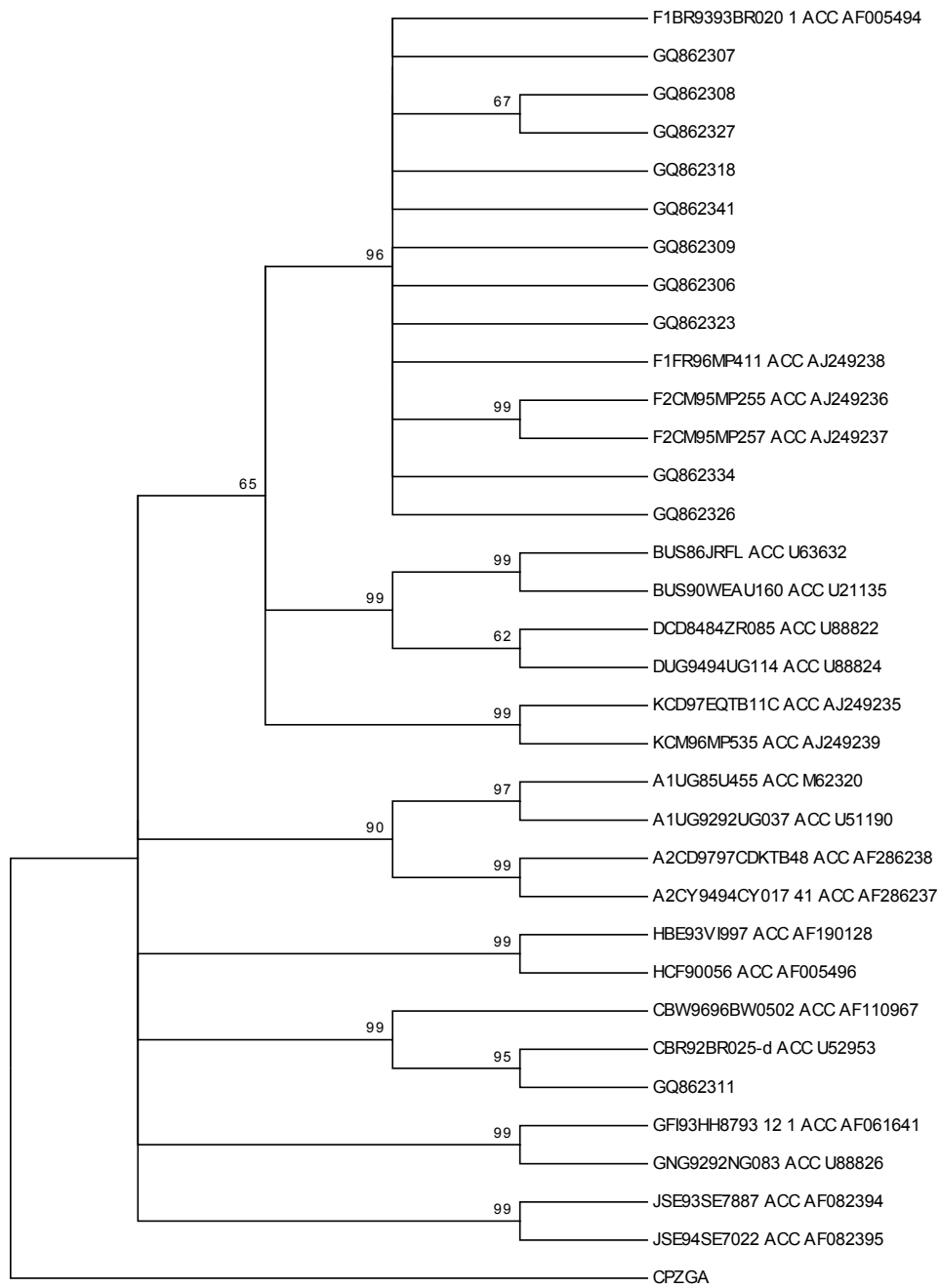
GQ862327	1m	NO	YES	ZDV EV only	F	I64V, V77I L10V, M36I, D60E,	R211EK
GQ862329	16y	UKN	NO	NO	B	I62V, L63AITV L63P, A71V V77I,	
38	2m	NO	YES	ZDV+3TC+ LPV/RTV plus ZDV EV	UNK	I93L M36I	
GQ862314	1y	YES	NO	NO	D ^{PR} /B ^{RT}	K20R, M36I, I93L	R211K
GQ862312	14y	YES	NO	NO	B	L63P	R211K
GQ862311	4y	YES	NO	NO	C	M36I	R211K

ID*: GenBank Accession Number

Phylogenetic Tree B subtype (n=25)



Phylogenetic Tree Non-B subtype (n=11)



References

1. Lail, M., et al., *Profile of Primary Resistance in HIV-1-Infected Treatment-Naive Individuals from Western India*. AIDS Research and Human Retroviruses, 2008. **24**(7): p. 987-990.
2. Bannister, W.P., et al., *Transmitted Drug Resistant HIV-1 and Association with Virologic and CD4 Cell Count Response to Combination Antiretroviral Therapy in the EuroSIDA Study*. Journal Acquir Immune Defic Syndr, 2008. **48**(3): p. 324-333.
3. Shafer, R.W., et al., *HIV-1 Protease and Reverse Transcriptase Mutations for Drug Resistance Surveillance*. AIDS, 2007. **21**(2): p. 215-223.
4. Medeiros, L.B., et al., *Primary resistance of human immunodeficiency virus type 1 in a reference center in Recife, Pernambuco, Brazil*. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2006. **101**(8): p. 845-849.
5. Booth, C.L. and A.M. Geretti, *Prevalence and Determinants of Transmitted Antiretroviral Drug Resistance in HIV-1 Infection*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2007. **59**: p. 1047-1056.
6. Gonzalez, C.R., et al., *Drug resistance among chronic HIV-1 infected patients naive for use of antiretroviral therapy in Sao Paulo city*. Virus Research, 2007. **129**: p. 87-90.
7. Pedroso, C., et al., *High Prevalence of Primary Antiretroviral Resistance Among HIV-1-Infected Adults and Children in Bahia, a Northeast State of Brazil*. Journal Acquir Immune Defic Syndr, 2007. **45**(2): p. 251-3.
8. Shafer, R.W., S.Y. Rhee, and D. Bennett, *Consensus Drug Resistance Mutations for Epidemiological Surveillance: Basic Principles and Potential Controversies*. Antiviral Therapy, 2008. **13**(Suppl 2): p. 59-68.
9. Chakraborty, R., et al., *HIV-1 Drug Resistance in HIV-1 Infected Children In The United Kingdom From 1998 to 2004*. The Pediatric Infectious Disease Journal, 2008. **27**(5): p. 457-9.
10. Vignoles, M., et al., *High frequency of primary mutations associated with antiretroviral drug resistance in recently diagnosed HIV-infected children*. Antiviral Therapy, 2007. **12**(7): p. 1133-7.
11. Booth, C.L., et al., *Prevalence and predictors of antiretroviral resistance in newly diagnosed HIV-1 Infection*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2007. **59**: p. 517-524.
12. Kakehasi, F.M., et al., *Determinants and trends in perinatal human immunodeficiency virus type1 (HIV-1) transmission in metropolitan area of Belo Horizonte, Brazil:1998-2005*. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2008. **103**(4): p. 351-357.
13. Shafer, R.W., *Genotypic Testing for HIV -1 Drug Resistance*. 2003: Stanford, CA. p. 84.
14. Almeida, F.J., et al., *Diversity and Prevalence of Antiretroviral Genotypic Resistance Mutations Among HIV-1-Infected Children*. J Pediatr, 2009. **85**(2): p. 104-109.

PREVALENCE AND ANALYSES OF HIV-1 RESISTANCE MUTATIONS PROFILES IN CHILDREN FAILING THEIR FIRST ARV REGIMEN

Abstract

Failure to response to antiretroviral (ARV) therapy has been associated with emergence of drug-resistant virus. We aimed to describe the pattern and the prevalence of drug resistance after the first virological failure in HIV-1 infected children at a referral center in Belo Horizonte, Brazil. From January of 2002 to December 2007, 50 vertically infected children underwent genotypic HIV resistance using Applied Biosystems® kit, after first line failure. To qualify for testing patients should have HIV RNA above 5,000 copies/ml and be in use of ARV for at least 1 month. Mutation analysis was interpreted using the manufacturer's algorithm in accordance with the International Aids Society/USA database (last update on March 2009). Median age of this group was 7.6 years (IQR 6.3 to 10.5), the median age of initiation of first ARV regimen was 2.2 years (IQR 1.0 to 4.5). The median time of ARV exposure was 5.11 years (IQR 3.57 to 6.91). The ARV regimens were 2NRTI (18%), 3 NRTI (2.0%), 2NRTI+NNRTI (18%) and 2NRTI+PI (62%). At the time of the genotypic test, these patients had a median viral load of 4.2log copies/mL (IQR 3.7 to 4.6), and median CD4 count of 740 cells/mm³ (IQR 135 to 1771). Subtype B was the most prevalent subtype (76%). Of the patients, 84% has ≥ 2 TAM, 34 (69.4%) has T215F/Y, 26 (67.3%) M41L, 6 (12%) M184V. 9/9 (100%) exposed of NNRTI had mutations conferring resistance to NNRTI. The most common PI resistance mutation was D30N (57,1%) and L90M (39,3%). The use of the first ARV therapy in this pediatric population has resulted in a high level of resistance mutation,

predominantly against NRTI. This data indicate the need for an earlier resistance monitoring in order to guide appropriate selection of second-line therapy, and adherence intervention among children under ART treatment.

Introduction

Important differences distinguish the course of HIV infection in children compared with adults, including high peak viral loads during the first year of life and unique complications of HIV disease not seen in adults such as growth failure and severe motor cognitive delays (Cohen, Oram et al. 2002). Reduction in plasma HIV RNA below levels of detection is a primary marker of antiretroviral therapy success, generally leading to immune reconstitution, with improvement of clinical outcomes and limitation of emergence of mutations conferring drug resistance. Highly active therapy (HAART) has demonstrated impressive reductions in morbidity and mortality in children (Gupta, Gibb et al. 2009). However, many patients on routine clinical care experience sustained detectable viral replication despite use of potent combination antiretroviral therapy (Napravnik, Edwards et al. 2005). The main perceived risk associated with keeping viraemic patients on antiretrovirals (ARV) is the accumulation of HIV drug resistance mutations and hence the reduction in future drug options due to the cross-resistance induced by many mutations (Delaugerre, Warszawski et al. 2007). Few studies on emergence of resistance mutations in children were available in selected cohorts of limited size (Johann-Liang, Lee et al. 2000; Mullen, Leech et al. 2002; Machado, Lambert et al. 2004). Drug resistance prevalence in children may be different from those in adults, which

may influence current guidelines for therapeutic management (Englund, Raskino et al. 2004; Green, Gibb et al. 2006; Chakraborty, Smith et al. 2008). Resistance is a greater challenge in children, as they require longer-term therapy than adults.

The new World Health Organization recommendation states that all infants younger than 12 months of age with confirmed HIV infection could start ARV therapy, regardless of clinical or immunologic stage. This recommendation was partially based on recently published findings from the CHER study, will likely lead to further dramatic increases in the number of infants and children receiving treatment around the world (Violari, Cotton et al. 2008). With more children receive life-saving ARV in coming years, understanding the mechanism of ARVs resistance and the definition of the best moment of changing the ARVs for a second regimen will become increasingly important for clinicians worldwide.

An additional factor is limited drug availability for the pediatric population with only 14 of 21 licensed drugs available for adults are registered for pediatric use, and there are major formulation difficulties with most drugs (Shafer and Schapiro 2008; Gupta, Gibb et al. 2009). It is, therefore, essential that the limited range of drugs available for children are used effectively (Mullen, Leech et al. 2002).

The objectives of this study were, (1) to estimate the prevalence of antiretroviral drug resistance in HIV-1 infected children who failed the first antiretroviral therapy regimen; (2) to assess drug resistance profiles through genotyping in these children; (3) and to evaluate the virological, immunological and clinical response after the genotypic resistance test.

Methods

A retrospective study was conducted to investigate the pattern and the prevalence of drug resistance after the first virological failure in HIV-1 infected children at a referral center in Belo Horizonte, MG. Between January 2002 and December 2007, 162 genotypic test was performed at HIV-1 vertically infected children and 50 of 162 test was performed after first ARV regimen failure. Figure 1. All patients routinely underwent genotypic test for clinical purposes if they had a viral load rebound $> 5,000$ copies/mL or increased 0.5 log₁₀ of the viral load nadir before the current antiretroviral regime and be in use of ARV for at least 1 month, according to Brazilian Guidelines at this period. The decision to perform genotyping was made by the primary physician based on clinical and laboratory evidence of therapeutic failure. The virological and immunological response to the new treatment was evaluated at 6 and 12 months after the change of ARV schema.

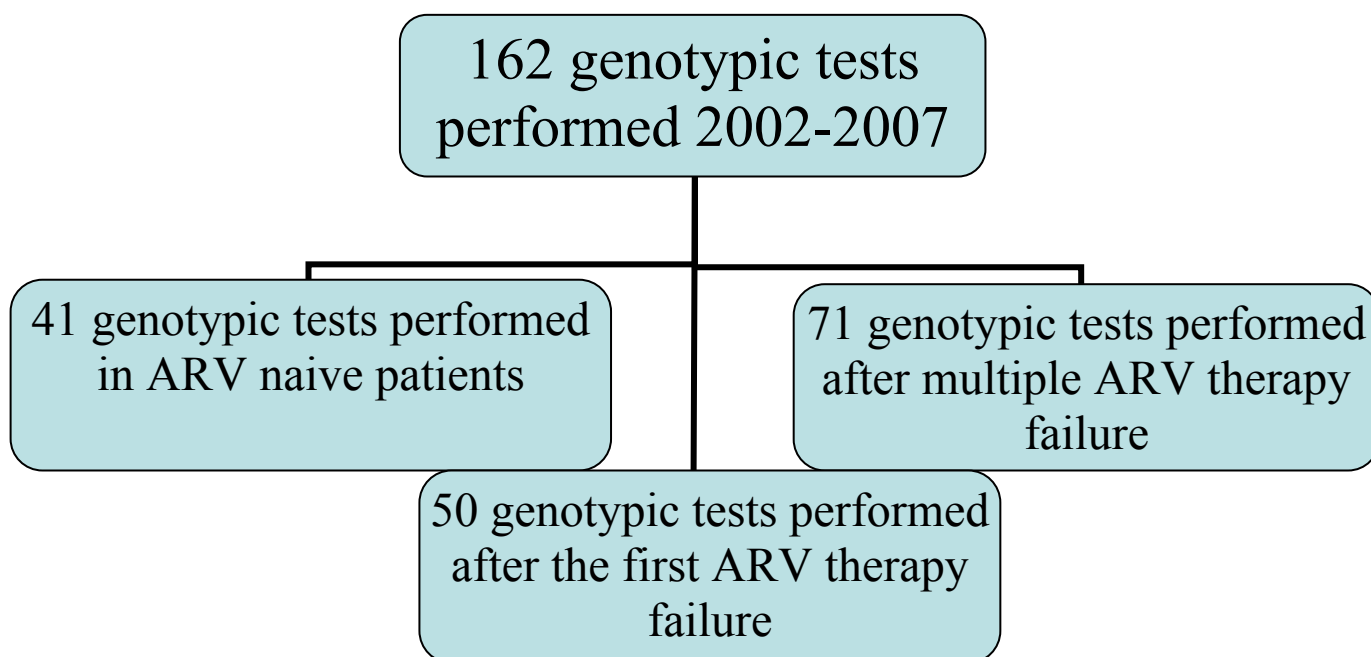


Figure 1: Fluxogram of genotypic tests performed in HIV infected children (<18 years old) during the period January 2002 until December 2007.

Virologic failure was defined as measurement > 0.5 log increase in viral load when pretreatment values was compared with after 24 week of treatment; or repeated detection of HIV RNA in patients who had undetectable levels prior to beginning therapy; or a persistent increase in HIV RNA levels after beginning of treatment greater than 3-fold in children aged two years or more, or greater than 5-fold in children under two years of age.

Combined antiretroviral (cART) was defined as at least two antiretrovirals nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTI), 2NRTI and 1 non-nucleoside reverse transcriptase reverse (NNRTI), 2NRTI and 1 protease inhibitor (PI) or 3 NRTIs. Drug changes, which were performed into the same class due to intolerance or side-effects, were considered as same ARV regimen.

The study was approved by the local Ethics Committee (UFMG, Brazil).

Eligible patients included HIV-infected children under the age of 18 for whom genotyping was performed between January, 2002 and December 2007, after the first-line ARV regimen. Participation criteria included known treatment and clinical and laboratory history and availability of genotypic test. The decision to alter antiretroviral therapy was made based on potential therapeutic options, clinical status, medication history, family preference and physician decision.

HIV-1 RNA Sequencing and Subtyping: Plasma samples were tested for antiretroviral drug resistance using the Viroseq HIV-1 genotypic assay (Applied Biosystems, Foster City, California, USA). The amino acid sequences of PR (positions 1 to 99) and RT (positions 1 to 335) genes were deduced from the nucleic acid sequences and compared to a subtype B consensus sequence from the Stanford HIV RT and PR sequence databases (<http://hivdb.stanford.edu/hiv/>). Drug resistance positions were defined by use of the International Aids Society/USA panel (last update on December 2008)(Johnson, Vezinet et al. 2008) and interpretation of genotypic drug susceptibility was done according to the HIV Drug Resistance Database- Stanford University (<http://hivdb.stanford.edu>).

HIV-1 viral subtypes were determined by phylogenetic analysis using the 1.3-kb final edited sequence (297 nucleotides from PR and the first 1,003 nucleotides from RT) with MEGA version 3.1 software, using the neighbor-joining method with Kimura's two-parameter model (Kumar, Tamura et al. 2004). For statistical analysis, this variable was expressed in two categories, HIV-1 subtype B and HIV-1 subtype non-B.

The major PI mutations were defined as amino acid changes at protease gene positions (PR) D30N, V32I, L33F/I, M46I/L, I47V/A, G48V, I50V, I54ML, Q58E, T74P, V82A/T/F/S, I84V, N88S and L90M and minor mutations at L10I/F/V/C/R, K20M/R, L24I, M36I/L/V, F53L/Y, L63P, A71V/T, G73C/S/T/A, V77I, and I93L/M. Mutations associated with reduced susceptibility to nucleoside/tide reverse transcriptase inhibitors (NRTIs) were defined as mutations at reverse transcriptase (RT) gene positions M41L, K65R, D67N, ins69, K70R/E, L74V, Y115F, M184V, L210W, T215Y/F, and K219Q, including the 151 complex. NNRTI included amino acid substitutions in RT gen positions L100I, K103N, V106A/M, V108I, Y181C, Y188C/L, G190A, P225H, and M230L.

Different resistance profile were studied: to any drug, to at least one drug of two classes, to at least one drug of three classes, to at least one NRTI, to at least one NNRTI, to at least one PI.

Data Collection: Demographics information and HIV history (including clinical manifestations, CD4 count and viral load profile) previous to ARV therapy were collected as baseline data through standardized medical records abstractions. Clinical follow-up was conducted and lab parameters were observed (CD4 count increased/decreased and viral load reduction) 6 and 12 months (+_ 2 months) after regimen change. Adherence was assessed by the physician set as constant yes or no.

Laboratory Data: Viral load was measured using quantitative RNA PCR branched chain DNA (bDNA) with a detection limit of 50 copies/ mL. Lymphocyte subsets were determined by flow cytometry.

Statistical Analysis: Statistical calculations were performed using the SPSS 12.0 statistical software package (SPSS, Chicago, IL, 1999). All

statistical calculations were performed with an alpha value of 0.05. We also compared the proportion of patients with genotypic mutations according to antiretroviral exposure at the time of genotyping.

Results

HIV genotyping was performed in 121 children and adolescents failing the ARV therapy between January, 2002 and December, 2007; 50 (41%) was performed after failing the first ARV therapy and 71 (59%) was performed after failing multiple ARV therapy.

The present data include the 50 patients who underwent genotyping at the time of treatment failure before switching to second line regimens, and only these patients are included in the subsequent analysis.

Antiretroviral regimens in use at the time of genotyping were 2NRTI plus 1 PI (62%), 2 NRTI (18%), 2 NRTI plus 1 NNRTI (18%) and 3 NRTI (2.0%). Among NNRTI, efavirenz was the major drug used (8/9), followed by nevirapine (1/9). Nelfinavir was the most frequently PI used (28/31), followed by ritonavir (3/31) and lopinavir/ritonavir (2/31). The previous and/or actual exposure to the different drugs is illustrated in Figure 2.

The number of genotypic test performed after the first ARV therapy has increased throughout the years (from 1 test in 2002 to 25 in 2007 - χ^2 trend $p = 0.03$). According to Figure 3, ARV regimens used in this population was initially double NRTI, but the triple therapy based on PI was the predominant after 1998.

Clinical and laboratory outcome:

The median age was 7.6 years (interquartile range -IQR 25-75%: 6.3 - 10.5), 24 patients (48%) was male, and 20 patients (40%) were classified as having CDC 94 clinical classification stage C at time the genotypic test was performed. The median age of initiation of first ARV regime was 2.2 years (IQR 25-75%: 1.0-4.5). The median time of ARV exposure was 5.11 years (IQR 25-75%: 3.57–6.91). ARV exposure was longer among patients on dual therapy probably due to licensed drug availability. Patients exposed to NNRTI were older than those exposed to dual/PI therapy. Table1.

Before genotyping test, patients had been on the virologically failing regimens for a median 3.3 years (IQR 25-75%: 2.1-4.7) or a persistently high viral load (≥ 10000 copies/ml) for a median 3.5 years (IQR 25-75%: 1.9- 4.7).

ARV regimen was changed in 48 (96%) patients after the genotypic test. The reasons for not change the ARV therapy were: one patient acquired good adherence and the viral load returns to undetectable levels and another patient stopped the ARVs after the genotypic test. Clinical and laboratorial data at 6 and 12 months after genotyping were available in 46 (92%) and 44 (88%) patients, respectively. None child has clinical progression developed opportunistic infection or has changed the CDC94 clinical classification during this period.

The difference between viral loads (\log_{10}), lymphocytes T CD4⁺ count (percentage) and Z-score for weight-age at the time of genotypic test, 6 and 12 months after changed ARV schema were showed in Figures 4a, 4b and 4c. Only 48% and 38% of the patients self reported good adherence at 6 and 12 months, respectively. The Wilcoxon test showed that the HIV viral load (log)

values were not statistically different only just when HIV viral load at 6 months was compared to HIV viral load at 12 months after changed the ARV regimen ($p= 0.926$). However, HIV viral load (log) was statistically different when compared with the HIV viral load at genotyping test with HIV viral load at 6 and 12 months after the new regimen ($p=0.000$ and $p=0.000$, respectively). There was a viral load improvement, 52% of patient had indetectable viral load ($VL<50$) at 6 months and 46% at 12 months. However, the Wilcoxon test showed that the CD4 lymphocyte count (percent) values were not statistically different when CD4 at the time of genotyping test was compared with CD4 at 6 and 12 months after the new ARV regimen ($p=0.150$). The median of CD4 percentuals were 27.9% (IQR25-75%: 20 -34) and 29.5% (IQR 25-75%:29.5-34.8) at 6 and 12 months, respectively. The Wilcoxon test showed that the Z-score for weight-age values were not statistically different when Z-score at genotyping test was compared with Z-score at 6 and 12 months after changed the ARV regimen ($p=0.170$).

Genotypic Resistance Patterns:

The prevalence of drug resistance mutations was relatively high: the percentage of Thymidine Analogues Mutations (TAMs) was 84% (42/50). The median of TAM was 3 (IQR 25 - 75%: 2 - 4) for all population, and did not differ when compared to ARV regimen used: 2.8 (IQR 25 - 75%: 2 - 4) for 2NRTI group; 2.0 (IQR 25 - 75%: 0 – 3.5) for 2NRTI and NNRTI group and 3.3 (IQR 25 - 75%: 2 - 4) for 2NRTI and PI group ($p= 0.60$).

It was observed the following NRTI's mutations: M41L (51%), L210W (28.6%), T215F/Y (67.3%), M184V (16%). A total of 38% had virus with

mutations indicative of the TAM-1 pathway (M41L, L210W and T215Y), whereas 16% had virus mutations indicating the TAM-2 pathway (67N, 70R, T215F, and 219Q, R or E) and 22% presented virus mutations common to both pathways (TAM-1 and TAM-2). No patient harbored viruses with multiple NRTI resistance driven by the Q151M complex or by 69 insertion complex. The K65R was not found in any patient.

All patients receiving NNRTI at baseline had at least one mutation to this class of antiretroviral: 71.4% of patients had the K103N mutation, 2.0% of patients had the G190A/C and one patient presented with the A98G and the Y188L.

Among all patients that underwent the genotypic test, 56% (28/50) had at least one major mutation (median 1 (IQR 25-75%: 0 – 2)) to PI and in 96% (48/50) at least one minor mutation to PI was presented (median 5 (IQR 25-75%: 2 - 8)). Nelfinavir was the most frequently PI used (85%), D30N and L90M were presented in 57.1% and 39.3%, respectively.

There are no difference on resistance patterns among patients receiving their first HAART regimen (2 NRTI plus PI or NNRTI) and those with 2NRTI or 3 NNRTI regimens.

Subtype B was the most prevalent (76%); 18% subtype F and 2% subtype C. The number of resistance mutations detected, subtype B and TAM pathway were not statistically different throughout the years (χ^2 trend $p > 0.05$). The figure 5 shows the prevalence of the overall resistance mutations according to subtypes B and non-B ($p > 0.05$).

Wild-type virus at three drug classes was detected in three cases (3 of 50, 6.0%) and virus resistance to all NRTI drugs was detected in 8 cases (16%).

The proportion of drug resistance to any drugs was 92% (Fig 6) and resistance ranged by drug class from 76.6% to NRTI, to 61.7% to PI and 20% to NNRTI. The proportion of resistance to at least one drug of two and three classes was 58% and 4%, respectively. The prevalence of resistance to NRTIs, NNRTIs and PIs according to the Stanford University- HIV drug resistance database (<http://hivdb.stanford.edu>) is shown in figure 7.

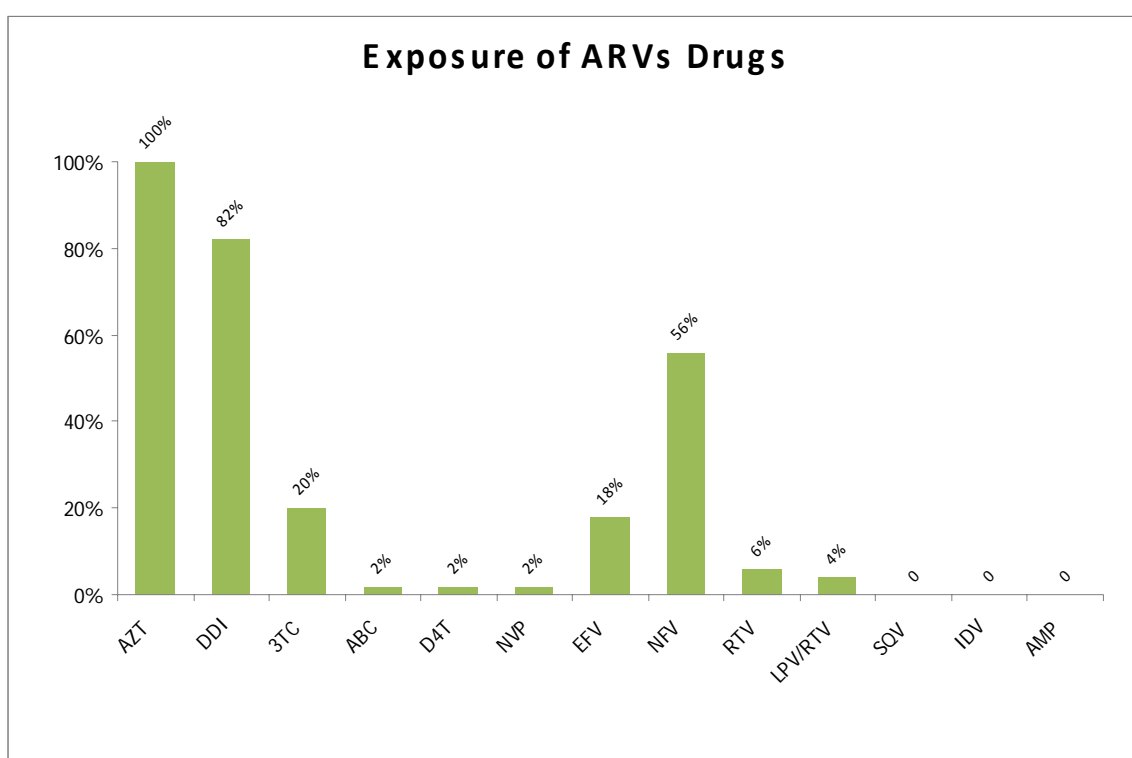


Figure 2. Antiretroviral exposure before genotypic test in a pediatric cohort.

(AZT indicates zidovudine; DDI, didanosine; 3TC, lamivudine; D4T, stavudine; ABC abacavir; TDF, tenofovir; EFV, efavirenz; RTV, ritonavir; LPV, lopinavir.)

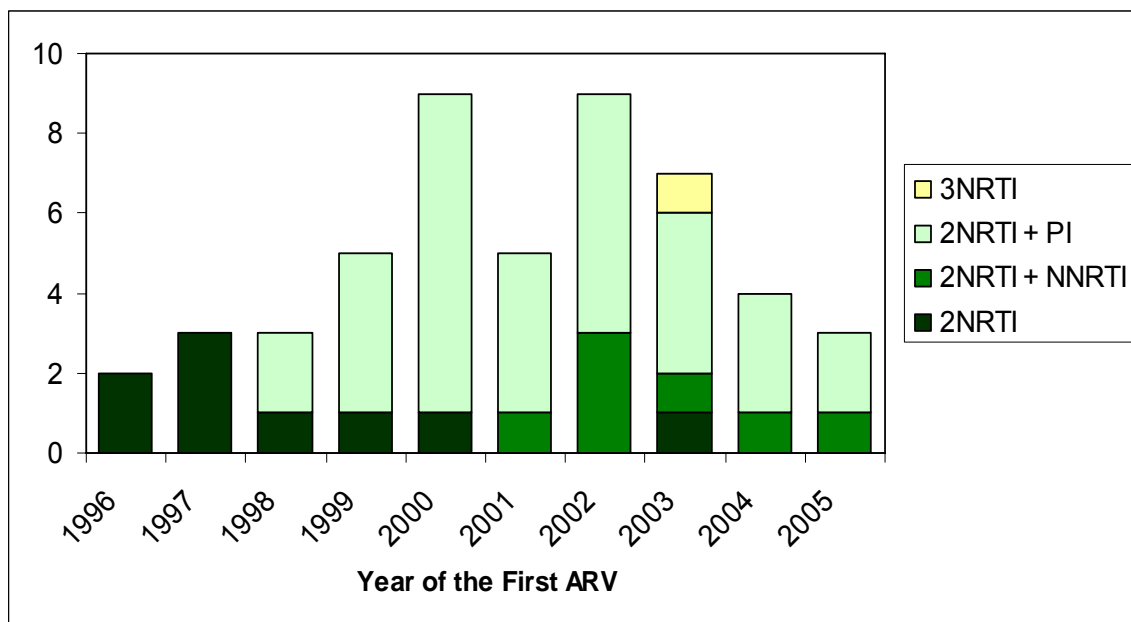


Figure 3. Evolution of antiretroviral regimen used during the period of 96 to 2005.

Table 1: Clinical, Immunological and Virological Characteristics of 50 Patients according to ARV Regimen at Genotypic Test

Characteristics	Overall (n=50)	2NRTI or 3NRTI (n= 10)	2NRTI + 1NNRTI (n=9)	2NRTI + 1PI (n=31)	Statistic
Sex, male (%)	24 (48.0)	4 (40)	5 (55.6)	15 (48.4)	$p = 0.793$
Median age (in years) at initiation of ARV regimen (IQR 25-75%)	2.2 (1.0-4.5)	2.2 (1.2-4.4)	4.9 (3.2-7.2)	1.5 (0.9-4.1)	$p = 0.026$
Median age (in years) at GRT (IQR 25-75%)	7.6 (6.3-10.5)	9.1 (5.9-12.3)	8.5 (7.5-11.3)	6.8 (6.1-8.4)	$p = 0.060$
CDC Classification (%)					
A1-A3	6 (12)	0	1 (11.1)	5 (15.6)	
B1-B3	24 (48)	7 (70)	7 (77.8)	10 (31.3)	
C1-C3	20 (40)	3 (30)	1 (11.1)	17 (53.1)	
HIV-1 Subtype (%)					
Subtype B	38 (76)	7 (70)	7 (77.8)	24 (77.4)	$p = 0.710$
Non-B Subtype	12 (24)	3 (30)	2(22.2)	07 (22.6)	
Median age (in years) of ARV exposure (IQR 25-75%)	5.1 (3.6-6.9)	7.8 (6.2-10.1)	4.1 (3.1-5.9)	4.7 (3.2-6.7)	$p = 0.004$
Virologic Failure - VL \uparrow \geq 0.5log (%)	44 (88)	7 (70)	9 (100)	28 (90.3)	$p = 0.108$
Virologic Failure – VL \geq 10000 copies/mL (%)	40 (80)	6 (60)	7 (77.8)	27 (87.1)	$p = 0.173$
Median time (years) in virologically failure defined as VL \uparrow \geq 0.5log until GRT (IQR 25-75%)	3.3 (2.1-4.7)	5.0 (2.4-5.8)	3.1 (1.7-4.4)	3.2 (2.1-4.2)	$p = 0.510$
Median time (years) in virologic failure defined as VL \geq 10000 until GRT (IQR 25-75%)	3.5 (1.9-4.7)	4.7 (2.9-7.4)	3.1 (1.8-4.1)	3.1 (1.4-4.8)	$p = 0.189$
Viral Load during ARV regimen (%)					
< 50 copies/mL	12 (24)	2 (20)	1 (12.5)	9 (28.1)	
< 1000 copies/mL	28 (56)	5 (50)	6 (75.0)	17 (53.1)	

ARV: antiretroviral; NRTI: nucleoside (tide) reverse transcriptase inhibitors, NNRTI: Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors, PI: protease inhibitor, IQR: interquartile range, CDC: classification CDC, VL: viral load, GRT: Genotypic Resistance Test

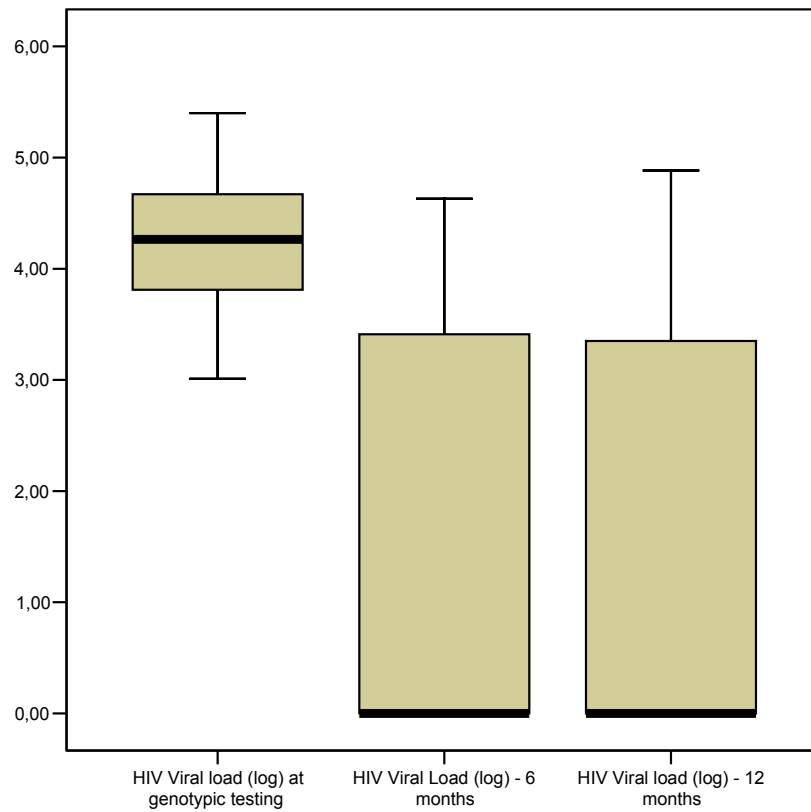


Figure 4a: Boxplot of HIV-1 viral load (log) at different times: genotypic test, 6 and 12 months after changed the ARV regimen. Friedman test - $p < 0.001$

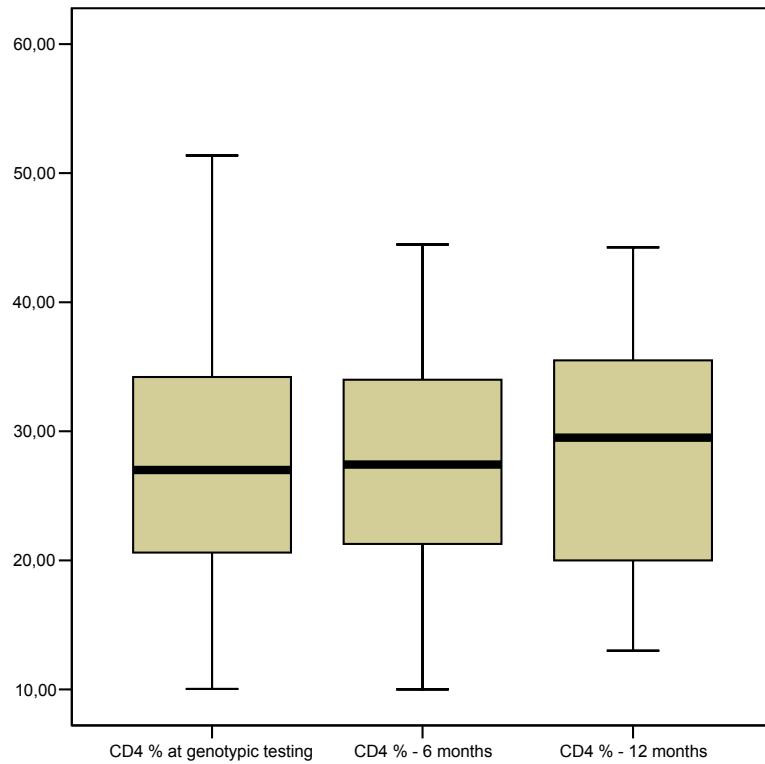


Figure 4b: Percentual of CD4 levels at different times: genotypic test, 6 and 12 months after changed the ARV regimen. Friedman test – $p=0.150$

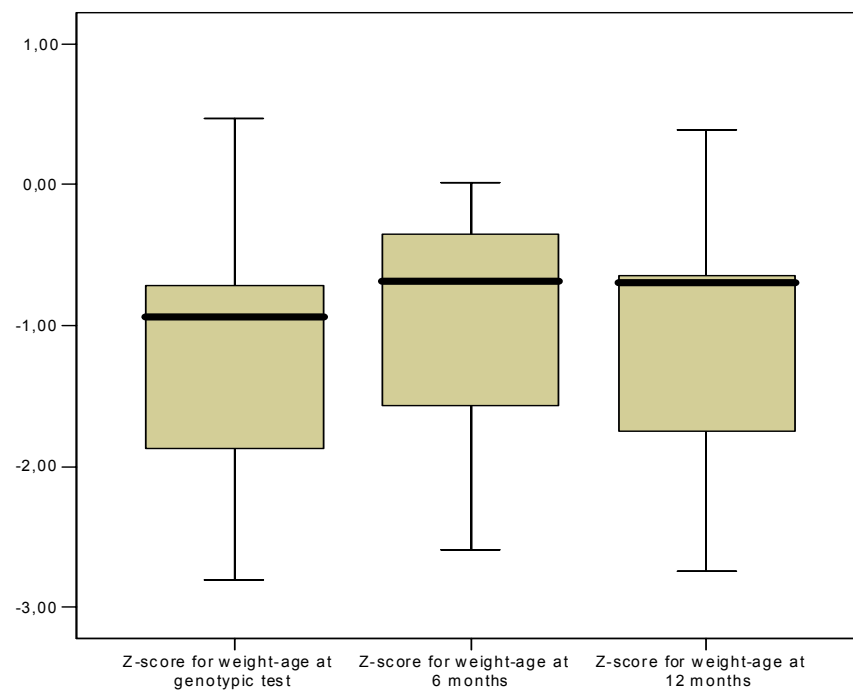


Figure 4c: Boxplot of Z-score for weight-age at different times: genotypic test, 6 and 12 months after changed the ARV regimen. Friedman test – $p= 0.170$

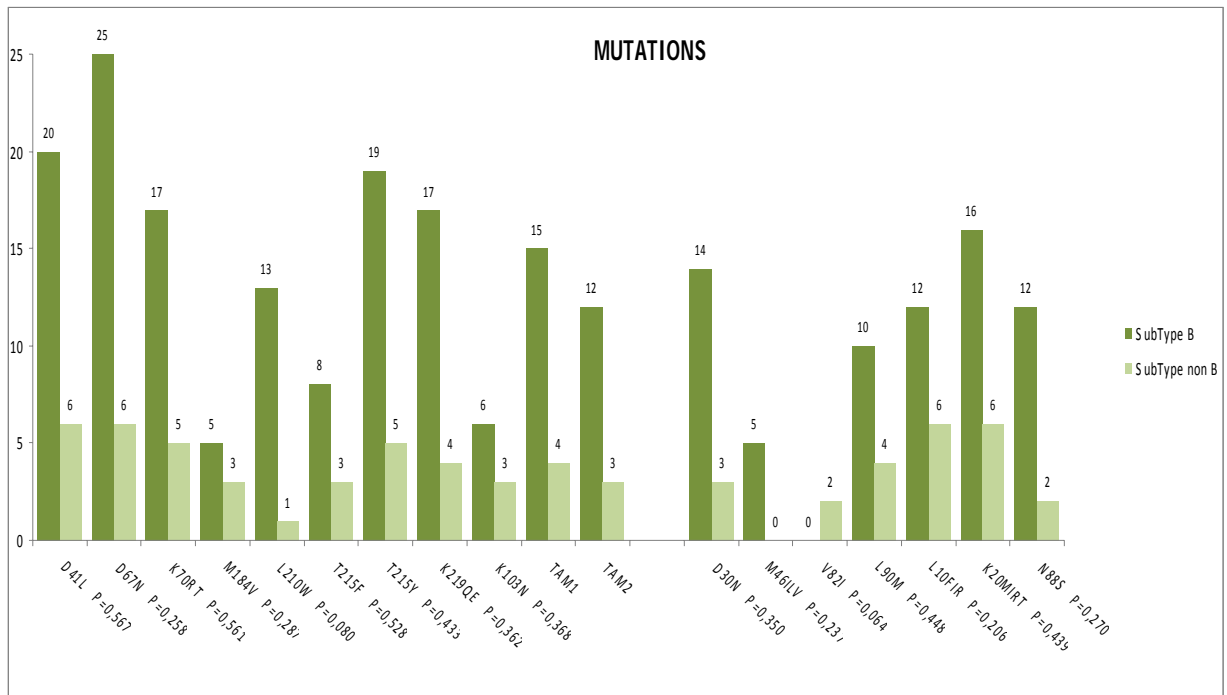


Figure 5: Prevalence of resistance mutations according to Subtypes B or non-B.

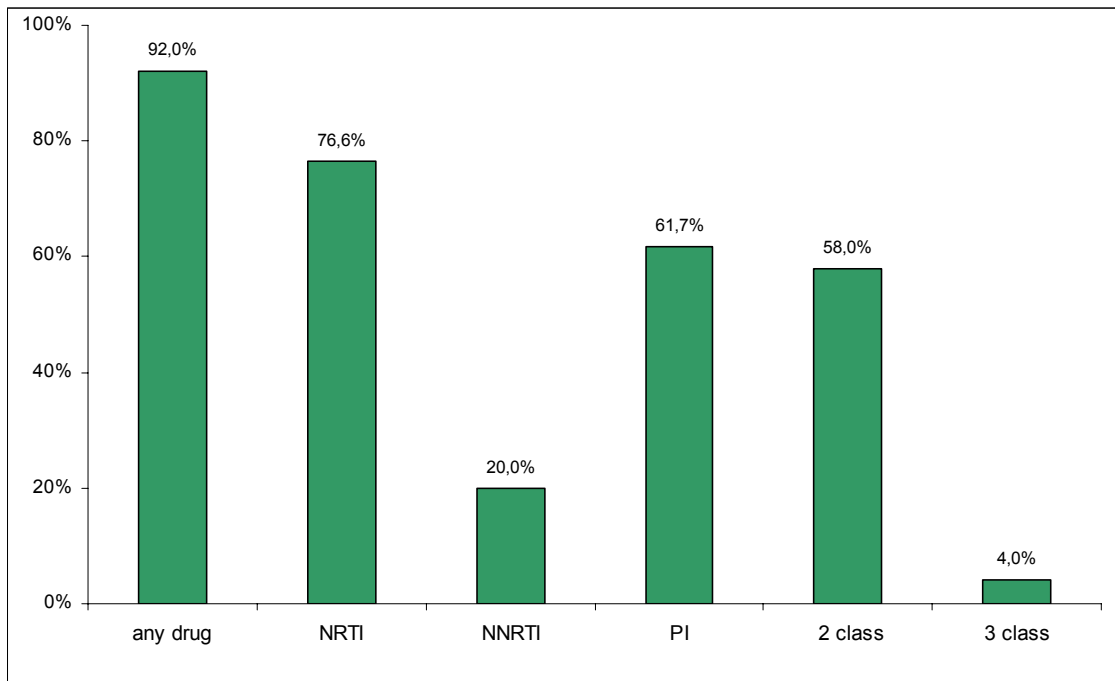


Fig. 6. Prevalence of drug resistance after first virologic failure in children HIV-1 infected.

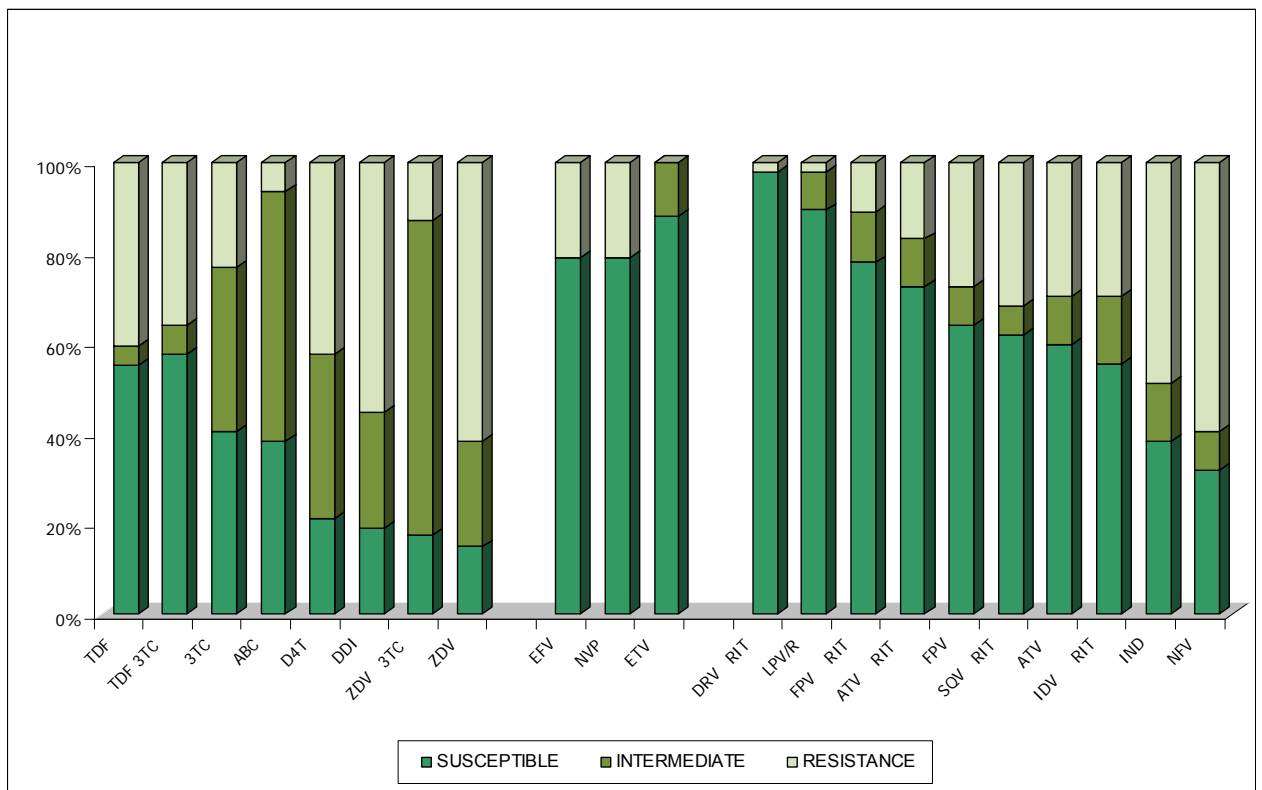


Figure 7: The prevalence of resistance to antiretroviral drugs according to Stanford University – HIV drug database.

Discussion

This study showed that the use of the first ARV therapy in pediatric population has resulted in a high level of resistance mutations, with a variable pattern of mutations, predominantly against NRTI, despite the limited sample size. Other Brazilian studies found similar resistance rates (Machado, Lambert et al. 2004; Machado, Fernandes et al. 2005; Almeida, Berezin et al. 2009). Lack of a consistent adherence measure is a limitation of our study. This data indicated the need for an earlier resistance test in order to guide appropriate selection of second-line therapy, adherence intervention among children under ART treatment.

Drug resistance commonly occurs secondary to a number of factors and tends to be most prominent in the youngest children (Chen and Aldrovandi 2008). Young children have very high HIV-1 RNA levels and tend to have lower suppression rates on ARV therapy than adults (Green, Gibb et al. 2006). High rates of virus replication are sustained for a more prolonged period following perinatal infection with only a gradual decline in HIV load during the first few years of life. As a consequence, virological set points tend to be higher in children compared to adults. Nonetheless, children receiving ARV frequently experience rises in CD4 cells count, even in the absence of full virological suppression in plasma (discordant response). This immune repopulation in the presence of viral replication may increase the risk of emergence of drug resistant viral variants (De Rossi 2004). Guidelines on resistance testing in HIV-1 infected children are limited by a paucity of studies (Gupta, Gibb et al. 2009).

The high prevalence of drug resistance in our study is likely to result from the long therapeutic history of the patients, with frequent initiation of treatment

with dual therapy, high rates of virus replication, with selection of resistance to NRTI followed by the selection of resistance to other classes of drugs, and with the use of unboosted PIs characterizing the early highly active antiretroviral therapy (HAART) era. The presence of TAMs was high (84%) and we found TAM-1, TAM 2 and mixed patterns of mutations. TAM-1 confers resistance to zidovudine and stavudine and cross-resistance to multiple NRTIs, whereas the resistance conferred by TAM-2 is usually limited to zidovudine and stavudine.(Shafer and Schapiro 2008)

Our findings are similar to others studies. In this regard, Cozzi-Lepri et al (Cozzi-Lepri, Phillips et al. 2007) showed that in patients who were kept on the same virologically failing ARV regimen (> 400 copies/ml) for a median of 6 months of therapy failure, there was considerable accumulation of drug resistance mutation and 77% of patients acquired one or more mutations over an average follow-up of 6 months and a loss of 1.25 antiretroviral drugs. Napravnik and colleagues (Napravnik, Edwards et al. 2005) also showed that the rate of accumulation of resistance was greater in people who had a steeper increase in viral load over the follow-up. Moreover, the first generation of PI as nelfinavir, mainly used in HIV pediatric population, was less potent and had lower resistance genetic barriers than newer PIs, particularly the boosted PI. In trials performed in adult naïve patients, comparing to the use of PI-boosted regimen, failure to nelfinavir-including regimen led to an accumulation of resistance mutation in gene and also in RT gene when virus replicating while in therapy (Delaugerre, Warszawski et al. 2007). Chakraborty, et al. showed that only 21% of those with a detectable viral load measurement while receiving HAART had a resistance test undertaken. Extensive 3-class resistance was

noted in a significant proportion of resistance test (12%), which is higher than the level observed in adults in UK - 5% (Chakraborty, Smith et al. 2008). Marconi, et al demonstrated the presence of at least one major drug resistance mutation from more than 83% of patients (Marconi, Sunpath et al. 2008).

The COHERE study showed that children aged at least 6 years, adolescents and young adults were less likely to experience a virological response than older individuals. In addition, children aged less than 6 years had a poorer initial virological response to treatment. Impaired virological responses may lead to the emergence of drug-resistant virus, the consequences of which are particularly important for children and adolescents who will need to receive antiretroviral therapy for the life and whom preservation of treatment options is essential.

Drug resistant HIV -1 has become a major concern in antiretroviral therapy because of its clinical and public-health impact (Englund, Raskino et al. 2004). Englund et al, showed that pediatric patients on NRTI therapy developed mutations linked to NRTI resistance, which correlated with an increased risk of HIV associated clinical disease progression ($p= 0.039$). An association between high degree of class wide resistance and poorer survival has been reported in the literature (Zaccarelli, Tozzi et al. 2005). Zaccarelli, et al reinforced the concept that ongoing viral replications and few residual treatment options are associated with an increased probability of disease progression. The major contribution to the effect of drug resistance on disease progression was from NRTI, with some effect of NNRTI drugs and less-significant effects for PI drugs (Zaccarelli, Tozzi et al. 2005). In our study, no child has developed opportunist infection during the period of follow-up, the z-score for weight-age and CD4

perceptual were not statistically different but the short follow-up period could contribute for this result.

The PERA study (Green, Gibb et al. 2006) showed no statistically significant evidence of a difference in virological response to ARV regimen chosen by pediatricians with and without the aid of a genotypic test. However, this study population had high exposure to main NRTI and exploratory analyses did suggest that the greatest benefit to resistance testing was in the subgroup of children exposed to fewer ART drugs in the past. Cohen, et al showed that HIV genotyping did not improve the virologic outcome of heavily antiretroviral agent-experienced children and adolescents infected with HIV (Cohen, Oram et al. 2002). In our study, there was an improvement in the virological outcome, but only 52% and 46% of patients had the viral load suppressed at 6 and 12 after the new ARV regimen, respectively.

There are few studies of first-line NNRTI-based HAART in children from settings with viral load monitoring and resistance testing (Mullen, Leech et al. 2002; Agwu, Lindsey et al. 2008). This study showed that all patients exposed to the NNRTI, acquired resistance to this class. Mullen et al and Agwu et al. found a higher prevalence of resistance rates than those in adults that probably reflects the delay in switching the therapy. Genotypic resistance testing following virological failure in adults has been showed to lead to modest virological benefits.(Gupta, Gibb et al. 2009)

The extensive drug resistance found at our study is typical for HIV-1 infected children and adults who begin therapy with incompletely suppressive non-HAART or unboosted PI based regimen. The high level of resistance observed in children failing first-line therapy is of particular concern because of

the limited future treatment options in the setting of young age, and the longer need for ARV compared to adults.

The limitations of our study reflect current conditions in routine clinical practice compared with a controlled study environment and illustrate many of the problems associated with patient care.

In conclusion, our results revealed an extensive profile of resistance in children failing their first ARV regimen, with 92% of the samples showing resistance at least one drug. The availability of more effective and better tolerated combination regimens is always needed in HIV-infected children to avoid therapeutic failure and sequential therapy. The management of HIV-1 infected children became increasingly complex as more children develop extensive multiclass resistant virus. In addition, testing should be initiated promptly during virologic failure.

References

- Agwu, A., J. C. Lindsey, et al. (2008). "Analyses of HIV-1 drug-resistance profiles among infected adolescents experiencing delayed antiretroviral treatment switch after initial nonsuppressive highly active antiretroviral therapy." *AIDS Patient Care STDS* **22**: 545-552.
- Almeida, F. J., E. N. Berezin, et al. (2009). "Diversity and Prevalence of Antiretroviral Genotypic Resistance Mutations Among HIV-1-Infected Children." *J Pediatr* **85**(2): 104-109.
- Chakraborty, R., C. J. Smith, et al. (2008). "HIV-1 Drug Resistance in HIV-1 Infected Children In The United Kingdom From 1998 to 2004." *The Pediatric Infectious Disease Journal* **27**(5): 457-9.
- Chen, T. K. and G. M. Aldrovandi (2008). "Review of HIV Antiretroviral Drug Resistance." *The Pediatric Infectious Disease Journal* **27**(8): 749-752.
- Cohen, N. J., R. Oram, et al. (2002). "Response to changes in antiretroviral therapy after genotyping in human immunodeficiency virus-infected children." *The Pediatric Infectious Disease Journal* **21**(7): 647-53.
- Cozzi-Lepri, A., A. N. Phillips, et al. (2007). "Evolution of Drug Resistance in HIV-Infected Patients Remaining on Virologically Failing Combination Antiretroviral Therapy Regimen." *AIDS* **21**(6): 721-732.
- De Rossi, A. (2004). "Virological and Immunological response to antiretroviral therapy in HIV-1 infected children: genotypic and phenotypic assays in monitoring virological failure." *New Microbiology* **27**: 45-50.
- Delaugerre, C., J. Warszawski, et al. (2007). "Prevalence and Risk Factors Associated with Antiretroviral Resistance in HIV-1 Infected Children." *Journal of Medical Virology* **79**: 1261-1269.
- Englund, J., C. Raskino, et al. (2004). "Mutations linked to drug resistance, human immunodeficiency virus type 1 biologic phenotype and their association with disease progression in children receiving nucleoside reverse transcriptase inhibitors." *Pediatric Infectious Disease Journal* **23**(1): 15-22.
- Green, H., D. M. Gibb, et al. (2006). "A randomized controlled trial of genotypic HIV drug resistance testing in HIV-1 infected children: the PERA (PENTA 8) Trial." *Antiviral Therapy* **11**(7): 857-867.
- Gupta, R. K., D. M. Gibb, et al. (2009). "Management of Paediatric Hiv-1 resistance." *Current Opinion in Infectious Diseases* **22**: 256-263.
- Johann-Liang, R., S. Lee, et al. (2000). "Genotypic characterization of human immunodeficiency virus type 1 isolated from vertically infected children with antiretroviral therapy experience." *Pediatric Infectious Disease Journal* **19**(4): 363.
- Johnson, V. A., F. B. Vezinet, et al. (2008). "Update of the Drug resistance Mutations in HIV-1: December 2008." *Topics in HIV Medicine* **16**(5): 138-145.
- Kumar, S., K. Tamura, et al. (2004). "MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and Sequence alignment." *Brief Bioinform* **5**(2): 150-163.
- Machado, D. M., S. C. Fernandes, et al. (2005). "Analysis of HIV-Type 1 Protease and Reverse Transcriptase in Brazilian Children Failing Highly

- Active Antiretroviral Therapy (HAART)." Rev Inst Med trop S. Paulo **47**(1): 1-5.
- Machado, E. S., J. S. Lambert, et al. (2004). "Genotypic Resistance and HIV-1 Subtype in Brazilian Children on Dual and Triple Combination Therapy." Journal of Clinical Virology **30**(2004): 24-31.
- Marconi, V. C., H. Sunpath, et al. (2008). "Prevalence of HIV-1 Drug Resistance after Failure of a First Highly Active Antiretroviral Therapy Regimen in KwaZulu Natal, South Africa." Clinical Infectious Disease **46**: 1589-1597.
- Mullen, J., S. Leech, et al. (2002). "Antiretroviral Drug Resistance Among HIV-1 Infected Children Failing Treatment." Journal of Medical Virology **68**: 299-304.
- Napravnik, S., D. Edwards, et al. (2005). "HIV-1 Drug Resistance Evolution Among Patients on Potent Combination Antiretroviral Therapy With Detectable Viremia." Journal Acquir Immune Defic Syndr **40**(1): 34-40.
- Napravnik, S., D. Edwards, et al. (2005). "HIV-1 Drug Resistance Evolution Among Patients on Potent Combination Antiretroviral Therapy With Detectable Viremia." J Acquir Immune Defic Syndr **40**(1): 34-40.
- Shafer, R. W. and J. M. Schapiro (2008). "HIV-1 Drug Resistance Mutations: an Updated Framework for the Second Decade of HAART." AIDS Reviews **10**: 67-84.
- Violari, A., M. F. Cotton, et al. (2008). "Early Antiretroviral Therapy and Mortality among HIV-Infected Infants." The New England Journal of Medicine **359**(21): 2233-2244.
- Zaccarelli, M., V. Tozzi, et al. (2005). "Multiple drug class-wide resistance associated with poorer survival after treatment failure in cohort of HIV-infected patients." AIDS **19**(10): 1081-1089.

Considerações Finais

Desde 2000, trabalhando no atendimento ambulatorial de pacientes infectados pelo HIV, acumulei o conhecimento e a compreensão da enfermidade e suas consequências para as crianças e seus familiares. No atendimento e no acompanhamento diário de suas dificuldades pude perceber que a infecção pelo HIV é apenas uma parte da complexidade de viver e crescer com uma doença crônica.

Toda doença crônica exige cuidados e acompanhamentos constantes. O preconceito, tão presente na nossa sociedade, que a criança e seus familiares vivenciam, dificultam a aceitação da doença e tornam os cuidados essenciais que a doença requer, mais penosos. O HIV, devido sua complexidade, demanda maior controle clínico e laboratorial. E, como toda doença crônica, o mais importante é o uso correto das medicações, manter uma boa adesão por longos períodos. Em estudo realizado entre 2002/2004 (FERREIRA, 2004), pude observar a dificuldade dos pacientes e seus familiares em manter a adesão diariamente. Neste estudo, conclui que os pacientes que conseguiram manter uma boa adesão tinham uma melhor resposta clínica, imunológica e virológica a longo prazo.

A partir de 2005, após treinamento realizado pelo Ministério da Saúde - RENAGENO, tornei-me Médica de Referência em Genotipagem (MRG). Este conhecimento tornou-se mais sistematizado e com os dados apresentados neste estudo podemos afirmar que outro fator de preocupação crescente é a presença de mutações cada vez mais frequentes levando a resistência aos antirretrovirais. A literatura especializada, apesar de abrangente para a população adulta é bastante restrita para a população pediátrica. Com este

estudo conseguimos mensurar a prevalência da resistência aos antirretrovirais na população pediátrica. Mais estudos serão necessários para avaliar suas consequências no acompanhamento clínico e laboratorial.

A obtenção destes resultados referendam a continuidade desta linha de pesquisa e permitem sugerir investigações futuras:

- prevalência de resistência em todos os pacientes que realizaram o exame de genotipagem;
- avaliar qual o melhor momento da troca antirretroviral durante a falha terapêutica;
- prevalência de resistência e risco de progressão da doença;
- avaliar a sobrevida destes pacientes.

ANEXOS