

**ROSANGELA RODRIGUES**

**Avaliação da reconstituição do sistema imune em pacientes  
infectados pelo HIV-1 em uso de terapia  
anti-retroviral combinada**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da  
Universidade de São Paulo para obtenção do  
título de Doutor em Ciências  
Área de concentração: Patologia

Orientador: Prof. Dr. Alberto José da Silva  
Duarte

São Paulo  
2004

## DEDICATÓRIA

*Aos meus pais,  
Sr. Carlos e D. Francisca,  
pela humildade e sabedoria de me  
mostrarem que o caminho da vitória  
é a educação, o trabalho,  
e o amor a Deus.*

## **AGRADECIMENTOS**

*Ao Dr. Alberto, responsável por minha decisão em iniciar a pós-graduação e pela honra de ter sido meu orientador, meu respeito e gratidão;*

*Aos pesquisadores Jorge, Dewton, Gil, Maria e Carmem, meu reconhecimento e gratidão;*

*Aos colegas de pesquisa Shirley, Carla, Carol, Paula, Patrícia, Pati, Analice, Milena, Niraldo, Jefferson, Anderson, Milton, Wagner, Rosa, Michelangelo e todos aqueles que conheci, meu companheirismo e carinho;*

*Aos colegas Fabio, Ana Paula, Ana Cristina, Luiz Augusto, Claudio, Alexandre e Marcelo meu estímulo a continuarmos acreditando na Medicina;*

*Às colegas Noemia e Dra. Vera, um agradecimento especial pela realização dos exames de CD4 e Viremia plasmática, elementos importantes desta tese;*

*Aos colegas Rosangela, Priscila, Olivete, Edna, Odair, Daniel, Thomas, Sr. Elias, minha gratidão por todo carinho que sempre recebi;*

*Às Diretorias e aos colegas de trabalho do Instituto Adolfo Lutz, com quem tenho compartilhado minha vida profissional, meu obrigada e o compromisso de dedicação;*

*À Luis Brígido, que sempre me incentivou com apoio e amizade a persistir nessa luta pelo conhecimento científico, minha sincera gratidão;*

*Aos meus familiares Rejane, Roberto, Ceicinha, Rodrigo, Rodolfo, Rafael, Patrícia, Paula, Carol, Deise e René, meu amor;*

*Aos meus amados pais, Sr. Carlos e D. Francisca, o meu tudo pois jamais teria resistido a todas as dificuldades, sem a dedicação e o amor infinitos, em cada momento da minha vida;*

*Aos meus pacientes e à todos aqueles que de alguma forma me motivaram e possibilitaram a realização deste estudo, meu amor e dedicação;*

*Ao meu Deus todo poderoso e a Jesus Cristo, todo o meu espírito em louvor !*

## SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	2
AGRADECIMENTOS	3
SUMÁRIO	5
RESUMO	6
SUMMARY	7
1 INTRODUÇÃO	8
2 OBJETIVOS	30
3 CASUÍSTICA E MÉTODOS	31
4 RESULTADOS	41
5 DISCUSSÃO	47
6 CONCLUSÕES	62
TABELAS E FIGURAS	64
REFERÊNCIAS	86

## RESUMO

O alvo da terapia anti-retroviral em pacientes com infecção pelo HIV-1 é a completa supressão da replicação viral, reconstituição imunológica e benefício clínico. Apesar das diferentes combinações terapêuticas de alta atividade, somente em parte dos pacientes a viremia plasmática consegue ser mantida em níveis indetectáveis. Realizamos um estudo observacional de outubro de 1987 à fevereiro de 2001 em uma coorte 148 indivíduos infectados pelo HIV-1, em uso de terapia anti-retroviral, acompanhados no Ambulatório LIM-56 da FMUSP, avaliando padrões de resposta imunológica clínica e virológica. Quantificação de HIV-1 RNA plasmático, de linfócitos TCD4, genotipagem do HIV, parâmetros inflamatórios e eventos clínicos foram observados em um período de 251 semanas. Os pacientes foram estratificados após 179 semanas de terapia monitorada em três grupos de resposta virológica: Avirêmicos (HIV RNA plasmático <500 cópias/mL, supressão completa); Virêmicos (HIV RNA plasmático >500 cópias/mL, viremia mantida) e Virêmicos Atenuados (HIV RNA plasmático >500 cópias/mL, com redução >1 log<sub>10</sub>, supressão virológica parcial). Este estudo observou melhor progressão clínica e imunológica no grupo Avirêmico, mas o grupo Virêmico Atenuado mostrou significativo ganho de linfócitos TCD4 (p<0.013) e menor número de casos com evolução para Aids (p<0.001) comparado ao grupo Virêmico. Velocidade de eritrossedimentação se mostrou associada a evolução favorável e poderia ser avaliada como parte de algoritmos de manejo clínico em locais com recursos limitados.

## SUMMARY

The goal of antiretroviral therapy is clinical benefit, through the suppression viral replication and the immunological reconstitution of HIV-1 infected patients. In spite of availability of different highly active antiretroviral therapy only some patients sustains undetectable plasma viremia. We conducted an observational study from October 1987 to February 2001 on immunological and clinical outcome of 148 HIV-1-infected patients from an open clinical cohort at São Paulo University, Brazil. The median TCD4 at starting first monitored regimen was 227 cells/uL, with 65% of patients previously exposed to ARV regimens, mostly to dual therapy. Virological response and clinical outcome to, after a median period of 179 weeks of monitored antiretroviral therapy, patients was classified in three groups, as Aviremic (HIV RNA plasma <500 copies/mL); Viremic (current HIV RNA plasma at historical levels) and Viremic Attenuated (HIV RNA plasma >500 copies/mL, but >1 Log viral suppression). TCD4 cells count, HIV RNA plasma, HIV-1 *pol* sequencing, inflammatory parameters and clinical events were analyzed in 251 weeks of follow up.

This study observed better clinical and immunological response in Aviremic group, but Viremic Attenuated group shows a significant TCD4+ cells gain ( $p < 0.013$ ) and less number of cases progressing to AIDS ( $p < 0.001$ ) compared to Viremic group. Elevated erythrocyte sedimentation rate was associated to progression of disease and may contribute in surrogate algorithms for HIV antiretroviral therapy management in lower economic settings.

## 1 INTRODUÇÃO

A Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (Aids) foi identificada em 1981 pelo Center for Disease Control nos Estados Unidos a partir da notificação dos primeiros casos de pneumonia por *Pneumocystis carinii* e Sarcoma de Kaposi em homossexuais masculinos, previamente saudáveis (MMWR, 1981). Em 1983 foi descrito o agente etiológico da Aids, o Vírus da Imunodeficiência Humana Tipo 1 (HIV-1), (Barré-Sinoussi, 1983). A Aids caracteriza-se por um severo quadro de imunossupressão com alto grau de morbidade e mortalidade.

Estima-se que 40 milhões de pessoas estejam infectadas pelo HIV-1 no mundo (UNAIDS, 2003). O Programa Nacional de DST/Aids do Ministério da Saúde do Brasil relata um total de 257.780 notificações de casos de Aids até dezembro de 2002 (Boletim Epidemiológico de AIDS, 2002).

O Brasil atingiu metas importantes no combate à infecção pelo HIV, como redução significativa dos índices de morbidade e mortalidade, conseguindo um controle parcial da expansão da epidemia. As estratégias públicas de saúde aos portadores da infecção, com a garantia de acesso aos principais testes laboratoriais e aos medicamentos anti-retrovirais trouxeram ao Brasil o reconhecimento internacional por suas conquistas nas áreas científica, tecnológica, ética e social.

De acordo com a classificação da Associação Internacional de Virologia, o HIV-1 pertence à família *Retroviridae*, gênero *Lentivirus*. Dois



tipos de vírus, HIV-1 e HIV-2 foram identificados. Apesar de diferenças quanto às estruturas genômicas e distribuição geográfica, ambos podem causar síndromes clínicas semelhantes, embora o potencial patogênico do HIV-2 seja menor que do HIV-1 (Kanki, 1999). Estruturalmente, o HIV-1 constitui-se de uma partícula icosaedra, composta de um envelope fosfolipídico, onde estão inseridas proteínas virais e da célula hospedeira, incluindo as duas principais glicoproteínas, a gp120 e gp41.

O genoma viral com RNA diplóide possui estrutura típica de retrovírus: gene *gag*, que codifica proteínas estruturais; gene *env*, que codifica glicoproteínas do envelope e o gene *polimerase*, que codifica polimerases e integrases. Outros genes também participam do processo de replicação viral atuando como genes reguladores: *vpr*, *vif*, *tat*, *nef* e *vpu*.

A distância filogenética entre as variantes do HIV-1 permite classificá-lo em 26 subtipos e 14 formas recombinantes circulantes (Circulating Recombinant Forms - CRF). No Brasil, as principais variantes descritas são: HIV-1 B, HIV-1 F, HIV-1 C e mosaicos com diferentes padrões de recombinação. Em Sao Paulo predomina o HIV-1 B, com o HIV-1 F em por volta de 10% dos isolados. (WHO, 1994; Sabino, 1996, Bongertz, 2000; Brindeiro, 2003, Fang, 2003). Resultado da interação de diferentes fatores, os mecanismos de diversidade genética do HIV são fundamentais para sua dinâmica evolutiva. Embora o grau patogênico dos diferentes tipos, grupos, subtipos, variantes ou assinaturas genômicas possa ser distinto (Zhu, 1998; Kanki, 1999; Casseb, 2002; Santoro-Lopes, 2000), o papel da diversidade viral na patogênese da infecção ainda um campo aberto à pesquisa científica.

A elevada variabilidade genética, uma das características mais importantes da biologia do HIV (Fenyo, 1988; Coffin, 1991), decorre da falta de correção na etapa de retrotranscrição viral associada a uma elevada taxa replicativa conferindo uma extraordinária velocidade evolutiva, muito superior às já observadas para outros patógenos. Esta dinâmica do HIV impõe sérios obstáculos ao controle efetivo da epidemia (Coffin, 1995; Wain-Hobson, 1996). Esta rápida evolução está associada à uma crescente dispersão genômica promovendo a alta variabilidade genética.

Esta variabilidade pode ser demonstrada quando se analisa isolados de um mesmo indivíduo evidenciando a existência de uma “quasi espécie” viral. As taxas de evolução observadas em único indivíduo podem apresentar uma variabilidade genética de aproximadamente 1% ao ano, no decorrer da evolução da infecção (Mayers, 1992; Mayers, 1996; UNAIDS, 1997). Quando analisados isolados de diferentes indivíduos, sobretudo de regiões geográficas distintas esta diversidade é ainda mais evidente. O tempo de estabelecimento da epidemia em uma determinada região geográfica está associado à uma maior divergência nos isolados. Essas características biológicas podem favorecer a superação de pressões seletivas (Coffin, 1991; Burke, 1997), como promovendo processos adaptativos frente a resposta imunológica e tratamento anti-retroviral.

A necessidade de monitorar a variabilidade do HIV tem sido uma atividade sistemática e crescente da Organização Mundial de Saúde (OMS) desde da década de 80 (GPA-WHO, 1989; UNAIDS, 1998). Diversos grupos de pesquisa têm participado desta iniciativa no Brasil e no exterior. Em nosso país, a Rede Nacional de Isolamento e Caracterização do HIV e

estudos de grupos associados, têm contribuído desde 1993 neste esforço internacional, produzindo informações sobre as características do vírus circulante (WHO, 1994; Bongertz, 2000). As implicações desta variabilidade na evolução clínica do paciente, nas questões epidemiológicas de transmissão e na área laboratorial, como sensibilidade e especificidade do diagnóstico laboratorial, testes de quantificação viral, avaliação de resistência ARV e, sobretudo no desenvolvimento de vacinas, consolidam o papel fundamental do monitoramento da diversidade do HIV.

O HIV-1 infecta predominantemente linfócitos e macrófagos. O principal receptor de superfície é a molécula CD4. Outras moléculas, chamadas de co-receptores, participam deste processo mediando os mecanismos de invasão celular. A enzima viral, transcriptase reversa, realiza a transcrição do RNA viral em cDNA, sem mecanismos de correção, gerando nesta etapa uma elevada taxa de mutagênese. O cDNA pode então ser integrado ao genoma celular do hospedeiro, sendo denominado de provírus. Como um conjunto de genes estáveis, o DNA viral é copiado em RNA mensageiro, transcrito em proteínas virais e finalmente montado na membrana celular.

O processo de replicação viral é finalizado com a liberação de partículas virais com potencial de invasão de novas células permissivas, em especial células do sistema imune. Estas partículas virais têm como uma de suas características o fato de expressarem diferentes versões do RNA viral ancestral, uma vez que as eventuais modificações introduzidas na etapa de retrotranscrição podem ser incorporadas às partículas emergentes.

Durante a evolução da infecção pelo HIV o tropismo viral pelas células do sistema imune apresenta modificações. Na infecção recente prevalecem inicialmente variantes monocitotrópicas, com capacidade de infectar células que expressam receptores CCR5, predominantes durante a fase de latência clínica. Em uma fase mais avançada, a prevalência de variantes com tropismo por receptores CRX4, indutoras de sincício, torna-se mais importante, com estimativa de progressão para a Aids em aproximadamente 3 a 4 anos (Mayers, 1992). Isolados CRX4 infectam tanto células ativadas como em repouso, porém a replicação não é completada em células que permanecem em repouso, com um bloqueio anterior ao estágio de importe nuclear do complexo de pré-integração. A evolução do biótipo CCR5 para CRX4 está associada ao desenvolvimento da Aids. As variantes do HIV-1 que apresentam CRX4 depledam preferencialmente células naïve, induzindo uma deterioração imunológica mais acentuada, enquanto que variantes CCR5 atingem em especial células de memória, com um impacto menos intenso na fisiologia do sistema imune (Mullins, 1999). Um efeito protetor de quimiocinas ligantes do CCR5, como MIP-1 beta, tem sido documentado em diferentes estudos. Ligantes que inibem a replicação de CCR5 podem exercer pressão seletiva para a emergência de variantes CRX4, de efeito deletério (Zagury, 1998).

Os reservatórios celulares do HIV representam um fator importante na patogênese e persistência viral. Vírions extracelulares retidos em células foliculo-dendríticas, macrófagos com infecção persistente, assim como linfócitos TCD4 de memória com infecção latente mas com DNA viral integrado são alguns dos potenciais reservatórios. Esses reservatórios

celulares podem permanecer por longos períodos, onde células latentes remanescentes, embora em frequências baixas entre as células em repouso, apresentam uma longa meia vida. Este período, calculado para algumas células, pode chegar até 43 meses apontando para uma erradicação viral, com os medicamentos disponíveis, em um período aproximado de 60 anos (Pakker, 1998).

O linfócito TCD4 é o elemento central na formação e manutenção da resposta imunológica de um indivíduo. A depleção de linfócitos TCD4 e outros desequilíbrios funcionais, em vários aspectos da resposta imune presentes na infecção pelo HIV, geram um estado de imunodeficiência progressiva, que na fase mais avançada pode evoluir para a Aids (Feinberg, 1996; Douek, 2002). Os principais mecanismos patogênicos relatam uma destruição de linfócitos TCD4 e ativação policlonal, relacionados aos níveis de replicação viral (Giorgi, 1999).

Em geral, o linfócito infectado evolui para morte celular após alguns dias da infecção, decorrente do efeito citopático ou da agressão imunológica, porém alguns linfoblastos podem reverter para o estado de repouso. A determinação da fração de células na fase S do ciclo celular, através da incorporação de timidina  $^3\text{H}$  ou bromo-deoxyuridine (BrdU), demonstraram que as células TCD4 e TCD8 apresentam taxas de "turnover" aproximadamente 3 vezes maiores que a observada entre indivíduos soronegativos. Este "turnover" está associado a uma perda celular, induzida pelo HIV, que é 50% maior que nos indivíduos controles. Este aumento no "turnover" celular apresenta correlação direta com o nível de viremia plasmática (Autran, 1997; Finzi, 1999). Linfócitos TCD4 são produzidos,

infectados e destruídos pelo HIV diariamente, levando à uma depleção contínua no número destas células (Lempick, 1999; Westby, 1996). A apoptose, um tipo de morte celular "programada", também está presente neste processo de perda celular (Arthos, 2002). Morfologicamente, ocorre condensação do citoplasma e do material nuclear com subsequente fragmentação do DNA nuclear e metabolicamente ocorre a síntese de macromoléculas que determinam a morte celular.

O número de linfócitos TCD4 no sangue periférico é considerado o principal marcador de dano imunológico causado pela infecção pelo HIV-1 e um importante indicador de progressão para Aids. Os valores de TCD4 são considerados alterados quando abaixo de 500 céls/ $\mu$ L (ou <24-28%). Pacientes com contagens abaixo de 200 céls/ $\mu$ L (ou < 14-16%) apresentam um risco bastante aumentado para processos oportunistas, como pneumocistose e toxoplasmose. Pacientes com contagens de TDC4 abaixo de 50-100 céls/ $\mu$ L (ou < 5-10%) apresentam um quadro de imunodeficiência mais grave com um risco elevado de apresentar infecções disseminadas, como citomegalovírus e micobactérias atípicas.

Durante o desenvolvimento fetal e na infância, células precursoras diferenciam-se em células T sob a influência do timo, expressando receptores de antígenos. Sua involução, que ocorre com a idade, pode interferir em sua capacidade de reconstituir antígenos de superfície expressos pelas células TCD4, perdidos durante a infecção pelo HIV.

Diferentes moléculas caracterizam as fases de diferenciação, maturação, memória, ativação e efetuação. Moléculas TCD4 e TCD3 são expressas na membrana celular das células em diferenciação em diferentes

momentos. Como parte deste processo, os genes dos receptores de célula T se rearranjam, codificando produtos capazes de prover as especificidades para os diferentes antígenos. Quando as células produzidas pelo timo entram na circulação estão no estágio G0 e expressam a isoforma de alto peso molecular da tirosina fosfatase, o CD45RA denominada de fenótipo "naïve". Ao encontrar o antígeno entram em ciclo celular e expansão clonal, passando a expressar a isoforma de baixo peso molecular, o CD45RO ou fenótipo "memória". Durante o curso da infecção ocorre uma progressiva diminuição do "pool" de células T, com perda preferencial de células com fenótipo "naïve" (Douek, 1998; Berkowitz, 1998).

Os Linfócitos TCD8 tem importante papel no controle da infecção pelo HIV e progressão da doença, seja por destruição das células infectadas, mecanismo citolítico ou inibindo a disseminação viral sem alterar a função celular, não-citotóxica, (Ferbas, 1998). O mecanismo citolítico mediado por células TCD8 depende da compatibilidade do sistema de antígenos do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) e envolve exocitose dependente de perforinas, de cálcio e proteases. A consequência da ação destas células é a morte celular programada decorrente da ação direta por interação das células infectadas e células TCD8 específicas (Mackewicz, 1998). O mecanismo não-citolítico, por sua vez, em geral associado à liberação de fatores solúveis, pode ou não estar relacionado à restrição ao MHC. Armazenados nos grânulos ligados a proteoglicanas, a compatibilidade na interação de MHC aumenta a liberação destes fatores solúveis (Yang, 1997; Mackewicz, 1994).

Uma forte resposta T citotóxica, citolítica dos linfócitos TCD8 (CTL), tem sido associada ao controle da replicação viral na fase aguda e na manutenção da baixa viremia observada na fase assintomática. Na maioria das vezes, é possível detectar a resposta CTL antes da detecção de anticorpos específicos para o HIV-1. Associada ou não, à presença de antígenos circulantes, a resposta CTL está reduzida em pacientes tratados com medicamentos ARV, com baixa viremia, sugerindo que um certo grau de estimulação antigênica é necessária para a manutenção da resposta CTL (Dalod, 1998). Em indivíduos com alto risco de infecção ao HIV-1, mas não-infectados, também tem sido observada uma forte resposta citotóxica.

Nas fases mais avançadas da doença, a atividade de células T citotóxicas está diminuída, contrastando com o que se observa em indivíduos com longo tempo de infecção assintomática, os quais apresentam alto grau de atividade celular, particularmente contra os produtos do gene *gag* (Klein, 1995; Hay, 1999). Nestes pacientes, também é possível observar uma forte resposta supressora não-citolítica em sistema autólogo de infecção aguda (Rinaldo, 1995). Com a evolução da infecção para Aids, a resposta CTL *gag*-específica parece ser prejudicada. Um dos mecanismos possíveis seria o aparecimento de variantes que não são reconhecidas pelas células CTL. A falta de auxílio dos linfócitos TCD4 parece um importante mecanismo de escape e deteriorização da resposta TCD8.

A diferenciação destas células ocorre em grande parte na dependência de células T. Em crianças, a disfunção deste componente pelo HIV é mais evidente. Nos adultos, a imunidade humoral está melhor preservada, mas a disfunção secundária à infecção promove um estado de



ativação policlonal, que inclui o aumento dos níveis de gamaglobulinas. Outros marcadores de atividade inflamatória, como níveis séricos de B2-microglobulina e velocidade de eritrossedimentação, são descritos na literatura como alterados na infecção pelo HIV (Schwartlander 1993).

Outros fatores estão envolvidos no controle da infecção pelo HIV-1 entre eles a base genética do paciente, representada na resposta imune pelos alelos de HLA. Duas classes de HLA, classes I e classe II, são expressas na superfície celular (Abbas, 1997). A primeira é comum à todas as células e a segunda, restrita à algumas células imunocompetentes. A expressão de moléculas do complexo de classe I é fundamental para uma efetiva resposta por células TCD8. A presença de produtos codificados pelo gene *nef*, por exemplo, pode induzir a baixa expressão de classe I e conseqüentemente uma reduzida resposta CTL, em contraposição ao descrito em pacientes infectados com variantes do HIV-1 defectivos no gene *nef* (Dyer, 1999). A combinação de fatores genéticos e imunológicos, particularmente dos mecanismos citolíticos e não-citolíticos exercidos pelas células TCD8 permitem a lise de células produtoras de vírions, e pode participar na determinação da evolução da infecção pelo HIV-1. Populações de origem diferente podem apresentar diversidade que implica em diferenças na resposta CTL, e neste contexto, o Brasil representa um cenário peculiar de diversidade étnica.

Além da imunidade humoral e celular cognitiva, envolvendo o reconhecimento celular T através de estruturas de antígeno apresentadas por HLA ou a seleção clonal de células B, diferentes citocinas e outros produtos contribuem na resposta imune ao HIV, incluindo células e

componentes da imunidade inata (Kinter, 2000). Descrito inicialmente, em meados da década de 80, um mecanismo antiviral não-citolítico exercido pelas células TCD8 envolve, ao menos em parte, a secreção de fatores solúveis, tais como as  $\beta$ - e CC-quimoquinas, GM-CSF (fator estimulador de colônias de macrófagos-granulócitos), TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , interleucina-16, fator celular antiviral (CAF) e outros ainda não definidos. Mediado primariamente por células CD28+CD8+ ativadas, este mecanismo atua de maneira não restrita ao sistema de histocompatibilidade principal (MHC) e em associação à liberação de certos fatores solúveis. Um dos fatores supressores produzidos por células T CD8+, o CAF ou fator celular antiviral promove o controle da replicação viral interferindo na interação do *tat* ou fatores celulares com a região “long terminal repeat” do HIV. Assim, com ação distinta das  $\beta$ -quimoquinas e de outros fatores solúveis, o CAF apresenta ação sobre vários isolados virais e bloqueia a produção viral no nível de transcrição. É importante considerarmos que a eventual susceptibilidade aos fatores solúveis, em particular as quimoquinas, depende do fenótipo viral. Este fato pode ser justificado pela hipótese de que tais citocinas competem com o vírus para a ligação ao seu receptor nas células.

Para um adequado monitoramento da resposta imune na infecção pelo HIV, a análise quantitativa de linfócitos TCD4, embora importante, não resume os danos causados pela infecção. Diferentes marcadores imunológicos e inflamatórios já foram apontados por contribuir no entendimento da função imunológica, em uma análise mais qualitativa de resposta. Entre estes, podemos citar quantificação de imunoglobulinas, de hemoglobina, de  $\beta$ -2 microglobulina, velocidade de eritrossedimentação,

testes cutâneos de leitura tardia, linfoproliferação *"in vitro"*, ensaios de Elispot, atividade citotóxica por células TCD8, entre outros.

Tem-se observado que, com a progressão da imunodeficiência, ocorre, uma deteriorização da resposta linfoproliferativa, com diferentes padrões a depender do estímulo utilizado e a fase clínica da infecção (Bansa, 1993). Esta alteração de resposta pode ocorrer antes mesmo de alterações importantes na contagem absoluta de linfócitos TCD4 e nos níveis de viremia plasmática, marcadores habituais do monitoramento clínico-laboratorial. Mais recentemente, testes de função linfocitária, com a detecção de produção de citocinas em ensaios de ELISPOT ou citométricos tem possibilitado um melhor entendimento da patogênese do HIV (Carcelain, 2001).

Três fases clínicas podem ser observadas na infecção pelo HIV-1: a Síndrome Retroviral Aguda (SRA), a fase assintomática e a fase sintomática, que inclui sintomas constitucionais, decorrentes de infecções ou neoplasias oportunistas que ocorrem na infecção pelo HIV. Há uma grande variabilidade individual quanto à progressão da doença e os mecanismos envolvidos neste processo ainda não estão totalmente esclarecidos (Miedema, 1996). Acreditava-se, há alguns anos, que durante a fase assintomática da doença haveria uma "latência" da ação do vírus e do sistema imune. Entretanto, estudos mais recentes demonstram que mesmo indivíduos assintomáticos e imunocompetentes produzem, em sua maioria, e continuamente, uma significativa quantidade de vírus.

O monitoramento clínico-laboratorial do indivíduo infectado pelo HIV-1 tem sido realizado, em especial, por meio da avaliação dos níveis

plasmáticos de HIV-1 RNA e número de linfócitos TCD4 associados a informações clínicas do paciente.

A avaliação de linfócitos TCD4 vem sendo usada, desde os primeiros anos da epidemia (Dalglish, 1981), como parâmetro objetivo que permite avaliar o impacto imunológico da replicação viral. Sua quantificação, por citometria de fluxo, permite estimar o estágio de imunodeficiência, a indicação de início de terapia e medicação profilática para doenças oportunistas.

O nível de RNA do HIV no plasma é um marcador clínico importante. O número de partículas virais é mais elevado durante a infecção primária e mais baixo na fase crônica assintomática. Existe uma relação direta entre a quantidade de HIV detectada e a rapidez com que a infecção progride (Mellors, 1996). Níveis elevados de replicação viral e o aumento da viremia estão associados a deterioração acelerada do sistema imune, sendo assim indicado para avaliar a progressão da doença e eficácia dos anti-retrovirais.

Os avanços tecnológicos permitiram o desenvolvimento de metodologias laboratoriais padronizadas, tanto para a quantificação de linfócitos TCD4 como viremia plasmática. Estes dois testes laboratoriais, de acesso garantido pela Rede Pública de Saúde no Brasil, orientam a condução clínica de pacientes infectados.

O combate medicamentoso à AIDS foi ampliado no final da década passada pela introdução de poderosas armas terapêuticas e pelo delineamento de novas e eficazes combinações de medicamentos (CDC, 1998). O tratamento dos pacientes infectados tem tornado a infecção uma

doença crônica, cujo manejo adequado permite a sobrevivência do indivíduo infectado, e provavelmente, contribui no controle da infectividade.

O controle da replicação do HIV pelo uso da terapia, acompanhada pelo aumento da contagem absoluta de linfócitos TCD4, tem inquestionável impacto sobre as taxas de mortalidade e morbidade associadas à infecção (Hogg, 1998; Palella, 1998; Casseb, 1999; Fonseca, 1999; Murphy, 2001). Evidências recentes do potencial de novas modalidades no manejo destes pacientes apontam claramente para o caráter dinâmico do conhecimento nesta área (Deeks, 1999).

Manuais para orientar a condução da terapia ARV variam (DHHS, 2003; PN-DST-Aids, 2003), mas o alvo primário e principal do tratamento é a completa supressão da replicação viral. As recomendações do Programa Nacional de DST-Aids passam por contínuas atualizações para contemplar aspectos peculiares à realidade da epidemia nacional e a evolução destes conhecimentos tem levado à constante reavaliação das estratégias terapêuticas. A terapia combinada de alta atividade (HAART), com duas ou mais classes de medicamentos tem se mostrado capaz, em diferentes estudos, de manter o vírus em níveis de replicação abaixo da capacidade de detecção dos testes comerciais, sendo considerada a única modalidade terapêutica aceitável. A única exceção é na profilaxia da transmissão materno fetal, quando a mãe não tem indicação de terapia e o objetivo do medicamento antiretroviral, monoterapia com zidovudina, é evitar a infecção do neonato (Consenso Nacional de Terapia Anti-retroviral, 2004).

De uma maneira geral, o conhecimento na área tem sugerido o tratamento medicamentoso nas seguintes situações: 1) intervenção

medicamentosa precoce, como profilaxia, pós-eventos de risco com o objetivo de abortar infecção recente (horas ou dias após evento infeccioso), 2) intervenção medicamentosa precoce nos casos de infecção recente (dias ou poucos meses após a infecção), 3) intervenção medicamentosa para todos os casos sintomáticos e/ou com evidências de imunodisfunção avançada (e.g. número baixo ou tendência de queda dos níveis de linfócitos TCD4). O uso de medicamentos nos casos de Infecção Aguda, bem como o momento de iniciar a terapia, orientado pelos níveis séricos de TCD4 e viremia plasmática, tem sido objeto de controvérsias. Os medicamentos ARV disponíveis no país são classificados em 3 classes de drogas: os análogos nucleosídeos (NRTI), os análogos não-nucleosídeos (NNRTI) e os inibidores da protease (IP).

As características biológicas do HIV fazem dos medicamentos ARV uma modalidade terapêutica extremamente dependente da manutenção de níveis inibitórios mínimos, o que limita a flexibilidade posológica e o conseqüente desafio da necessária adesão a estes regimes de uso crônico. A adesão à medicação está diretamente relacionada a outros fatores, como: a) acesso ao crescente número de medicamentos disponíveis, incluindo drogas mais sofisticadas, garantidas por lei; b) características biológicas virais, em especial a diversidade; c) características de biodisponibilidade das drogas, d) deficiências globais do sistema de saúde, sobretudo atenção às questões de adesão terapêutica; e entre outras, às próprias características culturais de nossa sociedade, que em relação ao uso de medicamentos, apresenta um elevado grau de

irregularidade, auto-medicação e/ou suspensão inadequada de regimes prescritos.

Estudos com escalonamento de doses demonstraram que doses sub-ótimas de medicamentos anti-retrovirais podem levar à seleção de variantes do HIV resistentes, permitindo o retorno da replicação viral à níveis detectáveis (Condra, 95). E o tratamento subsequente, mesmo que em doses adequadas, pode não mais resultar em supressão virêmica adequada.

Em decorrência do potencial sinérgico destas condições devemos nos instrumentar para o impacto do uso desses medicamentos na evolução do HIV-1 circulante em nosso país. A pressão ambiental exercida por estes medicamentos, embora ainda obscura, é de potencial impacto. Merece ressaltar nesta situação tanto as características destes medicamentos, que devem ser tomados com uma regularidade de dosagem para sua efetiva absorção e ação anti-retroviral, como as características do usuário nacional, em geral pouco atento a estas questões, especialmente quando apresenta melhora clínica.

O impacto dos medicamentos anti-retrovirais na evolução da variabilidade do HIV-1 tem, portanto, repercussões sobre o paciente e sobre a evolução do vírus circulante, em especial, favorecer a emergência de variantes resistentes, uma importante e atual questão de Saúde Pública.

O surgimento de variantes resistentes à terapia é uma evidência direta da variabilidade e da dinâmica evolutiva viral, por meio da adaptação do vírus à pressão seletiva das drogas anti-retrovirais. Diferentes modificações genéticas têm sido associadas à mutações que favorecem a

replicação do HIV na presença das drogas ARV, representando importante limitação no controle terapêutico da infecção.

O seqüenciamento genético do HIV, para avaliação do perfil de mutações nos genes da *protease* e *transcriptase reversa*, relacionadas à falência terapêutica tem sido proposto como mais um elemento no suporte ao monitoramento do tratamento anti-retroviral, somando informações biomoleculares à complexa interação entre sistema imunológico e terapia ARV. Informações sobre o impacto do teste de genotipagem no seguimento clínico de pacientes em uso de terapia ARV ainda são incipientes no Brasil, onde a maior parte das informações nesta área procede de estudos internacionais, onde os aspectos epidemiológicos da epidemia podem ser distintos.

Aparentemente, as possíveis variantes mutagênicas associadas à resistência a uma droga já estão presentes quando o tratamento é iniciado. A terapia apenas pressiona a evolução viral, selecionando as variantes mais adequadas para replicar no ambiente gerado pela terapia. A rapidez com que certas variantes resistentes aparecem é consistente com a pré-existência destas variantes (Coffin, 95), porém não é excludente a possibilidade de mutação espontânea, ocorrendo em especial em um ambiente que favoreça a seleção, como durante períodos de elevadas taxas replicativas, podendo vir a predominar como variante majoritária (Wain-Hobson, 1996). A primeira droga de uso rotineiro, como o AZT (zidovudina), perdia sua potência com o tempo. Por outro lado, inibidores da transcriptase reversa não nucleosídeos (NRTI) poderiam apresentar perda de atividade em decorrência de resistência em poucas semanas. Os mecanismos para



cada droga são distintos, a resistência à nevirapina, por exemplo, pode se desenvolver a partir de uma simples mutação pontual, enquanto que a resistência ao AZT ou inibidores da protease envolvem mais mutações.

A exposição viral à classe dos análogos nucleosídeos expõe a enzima transcriptase reversa do HIV (alvo desta classe de medicamentos) a uma pressão seletiva, que pode comprometer outras drogas desta classe. O uso exclusivo de drogas da classe dos NRTI era a única modalidade de tratamento nos primeiros anos da epidemia e seu uso ainda é encontrado em pacientes que iniciaram terapia ARV há mais tempo, antes da era HAART, por apresentarem boas condições clínicas. A influência no perfil de mutação do uso continuado de medicamentos da classe dos NRTI, na seleção de mutações que possam comprometer esta classe, bem como o favorecimento da emergência de polimorfismos que comprometam drogas da classe dos NNRTI, ainda não está totalmente esclarecido.

A proteinase aspártica do HIV é uma das quatro enzimas codificadas pelo vírus e o principal alvo dos medicamentos da classe dos inibidores da protease, levando a produção de partículas não infecciosas, imaturas. Esta enzima é crucial no processamento pós traducional do produto poliproteico dos genes *gag-pol*. A enzima é um homodimer simétrico derivado de duas cadeias idênticas com 99 aminoácidos cada (Kohl, 88). Esta estrutura é distinta de proteinases aspárticas humanas, como a renina e a pepsina, entre outras, que derivam de uma única cadeia de polipeptídeo. Três dos nove sítios de clivagem catalisados pela enzima se encontram entre uma fenilalanina e uma prolina (ligações Phe-Pro). Hidrólise de N terminal catalisado por endopeptidases não é observado na química de

mamíferos, sendo, portanto o alvo preferencial da maioria dos inibidores de protease em desenvolvimento. As drogas disponíveis são metabolizadas por enzimas do sistema citocromo P450, o que leva a importantes interações medicamentosas.

O início da terapia anti-retroviral é marcado por uma dramática redução da taxa de "turnover" celular, associado a diminuição da proporção de células T que apresentam marcadores fenotípicos de ativação. Esta diminuição é revertida se a terapia for interrompida, uma evidência da correlação entre o nível de ativação imunológica e replicação viral. O aumento inicial, ou regeneração dos linfócitos TCD4 em indivíduos submetidos à terapêutica anti-retroviral baseia-se em uma expansão policlonal de células preexistentes, CD45RO. A recuperação de linfócitos TCD45RA, "naïve", ocorre tardiamente devido tanto a uma função tímica, como por expansão periférica de células preexistentes em concentrações abaixo do limite de detecção dos métodos de citometria usuais, assim como pela conversão de células CD45RO em CD45RA. A função imunológica é parcialmente regenerada para antígenos de memória, presentes antes da terapia e sua resposta aumenta com a ação terapêutica. Por outro lado, respostas imunológicas para antígenos ausentes antes da terapia permanecem inalteradas.

É incontestável que a terapia ARV tem mostrado resultados satisfatórios, proporcionando uma significativa melhoria da sobrevida e qualidade de vida dos pacientes. Entretanto, ainda são necessários estudos para elucidar em que extensão esta recuperação de linfócitos TCD4

representa uma recuperação da capacidade de resposta imune, propriamente dita.

A resposta ao tratamento, no que concerne a regeneração imunológica e o controle replicativo viral pode ser subdividido em quatro categorias: queda da viremia com ganho de linfócitos TCD4, padrão ideal; ganho de linfócitos TCD4 sem controle de viremia; redução de níveis virêmicos sem ganho de linfócitos TCD4; e viremia detectável com queda de linfócitos TCD4 persistentes.

Em uma resposta ideal ocorre uma queda da viremia nos primeiros meses de terapia anti-retroviral. Observa-se contudo, que apenas parte dos pacientes conseguem um controle sustentável da replicação viral (carga viral indetectável). Alguns pacientes mantêm o controle da replicação, mas perdem o controle após um período de tempo. Este problema é observado tanto em países em desenvolvimento como em países desenvolvidos. Adesão ao tratamento, fatores biológicos do hospedeiro, resistência às drogas e biodisponibilidade intracelular em diferentes compartimentos do organismo são alguns dos fatores associados à falência virológica (Shirasaka, 1993).

Na prática clínica, a falência terapêutica ocorre por diferentes motivos, conforme anteriormente referido. Entretanto, a falência virológica nem sempre está associada à falência clínica e imunológica. Observa-se que alguns pacientes conseguem manter boas condições clínicas e ganho de linfócitos TCD4 apesar da evidência de falência virológica. Diferentes grupos (Deeks, 2000; Brígido, 2000; Fessel, 2000; Hejdeman, 2001) têm mostrado estas discordâncias de resposta, mas os mecanismos associados

com esta situação ainda não estão esclarecidos (D'Etorre, 2002; Hunt, 2003).

Estudos que procuram refinar a quantificação da viremia ou a detecção de replicação em níveis menores, em locais que não o sangue periférico, apontam para uma replicação contínua do HIV mesmo durante regimes terapêuticos considerados adequados (Ferguson, 1999). De qualquer forma, a supressão viral obtida com esquemas terapêuticos potentes correlaciona-se à melhor ganho de linfócitos TCD4, níveis de replicação abaixo da capacidade de detecção dos testes comerciais e sobrevida, sendo considerados como opções preferenciais de tratamento (Chun, 97). Os estudos de cinética de controle da replicação nos dias iniciais após a introdução de inibidores da protease (Ho, 1995) demonstraram o efeito impressionante destas drogas no “clearance” plasmático viral, com queda exponencial dias após sua introdução. Esta resposta induziu ao diretor do Instituto Aaron Diamond sugerir que a erradicação viral seria uma questão de tempo (Ho, 1996). Infelizmente, estudos posteriores sobre reservatórios celulares trouxeram informações sobre a cinética de eliminação viral nestes compartimentos celulares sugerem não ser factível esta erradicação com os medicamentos disponíveis atualmente.

No tratamento de pacientes com terapias sub-ótimas, e mesmo em alguns pacientes em uso de HAART adequadamente, há uma percentagem considerável de indivíduos onde a viremia não reduz a níveis indetectáveis ou reduz, mas volta a aumentar após um certo tempo. Alguns destes indivíduos apresentam evidências clínicas de controle da infecção,

como a diminuição de doenças oportunistas, e melhora dos parâmetros laboratoriais, embora sob critérios de falência virológica. Com a dificuldade crescente de controle replicativo após sucessivas terapias, torna-se importante determinar a evolução destes casos de controle parcial da viremia, para uma melhor avaliação da necessidade, composição e do momento de se introduzir novo esquema terapêutico, ou terapias de resgate.

Estudar as características presentes em pacientes que suportam níveis detectáveis de viremia, entretanto ainda conseguem recompor, embora que parcialmente, seu sistema imunológico e determinar os fatores que distinguem estes daqueles em que esta viremia é deletéria, podendo acarretar um impacto clínico, é importante área de pesquisa na evolução de pacientes HIV/Aids.

Nosso estudo procura avaliar esta questão, e a hipótese sustentada por esta tese é de que pode existir um benefício clínico nos casos onde há um controle parcial da viremia plasmática, quando o paciente consegue manter o nível do RNA do HIV-1 pelo menos um  $\log_{10}$  abaixo dos níveis históricos.

## 2 OBJETIVOS

Avaliação da regeneração de linfócitos TCD4 frente à terapia ARV combinada em uma coorte de pacientes HIV positivos e sua associação com supressão virológica e evolução clínica, incluindo:

- Avaliação de fatores preditores de evolução clínica e de regeneração imunológica,
- Avaliação de parâmetros imunológicos/inflamatórios associados à infecção pelo HIV,
- Caracterização das situações de supressão replicativa parcial, avaliando parâmetros preditores de controle da viremia,
- Avaliação do padrão de mutação associado à resistência genotípica aos ARVs e sua correlação com padrão de resposta a terapia.

### **3 CASUÍSTICA E MÉTODOS**

#### **Casuística**

Realizamos um estudo longitudinal, observacional, de outubro de 1987 à fevereiro 2001 em uma coorte de pacientes com Infecção pelo HIV acompanhados no Ambulatório de Imunodeficiências Secundárias LIM-56 da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. As informações clínicas e laboratoriais foram reportadas dos Prontuários Médicos, pela equipe multidisciplinar e atualizados em Banco de Dados (Epi6) para registro e análise de condições clínicas, laboratoriais, terapêuticas e imunológicas relacionadas a evolução dos pacientes. Os pacientes incluídos no estudo apresentavam os seguintes critérios de inclusão:

- Indivíduos infectados pelo HIV-1,
- Idade maior que 18 anos,
- Tempo de seguimento superior a 12 meses,
- Apresentar quantificação de linfócitos TCD4 pré-terapia ARV e na última visita,
- Apresentar pelo menos 2 quantificações de Viremia Plasmática nos últimos 8 meses,

Para análise das informações consideramos como: tempo total de seguimento (TS), de outubro 1987 a fevereiro 2002, o período compreendido entre a data de matrícula no Serviço (Entrada) e a data da última consulta/observação (Atual). O tempo de terapia monitorada (TM), de

outubro 1995 a fevereiro 2002, corresponde o período entre a data de início de terapia ARV e a data da última consulta/observação, como final do monitoramento (Atual). Em relação a valores de exames laboratoriais consideramos: à Entrada, como o valor/data do primeiro exame realizado após entrar no Serviço; Pré-ARV, último valor/data realizado antes de iniciar terapia ARV; e Atual, o último exame realizado.

As recomendações para utilização de terapia anti-retroviral variou no período do estudo. Entre algumas alterações, tivemos a restrição à mono ou dupla terapia com análogos nucleosídeos (NRTI) até 1996 com o uso de HAART a partir de 1997 para pacientes com linfócitos TCD4 <500 céls/ $\mu$ L, especialmente se acompanhado de viremia plasmática acima de 100.000 cópias/mL. Em geral, terapia com 2 drogas da classe dos NRTI foi utilizada após 1997 como opção terapêutica apenas em pacientes que já estavam utilizando e apresentando boa evolução. Nos períodos finais do estudo a recomendação para iniciar terapia com HAART, em pacientes com linfócitos TCD4<350 céls/ $\mu$ L, foi recomendada.

A definição de caso de Aids foi realizada utilizando o critério CDC 1993 (CDC, 1993). A adesão terapêutica foi avaliada através de uma breve entrevista, com a aplicação de um questionário, constando questões de regularidade das tomadas de medicamentos (Brígido, 2001). Pacientes que apresentavam uso regular de medicação em todas as avaliações, durante os dois primeiros regimes terapêuticos, foram classificados como aderentes.

O total de pacientes foi estratificado em três grupos, de acordo com a resposta virológica aos ARV. Grupo Avirêmico, para aqueles que apresentavam no final do estudo, viremia indetectável (HIV-RNA



plasmático < 500 cópias/mL, nas duas últimas determinações), ou supressão virológica completa. Pacientes com falência virológica (HIV-RNA plasmático > 500 cópias/mL), foram sub-classificados em dois grupos: grupo Virêmico, para aqueles com HIV RNA plasmático similar ( $\pm 1 \log_{10}$ ) aos níveis pré-ARV e grupo Virêmico Atenuado, para pacientes com HIV-RNA plasmático > 500 cópias/mL mas com viremia, nas duas últimas determinações, pelo menos  $1 \log_{10}$  abaixo dos níveis prévios.

Os exames laboratoriais que estão incluídos nesta avaliação foram coletados e encaminhados ao Laboratório Central do HCFMUSP, IAL e LIM-56 da FMUSP, para realização dos procedimentos.

Todos os resultados dos testes laboratoriais avaliados neste estudo foram disponibilizados aos Prontuários Médicos dos pacientes, como informação auxiliar para a condução clínica. A decisão de conduta terapêutica ficou a critério do médico responsável por cada paciente, sem influencia da condução deste estudo.

### **Processamento das amostras biológicas**

Amostras de sangue total foram obtidos por venopunção periférica e processadas poucas horas pós a coleta, de acordo com os protocolos específicos de cada metodologia, ou armazenados em refrigeração de  $-70^{\circ}\text{C}$  para posterior processamento, quando indicado. O vírus HIV foi isolado por metodologia sugerida pelo Aids Clinical Trial Group (ACTG, 1993).

## **Marcadores Inflamatórios**

Os exames de quantificação de Imunoglobulina A (IgA), Imunoglobulina G (IgG), Beta-2-microglobulina ( $\beta$ 2M) e Velocidade de Eritrossedimentação (VHS) foram realizados, conforme as normas do Laboratório Central do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo (ISO 9002).

## **HIV-1 RNA (Viremia Plasmática)**

A quantificação de plasma HIV-1 RNA foi realizada a partir de 1997 com metodologia Nasba (Organon Teknika, Holland) ou Amplicor (Roche, USA), conforme as instruções do fabricante. Algumas medidas de HIV-1 RNA pré-tratamento foram realizadas a partir de plasma conservado em temperatura  $-70^{\circ}\text{C}$ . As amostras de plasma, separadas em tempo inferior a 6 horas após coleta, foram clareadas em centrífuga refrigerada a 10.000 rpm por 3 min. e quantificadas para o HIV. O teste NASBA envolve a amplificação isotérmica de RNA viral obtido por lise de proteínas do plasma com meio caotrópico (Tiocianato de guanidina). A amplificação isotérmica é realizada após a adição de três espécies de RNA, que atuam como controles internos da reação. A leitura permite comparar a quantidade de RNA amplificado presente na amostra analisada, em relação à quantidade final dos três controles, e inferir a quantidade de RNA viral presente no plasma. O resultado é expresso em número absoluto/cópias/mL ou em  $\log_{10}$  cópias/mL. Amostras abaixo do limite de detectabilidade são definidas por testes

negativos, sendo que este valor varia de acordo com o modelo/fabricante do Kit, podendo detectar de 80 a 500 cópias/mL. A análise da viremia plasmática dos pacientes deste estudo foi realizada conforme as normas de padrão de qualidade da Rede Nacional de Carga Viral, do Ministério da Saúde.

### **Estudo Fenotípico Celular (linfócitos TCD4)**

A contagem de linfócito TCD4 foi realizada com imunofluorescência indireta de 1989 a 1995 e posteriormente por citometria de fluxo, com anticorpos monoclonais comerciais (Coulter, USA). Quantificação de marcadores de sub-populações celulares TCD4, TCD8 e TCD3 foi realizada seguindo as instruções do fabricante. Resumidamente, as amostras foram coletadas em tubos com EDTA (ácido etilenediaminetetracético, Becton-Dickinson, San Jose, CA, EUA) em temperatura ambiente, sendo adicionados a 100µL de sangue total, 5µL de anticorpo monoclonal conjugado com FITC (isotiocianato de fluoresceína), ou PE (ficoeritrina). Após vórtex e repouso por 20 min. à temperatura ambiente as hemácias foram lisadas (Immunoprep) em um dispositivo automatizado (Multi-Q-Prep) e fixadas. A seguir, as células foram lavadas duas vezes com 2mL de PBS (pH=7,4), com azida sódica 0.02% e albumina bovina 0.02%, durante 2 min. a 2000 rpm. O botão celular foi ressuspenso em 400µl de PBS-paraformaldeído 4% e submetido à aquisição e análise por citômetro de fluxo. Os valores absolutos foram obtidos pelo produto dos linfócitos totais obtidos em leucograma realizado em citômetro Cell-Dyn

1400. A análise de linfócitos TCD4 dos pacientes deste estudo foi realizada conforme as normas de padrão de qualidade da Rede Nacional de CD4, do Ministério da Saúde.

### **Seqüenciamento genético do HIV**

O seqüenciamento genético da *polimerase* do HIV permite avaliar o perfil de susceptibilidade genética as drogas ARV. Este gene codifica as enzimas protease e transcriptase reversa, principais alvos dos atuais medicamentos. Através de análises de similaridade genética, as mutações virais encontradas pela técnica de seqüenciamento são interpretadas e fornecem uma informação molecular que permite a análise do perfil de resistência as drogas ARV.

O material biológico utilizado foi preservado a  $-70^{\circ}\text{C}$  até a realização dos procedimentos laboratoriais. A metodologia compreendeu na extração do RNA, a partir de plasma, ou DNA próviral a partir de lisado celular (papa leucocitária), utilizando metodologia "in-house" (solução de trizol). Alternativamente, "kits" comerciais de extração de DNA e RNA (Qiagen, Amersham-Pharmacia) foram utilizados na recuperação de amostras (com amplificação negativa). O produto da extração, (DNA ou cDNA retrotranscrito), foi submetido à amplificação molecular por metodologia de Reação em Cadeia da Polimerase (Polimerase Chain Reaction - PCR). Os primers utilizados estão descritos na literatura e listados abaixo.

A primeira etapa do PCR permitiu a obtenção de um produto de amplicon de

1.2 Kb do gene *polimerase*. Seqüências de nucleotídeos (primers) utilizados:

5'- CAGAGCCAACAGCCCCACCA ; posição 2147-2166)

5'-TTCCCCACTAACTTCTGTATGTCATTGACA-3'; posição 5745-5776)

Condições de ciclagem:

1 ciclo 94°C por 3min

35 ciclos com 94°C por 30s, 55°C por 30s, 72°C por 2min

1 ciclo de 72°C por 10min.

A segunda amplificação (Nested PCR), de regiões do DNA internos ao fragmento maior amplificado, permitiu a obtenção dos genes codificadores da *protease (PR)* e *transcriptase reversa (RT)*. Seqüências de nucleotídeos (“primers”) utilizados:

5'- GTTGA CT CAGATTGGTTGCAC,

5'- GTATGTCATTGACAGTCCAGC,

5'- TAACTCCCTCTCAGAAGCAGGAGCCG,

5'- CCATTCCTGGCTTTAATTTTACTGGTA.

Amostras que não amplificaram com estes conjuntos de “primers” foram testadas com primers alternativos:

5'- GTACAGTATTAGTAGGACCTACACCTGTC,

5'- ATCAGGATGGAGTTCATAACCCATCCA,

5'- CCAAAGTTAAACAATGGCCATTGACAGA,

5'- AGTTCATAACCCATCCAAAG.

Condições de ciclagem:

94°C for 3min,

25 ciclos de 94°C por 30s, 55°C por 30s, 72°C por 1min.

1 ciclo de 72°C for 10min.

O segundo ciclo de RT:

1 ciclo de 94°C por 3min

35 ciclos de 94°C por 1min, 55°C por 1min, 72°C por 1min and 30s.

1ciclo de 72°C for 10min.

Utilizando colunas de purificação (Rapid Concert, Gibco) o material genético foi purificado e quantificado por corrida de eletroforese (agarose 1%), com padrão de peso molecular (Mass ladder). Reação de sequenciamento para incorporação de rodaminas marcadas (Big Dye, Applied Biosystems) seguida de uma etapa de purificação com isopropanol e etanol foram realizadas. A incorporação de rodaminas foi realizada com o mesmo “primer” utilizado na segunda reação de PCR ou com os “primers” listados:

5'- TATCAGGATGGAGTTCATAAC,

5'- GGATGGCCCAAAGTTAAAC,

5'- CCTCAAATCACTCTTTGGCAAC,

5'- AAAATTTAAAGTGCAGCCAAT.

As amostras foram ressuspensas em formamida e seqüenciadas em equipamento automático (ABI 377). O seqüenciamento genético da PR (códon 1 a 99) e RT (códon 1-236) permitiu a obtenção de arquivos (cromatogramas) para análise genotípica.

### **Análise Biomolecular**

Processo de validação das seqüências genéticas foi realizada através de aplicativos disponíveis, como Sequence Navigator, por meio da edição e análise dos cromatogramas gerados pelo sequenciamento genético

, onde seqüências “forward” e “reverse” formaram um arquivo consenso e um produto final, em formato fasta, foi obtido. Após esta etapa as seqüências genéticas foram alinhadas para análise de similaridade entre a edição gerada e a seqüência HXB2 do HIV (GenBank access number K03455), avaliando o perfil de mutações da seqüências analisadas. Estas informações moleculares foram submetidas à programas disponíveis na internet. Na análise da resistência aos ARV, o perfil genotípico foi avaliado pela submissão ao “site” Stanford HIV Drug Resistance Database (hivdb.stanford.edu), que gera notas informativas sobre cada mutação e sua relação com a suscetibilidade aos medicamento ARV.

### **Gerenciamento de dados**

Um banco de dados utilizando o software EpiInfo6 (CDC) foi utilizado para registro das informações clínicas e laboratoriais dos pacientes do estudo, incluindo dados demográficos, epidemiológicos, clínicos, da terapia ARV, adesão medicamentosa e exames laboratoriais. O levantamento de informações dos Prontuários Médicos e a digitação dos dados no Banco Epi6 foram realizados pela equipe do Ambulatório LIM56-FMUSP.

### **Análise Estatística**

As análises estatísticas foram realizadas utilizando os programas EpiInfo 6 (CDC), GraphPad Prism e Stata Statistical Software, assumindo

um valor de p “Two tailed” que foi calculado, para variáveis categóricas usando o teste Yates corrigido ou teste de Fisher quando apropriado. O teste Man Whitney foi utilizado para variáveis contínuas e o T-test pareado para comparar variáveis contínuas entre um mesmo individuo de cada grupo. Análises “forward stepwise regression” foram usadas para “outcomes” binários e regressão para variáveis contínuas em análises multivariadas.



## 4 RESULTADOS

Um total de 148 pacientes acompanhados no Ambulatório do Laboratório de Investigação Médica, LIM-56 da Faculdade de Medicina da USP, que preenchiam os critérios de inclusão, foram avaliados neste estudo. Todos os pacientes assinaram o Consentimento Livre Esclarecido (CLE), conforme as normas éticas vigentes. O tempo médio de seguimento dos pacientes foi de 251 semanas (IQR, 172-368) e de 179 semanas (IQR, 130-226) no tratamento monitorado. IQR refere-se ao “Inter Quartile Range”, ou seja os limites de quartil 25% e 75%, respectivamente.

De acordo com a resposta virêmica aos ARV, os pacientes foram estratificados e assim distribuídos: 56 pacientes no grupo Avirêmico (AVIR), completa supressão da viremia; 33 pacientes no grupo Virêmico Atenuado (ATT), supressão parcial da viremia; e 59 pacientes no grupo Virêmico (VIR), viremia detectável, sem supressão. Os dados estão apresentados na Tabela 1. Pacientes com falência virológica (ambos os grupos VIR e ATT) não diferem, em relação ao grupo Avirêmico, em idade, sexo, número de linfócitos TCD4, (à Entrada ou pré-ARV), tempo de seguimento ou tempo de terapia monitorada (Tabela 1).

A Figura 1 mostra a evolução dos níveis de viremia plasmática, por grupo, em dois tempos do seguimento: anterior ao início da terapia ARV (pré-ARV) e na última observação (Atual).

O número de pacientes com linfócitos TCD4 > 350 céls/μL, à entrada no seguimento foi maior no grupo Virêmico Atenuado quando

comparado aos pacientes dos grupos Avirêmico ( $p < 0.56$ ) e Virêmico ( $p < 0.022$ ). O grupo Avirêmico apresentou valores de linfócitos TCD4 marginalmente melhores que os pacientes Virêmicos. O grupo dos Atenuados teve significativamente mais pacientes com linfócitos TCD4  $> 350$  céls/ $\mu$ L e menos pacientes com linfócitos TCD4  $< 200$  céls/ $\mu$ L, no início da terapia monitorada, que o grupo Virêmico ( $p < 0.003$  e  $p < 0.013$ , respectivamente), Figura 2. O número de pacientes com linfócitos TCD4  $< 200$  céls/ $\mu$ L na última observação foi similar entre o grupo Avirêmico e Virêmico Atenuado e significativamente diferente quando Virêmicos foram comparados com Avirêmicos ( $p < 0.00001$ ) ou Atenuados ( $p < 0.0003$ ). Da mesma forma, um menor número de pacientes na última observação apresentavam linfócitos TCD4  $> 350$  céls/ $\mu$ L no grupo Virêmico, ( $p < 0.0001$  para Avirêmico e  $p < 0.03$  para Atenuado), Tabela 2 e Figura 2.

Os níveis de linfócitos TCD4 nos três momentos do seguimento: início do seguimento, início da terapia monitorada e na última observação estão apresentados na Figura 3. A Tabela 3 apresenta os valores de TCD4 com os respectivos ganhos, por período. Ganho absoluto de linfócitos TCD4 durante o período de seguimento foi observado nos grupos Avirêmico e Virêmico Atenuado, ambos significativamente maiores que o grupo Virêmico (Figura 4).

A freqüência de pacientes com redução de linfócitos TCD4 durante o tempo de seguimento foi significativamente maior nos pacientes Virêmicos quando comparado aos grupos Virêmico Atenuado ( $p < 0.013$ ) e Avirêmico ( $p < 0.0001$ ). Durante o período de terapia monitorada, todos os

grupos mostraram aumento na contagem de linfócitos TCD4, mas o ganho no grupo Virêmico não foi significativo ( $p=0.26$ ), Figura 5.

Nas análises multivariadas para avaliação de preditores de ganho de linfócitos TCD4 (regressão linear) a adesão regular, no início do tratamento monitorado, foi significativamente associada ( $p<0.015$ ) ao ganho de TCD4 em todos os grupos. Quando avaliamos apenas os pacientes do grupo com falência virológica, os Virêmicos Atenuados mostraram um significativo ganho de linfócitos TCD4 quando comparado aos Virêmicos ( $p<0.001$ ).

Alguns parâmetros inflamatórios e imunológicos, como Velocidade de Eritrossedimentação (VHS), Beta2-microglobulina ( $\beta 2M$ ), Imunoglobulina A (IgA) e Imunoglobulina G (IgG) foram analisados. A Tabela 4 apresenta os valores em dois momentos do seguimento, na entrada no Serviço (Entrada) e na última observação (Atual).

- Velocidade de Eritrossedimentação (VHS) na entrada foi significativamente maior no grupo Virêmico quando comparado ao grupo Avirêmico ( $p<0.004$ ) ou Atenuado ( $p<0.005$ ). Apenas o grupo Virêmico não apresentou redução de VHS durante o seguimento. Os valores de VHS do grupo Virêmico, na última observação, foram significativamente diferentes de ambos os grupos Avirêmicos ( $p<0.0005$ ) e Atenuados ( $p<0.006$ ), Figura 6.
- Os níveis de Beta-2-microglobulina ( $\beta 2M$ ) foram similares entre todos os grupos na entrada, com um aumento dos valores, na última observação, entre os Virêmicos e uma diminuição nos outros grupos, especialmente no Avirêmico, Figura 7.

- Os níveis de Imunoglobulina A (IgA) permaneceram altos nos pacientes do grupo Virêmico, com uma pequena diminuição (24%) no grupo Atenuado, Figura 8.
- Os níveis de Imunoglobulina G (IgG) mostraram uma redução em todos os grupos, mais pronunciado nos Avirêmicos, Figura 9.

As Tabelas 5, 6a e 6b resumizam as análises estatísticas da diferença entre as principais variáveis dos pacientes nos três grupos.

Em relação à terapia anti-retroviral, 65% dos pacientes já haviam sido expostos à diferentes regimes, anteriormente ao monitoramento em nosso Serviço. Contudo, destes 35% pacientes naïve, a proporção de naïves entre o grupo Avirêmico foi maior com 46% dos pacientes sem exposição prévia à terapia, acompanhado de 39% no grupo Atenuado e 23% no Virêmico. Quanto ao tipo de tratamento prévio, à que estes pacientes estiveram expostos no momento do primeiro tratamento monitorado, 15% tinham exposição prévia à um único NRTI, 65% à dois NRTIs e 20% à regimes contendo inibidores de protease. Durante a terapia monitorada o grupo Avirêmico utilizou significativamente menor número de regimes ARV que os pacientes do grupo Virêmico ( $p < 0.005$ ), Tabela 7 e Figura 10. Neste estudo não encontramos correlação entre a presença de inibidor de protease no último esquema terapêutico ao controle da viremia. No grupo Atenuado, por sinal, apenas 70% dos pacientes estavam usando IP no último regime.

A adesão ao primeiro, ou aos dois primeiros regimes, está significativamente associada ao ganho de CD4, em análises multivariadas. Sessenta por cento dos pacientes avirêmicos, 65% dos atenuados e 43% dos virêmicos apresentaram evidências de uso regular de medicação.

Quanto à evolução clínica dos pacientes, na última observação nenhum paciente do grupo Virêmico, mas sete dos Virêmicos e um dos Atenuados estavam assintomáticos. Pelo menos dois destes pacientes reportaram sintomas associados à terapia ARV.

Evento clínico definidor de Aids anterior à entrada no seguimento foi observado em 21 pacientes (14%). Profilaxia primária e secundária para pneumonia por *Pneumocystis carinii* (PCP) e toxoplasmose foram rotineiramente prescritas. A incidência de condições clínicas definidoras de Aids durante o tempo de seguimento foi significativamente maior no grupo Virêmico (teste de regressão de Cox,  $p < 0.001$ ) quando comparada com os outros dois grupos (Figura 11). Tuberculose, pneumonia por *Pneumocystis carinii*, toxoplasmose e candidíase esofágica foram as mais freqüentes infecções oportunistas documentadas e sarcoma de Kaposi, a neoplasia mais freqüente. Analisando os pacientes que evoluíram para óbito, observamos sete pacientes do grupo Virêmico e dois do grupo Avirêmico, enquanto nenhum do grupo Atenuado evoluiu para óbito. Esses nove pacientes tiveram diagnóstico de Aids entre julho de 1992 à janeiro de 1998. Entre os pacientes do grupo Avirêmico, um paciente teve óbito por complicações de neurotoxoplasmose com níveis muito baixos de linfócitos TCD4 e o outro por complicações de distúrbio metabólico. No grupo Virêmico, três casos de óbito foram associados à complicações de neurotoxoplasmose (um deles também com infecção por CMV), um à falência de múltiplos órgãos e choque séptico, outro à complicações de Hepatite crônica C, um à linfoma e o outro à insuficiência respiratória aguda por pneumonia intersticial.

Avaliação de resistência genotípica aos medicamentos anti-retrovirais foi realizada em 45 pacientes. Em 43 desses pacientes foram seqüenciados os genes da *transcriptase reversa* (RT) e *protease* (PR) e em dois pacientes somente o gene da *protease*. A Figura 12 mostra o número médio de mutações, por paciente, para cada classe de drogas anti-retrovirais. Os resultados para a classe dos inibidores de protease são analisados tanto como número total de mutações (PIT) como número de mutações principais (PIP).

Extensivo padrão de mutação foi observado na maioria dos pacientes dos tres grupos, para as três classes de drogas anti-retrovirais. As Figuras 12,13 e 14 apresentam a freqüência de mutações nos códons das enzimas transcriptase reversa e protease, por grupo. O número de mutações relacionadas à resistência no grupo Avirêmico foi menor, mas não significativamente diferente daqueles observados para os grupos Virêmicos ou Atenuados. L90M e V82A/F/T/S foram as mutações principais mais prevalentes observadas no gene da *protease*. Algumas mutações estão presentes apenas nos pacientes com falência virológica, como o códon V82. As mutações nos códons M41L e T215Y/T foram as mutações mais prevalentes para a classe dos Análogos Nucleosídeos. Na classe dos Análogos Não Nucleosídeos, as mutações G190A/S e K103N foram as mais freqüentes. Outras mutações, como nos códons K20, A71 ou I54 da protease e K70 ou M184 na RT, tiveram maior prevalência entre os pacientes do grupo Atenuado, mas estas diferenças não foram estatisticamente significantes.

## 5 DISCUSSÃO

O entendimento da regeneração imunológica observada em pacientes com infecção pelo HIV em uso de terapia ARV é uma área do conhecimento ainda em construção, com várias questões ainda pouco definidas. O número de linfócitos TCD4 positivos no sangue periférico, embora represente apenas uma porção do total de linfócitos, é considerado o principal marcador imunológico no seguimento clínico-laboratorial de pacientes infectados. A quantificação de TCD4, entretanto, não representa os diversos e complexos mecanismos envolvidos na imunopatogênese da infecção pelo HIV e nosso estudo não avaliou os vários aspectos deste processo. Embora reconhecendo estas limitações, o número de células TCD4 e suas modificações após o uso de terapia anti-retroviral é um importante indicador de competência imunológica, orientando início da terapia ARV, introdução ou suspensão de profilaxia de doenças oportunistas (WHO, 2002; PN-DST/Aids, 2003; NIH, 2003) e tem sido utilizado também para a suspensão estruturada de tratamento ARV (Miro, 2002). Este estudo limitou-se a avaliar os níveis de TCD4 como principal marcador de resposta imune e clínica, em três padrões de resposta virológica à medicação anti-retroviral. A avaliação de outros parâmetros imunológicos e inflamatórios foi ainda realizada em alguns casos.

A completa supressão virêmica, com manutenção dos níveis de HIV-RNA plasmático abaixo dos níveis detectáveis em ensaios comerciais em uso pela rede pública brasileira de carga viral é considerado o principal

alvo e indicador de eficácia terapêutica. As bases científicas deste conceito fundamentam-se em estudos da patogênese do HIV. Um destes estudos (Mellors, 1996) demonstrou a estreita relação entre dos níveis de viremia plasmática, queda de TCD4 e a taxa de evolução para Aids. Outros grupos também correlacionam a replicação viral ao dano de linfócitos TCD4 (Feinberg, 1996; Autran, 1997), e suportam o conceito de que reduzir a viremia plasmática à níveis indetectáveis é o objetivo central do arsenal terapêutico anti-retroviral contra HIV/Aids, favorecendo um processo de regeneração imunológica.

De fato, em nosso estudo foi observada uma evolução clínica e imunológica mais favorável no Grupo de pacientes aviremicos, ou seja, que apresentaram uma completa supressão com a terapia. A não-exposição prévia a ARV, antes do início da terapia monitorada, a boa adesão aos esquemas ARV e um menor número de regimes terapêuticos constituíram-se preditores dessa resposta virológica. Estes dados também já foram observados por outros pesquisadores (Grabar, 2000; Hogg, 2001).

Entretanto, na prática clínica, especialmente em ambientes de atenção a saúde com recursos limitados, promover níveis de viremia indetectáveis, embora condição ideal, não é a realidade sempre obtida, e mesmo quando o é, muitos pacientes não conseguem manter a condição de aviremia por períodos prolongados, levando na maioria das vezes a modificações do esquema terapêutico em situações de opções limitadas. Mais recentemente, em especial nas situações de resgate terapêutico após exposição a múltiplos esquemas ARV o conceito de aviremia como única



resposta tem deixado de ser considerado o objetivo central terapia (Deeks, 1999; Kousignian, 2003).

Em nosso estudo, dos 148 pacientes analisados somente 38% estavam avirêmicos na última avaliação clínica, demonstrando que a manutenção da aviremia é difícil na maioria dos casos. Em um estudo transversal, realizado no Laboratório de Referência de Carga Viral (LRCV) da região metropolitana do Rio de Janeiro (Campos-Mello, 1999), somente 33% dos usuários em uso de HAART apresentavam-se avirêmicos. Outros LRCVs têm experiência similar. Em 10.858 exames consecutivos de carga viral, reportados ao Programa Nacional DST/Aids-MS, de pacientes em tratamento ARV no ano de 2001, apenas 36% apresentavam valores abaixo do limite de detecção dos testes comerciais (Sistema de Monitoramento do PN DST/AIDS para a Rede de Laboratório, SISCEL). Como esperado, a proporção de pacientes com viremia indetectável pode variar em maior ou menor extensão de acordo com o Serviço Clínico analisado (Vasconcellos, 1999). Na Europa (Van Vaerenbergh, 2002) foi observada uma taxa de 60% de eficácia virológica em pacientes naïve usando um primeiro esquema HAART, no período de 35.5 meses. Em nossa pequena casuística, se restringirmos a análise a pacientes com estas características, a taxa de indetectabilidade é similar (65%), embora em um período de seguimento um pouco inferior (tempo mediano de tratamento de 22 meses). É importante notar que, de maneira geral, nossos dados refletem a evolução de pacientes expostos a vários tratamentos, não sendo representativa da era HAART, mas uma situação provavelmente comum nos Serviços Públicos de Referência para DST/Aids, de onde procederam muitos pacientes deste

estudo, tendo sido submetidos a tratamentos anteriores com mono ou dupla terapia.

Nos pacientes que apresentavam viremia detectável, especialmente nos pacientes do grupo Virêmico que nunca obtiveram carga viral indetectável em sua evolução, os fatores preditores de falha terapêutica que puderam ser identificados foram a menor adesão aos ARV e baixo número de linfócitos TCD4 (abaixo de 200 céls/ $\mu$ L) no início da terapia monitorada. A associação significativa observada em nosso estudo, por análise multivariada, entre a adesão terapêutica ao primeiro esquema ARV e o ganho de linfócitos TCD4 reforça a importância da assistência aos pacientes no período inicial da terapia. No monitoramento clínico observa-se grande dificuldade em se utilizar, de forma crônica e com bons níveis de adesão, os sucessivos esquemas de combinações de drogas ARV.

A emergência de resistência genotípica, devido aos baixos níveis séricos dos medicamentos, evidencia outro importante aspecto desta complexa realidade do controle virêmico, entretanto, apesar destas dificuldades o uso dos ARV permitiu transformar a Aids em uma doença crônica manejável.

Outra questão a ser considerada é a manutenção de reservatórios virais, que apesar da eficácia terapêutica, os medicamentos atuais não conseguem erradicar (Pierson, 2000), podendo após anos de tratamento adequado haver replicação viral a partir destes reservatórios.

A falência virológica é um evento freqüente mesmo em países desenvolvidos (Deeks, 1999; Wit, 1999; Grabar, 2000). No San Francisco General Hospital, uma unidade clínica da Universidade da Califórnia, apenas

50% dos pacientes usando o primeiro esquema terapêutico com inibidor de protease, HAART, apresentaram carga viral abaixo de 500 cópias/mL na semana 48 do estudo (Deeks, 2000).

Neste vasto cenário de respostas terapêuticas observamos, entretanto, pacientes que apesar da falência virológica aos ARVs, mantêm-se clinicamente assintomáticos apresentando ganho do número de linfócitos TCD4. Nosso estudo procura analisar esta condição de controle parcial da viremia, representado pelo Grupo Atenuado, uma situação de falência virológica que parece ser suficiente para promover um certo grau de resposta imune.

Nos pacientes do grupo Atenuado observamos uma boa resposta terapêutica com significativo ganho de TCD4, menor número de eventos clínicos e menor taxa de mortalidade. Esta condição pode ser devida a habilidade do sistema imune em manter este controle parcial da viremia, refletindo a possibilidade de um sistema imune mais competente. Por outro lado, esta resposta pode ser resultante da baixa viremia, decorrente da parcial atenuação da replicação pelos ARVs. Este estudo não foi dirigido para elucidar esta questão, se a menor viremia é causa ou consequência dos melhores parâmetros imunológicos, mas documentar uma condição favorável de resposta à terapia anti-retroviral.

Quando analisamos os pacientes com falência virológica, tanto do Grupo Virêmico como do grupo Virêmico Atenuado, um dos fatores preditores do controle parcial da viremia, ou atenuação da replicação viral, foi o nível de TCD4 no início da terapia monitorada. Os pacientes do grupo Atenuado diferiram significativamente do grupo Virêmico. É possível

conjecturar, embora nossas evidências sejam apenas indicativas, que aguardar para iniciar terapia quando o nível de linfócitos TCD4 aproxima-se de 200 céls/ $\mu$ L possa ser adequado para aqueles que consigam controle virológico, aviremia. Entretanto, no caso da eventual perda deste controle, esta menor reserva imunológica pode representar um obstáculo para o sucesso terapêutico, e mesmo na menor capacidade de regenerar ou manter o repertório imunológico frente à uma viremia persistente. Se este for o caso, a introdução em estágios mais precoces do dano imunológico pode permitir uma regeneração de linfócitos TCD4 que favoreça um controle parcial da replicação. Esta questão não pode ser respondida neste estudo, mas deve ser melhor compreendida, pois é um aspecto a se considerar no manejo da terapia anti-retroviral contra HIV, sobretudo em locais de baixa complexidade de atenção. De qualquer forma, estudos recentes em um grande número de voluntários não aponta para benefícios na introdução de terapia em pacientes com níveis de TCD4 superiores à 350 céls/ $\mu$ L (Cole, 2003).

Uma resposta vigorosa TCD4 específica contra o HIV tem sido correlacionada ao controle da viremia (Rosenberg, 2000). A literatura tem descrito, que pacientes com baixos níveis de viremia apresentam um padrão de resposta específica anti-HIV mais robusto (Katlama, 2003), em especial entre aqueles com ganho de TCD4 (Price, 2003). Apesar dos estudos não definirem claramente esta relação causal, a resposta específica está presente em pacientes com baixos níveis de replicação, em valores significativamente superiores quando comparados a pacientes avirêmicos após a terapia interrompida (Mollet, 2000; Karlsson, 2004). Na verdade, a resposta imune parece ficar alterada na ausência completa de um estímulo

antigênico, encontrada em situações onde a terapia anti-retroviral suprime totalmente a viremia (Autran, 2003). Possivelmente, ao se alcançar esta indetectabilidade virêmica, reduzimos o estímulo e a manutenção da resposta imunológica anti-HIV específica (Karlsson, 2004).

Este fato pode ser um dos determinantes da falta de controle virológico observados durante interrupção programada de terapia ARV em pacientes que foram tratados por tempo adequado, e ao terem a medicação suspensa, não conseguem controlar a replicação, que rapidamente volta a níveis pré-tratamento. A interrupção, contudo, se acompanha de um aumento da resposta anti-HIV, geralmente transitória e insuficiente para o controle virêmico (Carcelain, 2001). A tentativa de sucesso por interrupções continuadas em estudos com SIV em primatas não humanos (Lori, 2000), assim como estudos iniciais em humanos (Rosenberg, 2000; Walker, 2001) têm suscitado a possibilidade de uma reeducação imunológica após exposições limitadas a viremia, em especial nos pacientes com infecção aguda, mas períodos de seguimentos mais longos têm mostrado que, mesmo nesta população, o controle virêmico é infreqüente (Kaufmann, 2003).

Este controle parcial pode ser um dos mecanismos que favorecem a boa evolução clínica e imunológica observada nos pacientes do grupo Atenuado. Isto leva à considerações importantes quando colocamos o paciente no contexto da terapia crônica, de atingir e manter indefinidamente um nível de indetectabilidade adequado para evitar a falha virológica, controle este que desarma alguns dos mecanismos de defesa do hospedeiro em estados virêmicos.

Embora os pacientes que atingiram um controle parcial da viremia tivessem melhores valores de linfócitos TCD4 no início da terapia monitorada, e isto possa indicar uma melhor reserva imunológica para melhor se adaptar, ou mesmo induzir um controle parcial da viremia, é importante ressaltar que nosso estudo não avaliou qual nível de linfócitos TCD4 é mais apropriado para o início da terapia. Em estudos recentes a inexistência de uma vantagem adicional para início de terapia em pacientes com TCD4 acima de 350 céls/ $\mu$ L, têm sido relatados (Cole, 2003). Geralmente pacientes naïve aos ARVs apresentam uma resposta terapêutica mais adequada que os pacientes com exposição prévia.

Uma outra possibilidade para explicar a melhor evolução dos pacientes do grupo Virêmico Atenuado seria o fato destes estarem em uma fase mais precoce da condução terapêutica, mas, embora um seguimento maior seja necessário para elucidar este aspecto, os pacientes deste grupo apresentaram a maior mediana do tempo de seguimento entre os três grupos, onde 75% foram seguidos por mais de 56 meses.

Outros fatores, como taxa de apoptose, tem sido associados à ausência de ganho de células TCD4 independentemente do nível de viremia (Pitrak, 2001), e modificações nesta taxa em casos de controle parcial podem também ter um papel no ganho de TCD4 observado nesses pacientes.

Estudos imunológicos realizados em pacientes que apresentavam uma resposta discordante à terapia (D'Etorre, 2002), sugerem uma menor frequência de isolamento viral, assim como melhores parâmetros imunológicos, que podem significar tanto um potencial mecanismo que

permite o controle da patogênese e a regeneração celular nesta situação virêmica, como serem apenas um reflexo de um estado favorável. De qualquer forma, diferentes estudos estabelecem uma associação entre a supressão da resposta imunológica TCD4 proliferativa específica ao HIV com níveis elevados de viremia (Binley, 2000; McNeil, 2001), e sua diminuição, mesmo que parcial, pode beneficiar o paciente, permitindo um reequilíbrio na homeostase e competência imunológica. Em recentes estudos do grupo de Brigitte Autran a avaliação da resposta específica anti-HIV, em pacientes com elevados níveis de HIV RNA plasmático, demonstrou padrões de baixa resposta, assim como entre pacientes avirêmicos, com diferenças significativas em relação àqueles com viremia em níveis intermediários (Katlama, 2003).

Um fator que não pode ser minimizado é o papel patogênico da ativação imunológica (Ostrowski, 1998), em especial ativação de células TCD4+ (Giorgi, 1999; Hunt, 2003). Este estado prejudicial é induzido pelos níveis de viremia e estão associados à progressão para Aids, mesmo se anteriores à infecção aguda (Hazenberg, 2003). As observações realizadas em nosso estudo onde foram verificados níveis elevados de VHS no início do seguimento, sendo este um fator inespecífico de atividade inflamatória assim como de B2 microglobulina e Imunoglobulinas, e sua queda após o controle da viremia podem refletir esta reversão do estado de ativação associado ao controle da viremia. Os fatores que determinam a tendência de normalização destes parâmetros imunológicos e inflamatórios, em especial em pacientes com aviremia, mas também em menor escala entre os pacientes com controle parcial, são provavelmente secundários à queda dos níveis

virêmicos. Alguns fatores específicos tem sido ainda descritos, como proteínas estimuladoras de células B da família dos fatores de necrose tumoral, que parecem aumentar durante a progressão da doença e ter um papel na hipergamaglobulinemia observada na infecção pelo HIV (Rodriguez, 2003). Em um estudo de 1993, quando exames mais sofisticados, como carga viral e citometria, não eram disponíveis, alguns destes parâmetros foram sugeridos como auxiliares na condução destes pacientes (Schwartlander, 1993). É possível que alguns destes exames, como o VHS de execução mais simples, possam contribuir no monitoramento clínico-laboratorial em ambientes de recursos limitados. A associação do controle parcial com valores menores de VHS à entrada, observados em nosso estudo, podem sugerir um menor grau de atividade imunológica/inflamatória. Embora seja um método inespecífico para avaliar resposta imune, níveis maiores de VHS na entrada e menor queda foram observados nos pacientes do grupo Virêmico, podendo representar um preditor de casos mais graves, que necessitam de atenção especial, eventualmente contribuindo nas situações com recursos laboratoriais limitados.

Os regimes terapêuticos associados ao melhor benefício clínico não podem ser analisados neste estudo. Nós tentamos avaliar a associação de regimes contendo inibidores de protease (IP) ao benefício clínico, como realizado por Deeks e colaboradores, em San Francisco. Em vários pacientes com controle parcial da viremia (grupo Atenuado), regimes não contendo IP foram observados, como o uso de NNRTI e esquemas de terapia dupla com 2 NRTI. Como esperado, IP na terapia de resgate foi mais



freqüente entre pacientes com falência virológica. Pacientes do grupo Virêmico tenderam a ser mais agressivamente tratados, em uma tentativa de introduzir uma terapia de resgate mais potente sempre que os pacientes apresentaram pior resposta, como ao observar queda dos níveis de linfócitos TCD4. Nestes casos os esquemas incluíram em geral IP, combinações de IP ou 3 classes de drogas. Nenhuma comparação formal entre terapias pode ser obtida neste desenho de estudo. Os grupos foram determinados baseando-se na resposta virológica e este estudo, de caráter observacional não foi randomizado. Uma das observações que podemos relatar é que os regimes sem IP também podem induzir à favorável ganho de linfócitos TCD4 e resposta clínica, mas a extensão e durabilidade deste benefício não puderam ser avaliadas. Estudo com meta análise comparando resgates terapêuticos com base em IP ou NNRTIs associando estes medicamentos ao ganho de TCD4 (Owen, 2004), demonstrou uma melhor regeneração do número de células entre aqueles com regimes que incluíram IP.

Este é um estudo observacional de um pequeno número de pacientes, tratados por diferentes médicos, sem um controle efetivo sobre os regimes terapêuticos prescritos, apresentando dessa forma muitas limitações. Uma destas limitações é o fato de não termos dados da viremia antes do tratamento de todos estes pacientes, mas em vez de determinações diretas tivemos que gerar um valor hipotético virológico, definido a partir de maiores valores obtidos em algum ponto do seguimento. Determinações pré tratamento seriam os melhores marcadores, uma vez que estes valores durante um tratamento em falência podem artificialmente reduzir os níveis de viremia. Outro ponto que precisa ser considerado é o

fato da Aviremia ter sido definida como CV<500 cópias/mL, e portanto inclui pacientes com diferentes níveis de controle da replicação viral.

Como esperado, a progressão para doenças definidoras de AIDS foi mais freqüente entre pacientes do grupo com Viremia mantida. Embora dois casos de óbito tenham ocorrido entre pacientes com viremia indetectável, ambos faleceram durante internação hospitalar com acesso regular a ARV. A esperada, (mas não documentada neste estudo) adesão neste período de internação pode ter sido determinante para a manutenção deste período de aviremia. Em um destes casos, ganho de linfócitos TCD4 e aviremia foram observados durante o monitoramento de resgate com sucesso ARV, antes que sintomas e alterações laboratoriais sugestivas de acidose láctica tenham levado à suspensão da medicação ARV, sem sucesso contudo, para reverter as alterações metabólicas que levaram ao óbito.

Em relação ao padrão de resistência aos medicamentos ARV, embora as diferenças nesta pequena coorte não sejam significantes, o grupo Avirêmico apresentou menor número de mutações relacionadas à resistência, eventualmente facilitando a terapia de resgate. A presença de mutações na posição D30 da protease, uma mutação específica do nelfinavir, foi rara. Esta mutação foi observada em dois pacientes avirêmicos, ambos com satisfatório resgate terapêutico. Ausência de mutações para NNRTI foi também associada à viremia indetectável. As distintas situações ARV e o pequeno número de casos não permitem qualquer relação do perfil de mutações e a predição de uma adequada terapia de resgate. O perfil de mutações encontrado em nosso estudo foi

extenso, mas o desenho do estudo limita uma análise mais detalhada. É interessante notar, entretanto, que a proporção de códons mutados é maior no grupo Virêmico Atenuado do que no grupo Virêmico, exceto nos códons relacionados à resistência aos NNRTI. O resíduo M184 foi o mais freqüente entre as mutações relacionadas à RT, apesar de não significativo nesta pequena amostragem (50% x 27%), entre pacientes virologicamente atenuados. Estes achados também foram observados em alguns estudos de pacientes com aumento de linfócitos TCD4 a despeito da falência virológica (Antinori, 2001; Croteau 1997), mas não em outros (D'Etorre, 2002). Estas diferenças podem ser decorrentes da complexidade da evolução destes padrões de mutação, onde mutações que prejudicam a capacidade replicativa viral ("fitness") são compensadas por mutações secundárias que compensam mudanças estruturais prejudiciais. Em animais, a mutação no códon M184 induzida por anti-retrovirais está associada a um menor "fitness" viral (Von Rompay, 2002), mas sem clara associação com evolução clínica. O papel desta e outras mutações no "fitness" viral, um potente mecanismo para a atenuação da replicação viral (Nijhuis, 2001), necessita ser melhor compreendido, quanto às possíveis implicações nas estratégias de resgate terapêutico. Polimorfismos, detectados em pacientes brasileiros sem exposição terapêutica como no códon M36 e L63 são freqüentes (Rodrigues, 2001), e apresentaram uma similar distribuição nos três grupos. A relação entre "fitness" e genoma viral tem como melhor documentação a infecção de um grupo de pacientes usuários de banco de sangue australiano que se infectaram com uma variante que apresentava deleções no gene Nef do HIV-1 (Learmont, 1999). Modificações no "fitness" viral podem estar

envolvidas no controle parcial da viremia, com uma melhor restauração de linfócitos TCD4 e evolução clínica deste grupo, mas não devemos desconsiderar os inúmeros outros fatores do hospedeiro que podem estar relacionados à esta atenuação.

O grande número de pacientes em uso de anti-retrovirais no Brasil e a variabilidade das condições de atendimento na rede pública e privada requerem que mecanismos e estratégias de políticas de saúde intensifiquem suas ações no suporte a estes indivíduos, e que o conhecimento mais detalhado destas situações possa ser analisado constantemente. Certos padrões de mutação, embora associadas à resistência virológica e manutenção de replicação viral, talvez possam influenciar a patogênese viral, favorecendo a manutenção do repertório de células imunocompetentes, com decorrente menor morbidade e mortalidade associada ao HIV.

A quantificação de linfócitos TCD4 e viremia plasmática, como marcadores de dano imunológico e replicação viral, provém adequado monitoramento de terapia ARV. Com o advento do seqüenciamento genético da *polimerase* do HIV para avaliação de resistência genotípica, acrescentaram-se informações que permitem uma melhor escolha do regime terapêutico, mas para a maioria dos pacientes estes conceitos são irrealis. Na atual situação de limitado número de agentes anti-retrovirais, com extenso perfil de resistência cruzada, mudar a terapia toda vez que a viremia torna-se detectável em pacientes expostos à diferentes regimes ARV pode não ser sempre efetiva.

A busca de parâmetros laboratoriais que permitam a compreensão dos mecanismos envolvidos na patogênese viral e a

capacidade de reconstituição do sistema imunológico é de fundamental importância na avaliação e monitoramento dos indivíduos portadores de infecção pelo HIV. Estudos maiores e controlados em serviços clínicos no sistema público de saúde nacional podem contribuir sobremaneira na orientação de estratégias terapêuticas. Este estudo representa uma situação que não é rara e se melhor caracterizada pode auxiliar no manejo clínico de pacientes com infecção pelo HIV.

Em um cenário mundial de crescente número de casos de Aids, sobretudo em áreas de pouco ou nenhum acesso a saúde ou medicamentos, torna-se importante desenvolver estudos que permitam entender melhor as modalidades terapêuticas e seu impacto no controle da infecção, refletindo em políticas públicas de saúde que atendam as características culturais, econômicas e sócio demográficas por onde a epidemia avança.

## 6 CONCLUSÕES

- Avaliar, de forma sistemática, com os recursos disponíveis na Rede Pública de Saúde, a evolução clínico-laboratorial de pacientes com infecção pelo HIV é fundamental para o aprimoramento das estratégias públicas de atenção a saúde de indivíduos infectados pelo HIV;
- Os pacientes avirêmicos apresentaram um maior ganho do número de linfócitos TCD4 e menor número de eventos clínicos relacionados a AIDS, em relação ao grupo Virêmico;
- Dentre os pacientes do grupo Virêmico, um sub-grupo de pacientes apresentou redução da viremia superior a 1 log<sub>10</sub> em relação aos níveis pré terapia monitorada. Esta sub-população, aqui denominada de grupo Virêmico Atenuado, apresentou, durante o tempo de seguimento e de terapia monitorada, uma resposta favorável quanto ao ganho de TCD4 e parâmetros clínicos;
- A adesão aos medicamentos foi independentemente associada, em análise multivariada, ao ganho de TCD4 após uso de terapia ARV indicando que atividades de atenção e assistência nesta área devem ser prioritariamente implementadas como fator determinante para uma resposta clínica satisfatória;

- A velocidade de eritrossedimentação e o número de células TCD4 na Entrada foram preditores para os pacientes do Grupo Virêmico apresentarem controle parcial da viremia plasmática ;
- A quantificação de linfócitos TCD4 é um bom parâmetro para prever o risco de evolução, mas marcadores alternativos e de uso simplificado devem ser melhor estudados pois podem contribuir na ampliação do acesso à saúde. Em nosso estudo os níveis de VHS apresentaram correlação com boa evolução clínica e ganho de TDC4;
- Certos padrões de mutação, como a presença da mutação no códon M184 da RT, embora associadas à resistência virológica aos ARV e manutenção de replicação viral, talvez tenham papel na patogênese viral, modulando o “fitness” e eventualmente contribuindo no controle imunológico do HIV-1;
- Os diferentes aspectos relacionados aos mecanismos de ação dos medicamentos ARV sobre o vírus e sua interferência sobre a resposta imune necessitam ser melhor esclarecidos, em especial nas situações reais da prática clínica, permitindo o entendimento da imunopatogênese do HIV e subsidiando estratégias terapêuticas de longo prazo.

## TABELAS E FIGURAS

**TABELA 1:** DADOS DEMOGRÁFICOS, POR GRUPOS DE EFICÁCIA VIROLÓGICA.

mediana (IQR)	Avirêmico N=56	Virêmico Atenuado N=33	Virêmico N=59
<b>Idade, anos</b>	36 (31- 41)	38 (31-41)	36 (32-44)
<b>Sexo Masculino</b>	68%	61%	71%
<b>Assintomático à Entrada</b>	73%	72%	58%
<b>Tempo Seguimento (meses)</b>	53 (35, 85)	66 (56, 93)	57 (42, 84)
<b>Tempo ARV monitorado (meses)</b>	43 (28, 5,3)	45 (35, 56)	37 (30, 51)
<b>TCD4 Entrada* (cél/s/μL)</b>	330 (178, 573)	409 (281, 667)	316 (111, 481)
<b>Viremia pré-terapia ARV</b>	4.83 (4.03, 5.48)	4.98 (4.5, 5.24)	4.88 (4.25, 5.28)

A Tabela 1 apresenta os dados demográficos por Grupo de eficácia virológica; Idade (mediana, e limites interquartilés, IQR, 25, 75); Sexo , em percentagem de pacientes do sexo masculino; Assintomático à Entrada em percentagem de pacientes que se apresentavam assintomáticos ao entrarem no Serviço; Tempo Seguimento como tempo, em meses, da Entrada no Serviço à última visita ( IQR); Tempo ARV monitorado como tempo, em meses, do início da terapia monitorada à última visita ao Serviço,( IQR); TCD4 Entrada em número de CD4 por μL na Entrada no Serviço, (IQR), Viremia pré-terapia ARV (valor em Log<sub>10</sub> e IQR de RNA plasmático do HIV-1, anterior a introdução de terapia ARV monitorada). A definição dos grupos foi baseada nas duas últimas determinações de viremia plasmática em AVIR (Avirêmicos, HIV RNA plasmático <500 cópias/mL, supressão completa); ATT (Virêmicos Atenuados, HIV RNA plasmático >500 cópias/mL, com redução >1 log<sub>10</sub>, supressão virológica parcial); e VIR (Virêmicos, HIV RNA plasmático >500 cópias/mL, viremia mantida).



**TABELA 2 - PERCENTAGEM DE PACIENTES, POR ESTRATOS DE VALORES DE TCD4, EM TRÊS TEMPOS DO SEGUIMENTO (ENTRADA, PRÉ-ARV E ATUAL), POR GRUPOS DE EFICÁCIA VIROLÓGICA.**

TCD4		Avirêmico N=56	Virêmico Atenuado N=33	Virêmico N=59
<b>TCD4 &lt;200</b>	Entrada	29%	12%	34%
	Pré- ARV	40%	26%	56%
	Atual	5%	9%	53%
<b>TCD4 200 – 350</b>	Entrada	25%	18%	24%
	Pré- ARV	28%	23%	27%
	Atual	7%	21%	17%
<b>TCD4&gt;350</b>	Entrada	46%	70%	42%
	Pré- ARV	29%	52%	18%
	Atual	86%	64%	31%

*A Tabela 2 apresenta a percentagem de pacientes em cada estrato (CDC) de número de células TCD4 (céls/μL) na Entrada, no início de tratamento (Pré-ARV) e na última determinação (Atual), por Grupo de eficácia virológica.*

**TABELA 3** - VALORES DE TCD4 NA ENTRADA, PRÉ-ARV E ATUAL E GANHO DE TCD4 DURANTE OS TEMPOS DE MONITORAMENTO (TM) E SEGUIMENTO (TS), POR GRUPOS DE EFICÁCIA VIROLOGICA.

<b>Mediana (IQR)</b>	<b>Avirêmico N=56</b>	<b>Virêmico Atenuado N=33</b>	<b>Virêmico N=59</b>
<b>TCD4 Entrada</b> (céls/μL)	330 (178, 573)	409 (281, 667)	316 (111, 481)
<b>TCD4 pré-ARV</b> (céls/μL)	269 (112-396)	353 (204-456)	185 (73-307)
<b>TCD4 Atual</b> (céls/μL)	650 (463, 736)	566 (285, 703)	194 (89, 412)
<b>Ganho TCD4 TS</b> (céls/μL)	241 (49,431)	79 (-96, 263)	- 50 (-253,149)
<b>Ganho TCD4 TS</b>	0,15 céls/dia	0,04 céls/dia	- 0.03 céls/dia
<b>Pacientes com perda TCD4</b>	18%	28%	58%
<b>Ganho TCD4 TM</b> (céls/μL)	320 (164, 512)	167 (74, 388)	34 (-38, 196)
<b>Ganho TCD4 TM</b>	7.4 céls/dia	3.7 céls/dia	0.03 céls/dia
<b>Pacientes com perda TCD4</b>	2%	13%	38%

A Tabela 3 apresenta os parâmetros relativos as células TCD4 por grupo de resposta virológica, os valores de TCD4 (céls/μL) na Entrada, pré-ARV e na ultima determinação (Atual). O ganho absoluto de TCD4, por dia de seguimento (período entre entrada e ultima determinação), a percentagem de pacientes com perda (valor atual menor que valor de entrada) neste período; e similar análise para o período de tratamento monitorado (TM), com ganho mediano (IQR), número de células TCD4 ganhas por dia em tratamento, e a percentagem de pacientes com perda no período.

**TABELA 4** - VALORES DE PARÂMETROS IMUNOLÓGICOS E INFLAMATÓRIOS NA ENTRADA E NA ÚLTIMA OBSERVAÇÃO (ATUAL), POR GRUPO DE EFICÁCIA VIROLÓGICA.

	<b>Avirêmico N=56</b>	<b>Virêmico Atenuado N=33</b>	<b>Virêmico N=59</b>
<b>VHS</b>			
<b>Entrada</b>	21 (9, 41)	23 (9, 37)	38 (22, 54)
<b>VHS Atual</b>	19 (11, 34)	18 (10, 39)	50 (20, 84)
<b>B2 Entrada</b>	3 (2.2 ,3.9)	3 (1.8, 4.3)	2.8 (1.9, 4.1)
<b>B2 Atual</b>	2.1 (1.8, 2.8)	2.7 (2.1, 3.8)	3.3 (2.5, 3.9)
<b>IgA Entrada</b>	306 (245, 478)	340 (224, 573)	344 (214, 548)
<b>IgA Atual</b>	297 (209, 405)	258 (190, 335)	368 (233, 556)
<b>IgG Entrada</b>	2100 (1797, 2960)	2137 (1900, 2685)	2237 (1849, 3104)
<b>IgG Atual</b>	1423 (1268, 1803)	1585 (1227, 2323)	1793 (1595, 2545)

*A Tabela 4 apresenta os valores de VHS, B2, Imunoglobulinas (IgA e IgG) na Entrada e na última observação (Atual), por grupo de eficácia virológica.*

**TABELA 5** - RESULTADO DA ANÁLISE ESTATÍSTICA, POR TWO SAMPLE TTEST, ENTRE O GRUPO AVIRÊMICO E VIRÊMICO, POR GRUPO DE EFICÁCIA VIROLÓGICA.

	<b>AVIR</b>	<b>ATT + VIR</b>	<b>valor p</b>
<b>Idade</b>	36.3	37.7	0.2865
<b>CD4 entrada</b>	399.33	379.29	0.6786
<b>CD4 pre-ARV</b>	276.02	247.63	0.3527
<b>T início T1</b>	738.48	877.72	0.3557
<b>TT</b>	1226.3	1229.6	0.9663
<b>TS</b>	1933.9	2017.1	0.6402
<b>VHS Entrada</b>	27.34	35.09	0.1043
<b>Adesão ARV</b>	33/55	44/87	0.272
<b>Naive</b>	26/56	26/90	0.031
<b>N Trat</b>	30/56	30/92	0.012
<b>Ganho TCD4</b>	356.64	116.62	0.0000

A Tabela 5 mostra a análise two sample relacionando as medias das variáveis dos Grupos Avirêmico e Virêmico (Virêmicos e atenuados). TS significa tempo de seguimento, da data de Entrada ate a ultima observação. TM significa tempo de tratamento monitorado, do inicio da Terapia ARV monitorada ate a ultima observação. Naive refere-se a pacientes que nunca receberam terapia ARV. NTrat significa número de regimes terapêuticos que o paciente utilizou durante o tempo avaliação do estudo. Ganho TCD4 é a diferença absoluta entre o valor de TCD4 na última observação e no início do tratamento monitorado.

**TABELA 6A** - RESULTADO DA ANÁLISE ESTATÍSTICA, POR TWO SAMPLE TTEST, ENTRE O GRUPO ATENUADO E VIRÊMICO.

	<b>ATT</b>	<b>VIR</b>	<i>valor p</i>
<b>Ganho CD4</b>	213.22	62.18	0.001
<b>VHS entrada</b>	24.13	41.09	0.038

**TABELA 6B** - ANÁLISE DE REGRESSÃO LINEAR PARA AVALIAR PREDITORES DE GANHO TCD4.

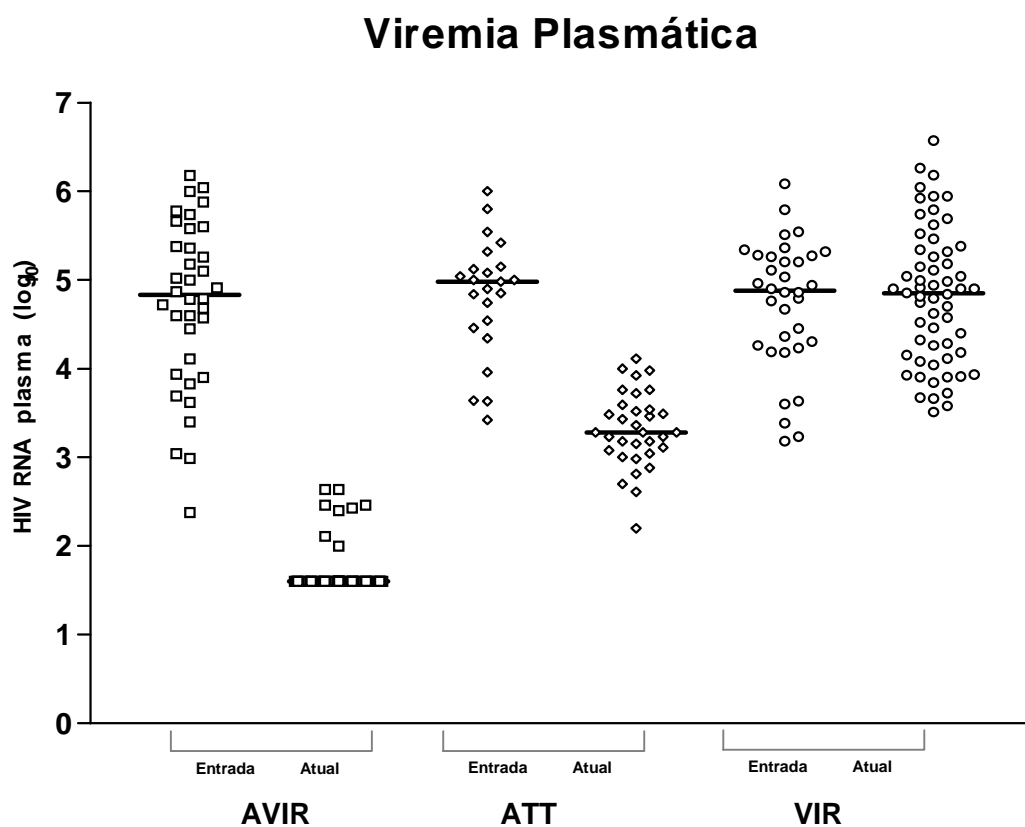
<b>Adesão ARV</b>	<b>VIR + ATT + VIR</b>	<i>valor p</i>
		<b>0.0010</b>

**TABELA 7 - PERCENTAGEM DE PACIENTES ESTRATIFICADOS POR EXPOSIÇÃO PRÉVIA À TERAPIA ANTI-RETROVIRAL, POR GRUPO DE EFICÁCIA VIROLÓGICA.**

	<b>Avirêmico N=56</b>	<b>Virêmico Atenuado N=33</b>	<b>Virêmico N=59</b>
<b>Utilizou 2 ou menos regimes ARV</b>	20%	15%	4%
<b>Utilizou 3 ou mais regimes ARV</b>	66%	79%	92%

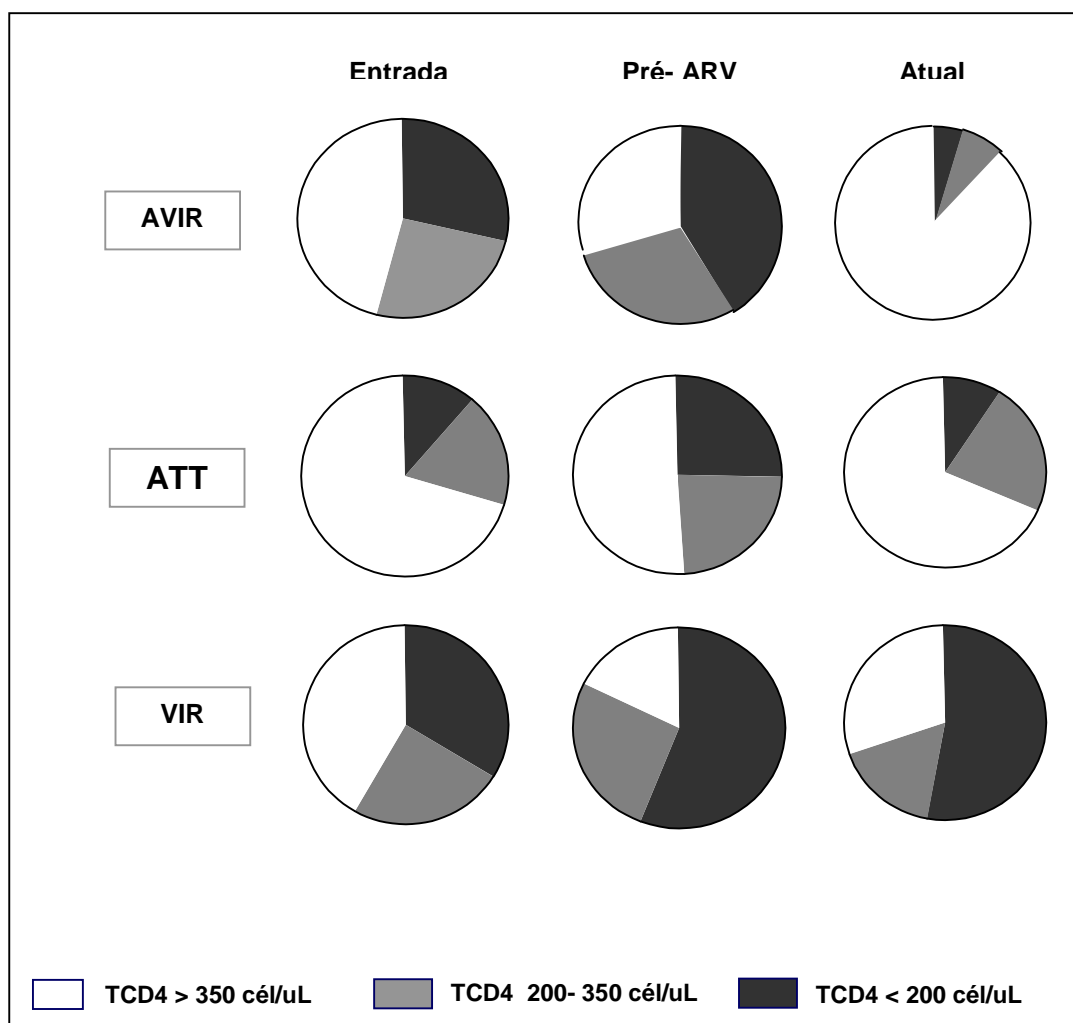
*A Tabela 7 apresenta o percentual de pacientes expostos a 2 ou menos regimes terapêuticos e três ou mais regimes, no início do estudo.*

**FIGURA 1 - QUANTIFICAÇÃO DE HIV-1 RNA PLASMÁTICO À ENTRADA NO SERVIÇO E NA ÚLTIMA VISITA, POR GRUPO DE EFICÁCIA VIROLÓGICA.**



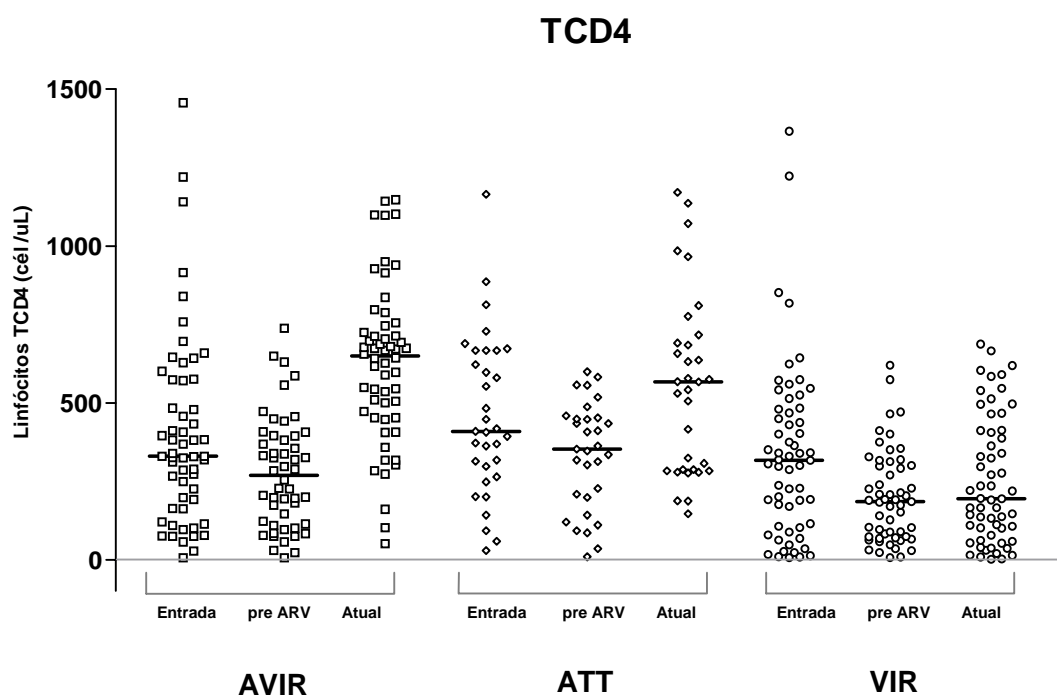
*A Figura 1 apresenta os níveis de RNA plasmático do HIV-1, em log<sub>10</sub>.*

**FIGURA 2 - PROPORÇÃO DE PACIENTES, POR GRUPOS DE EFICÁCIA VIROLÓGICA E POR NÍVEIS DE TCD4 (BRANCO, TCD4 ACIMA DE 350, CINZA, TCD4 ENTRE 200-350 E PRETO, TCD4 ABAIXO DE 200 CÉLS/ $\mu$ L) NA ENTRADA, PRÉ-ARV E ATUAL.**

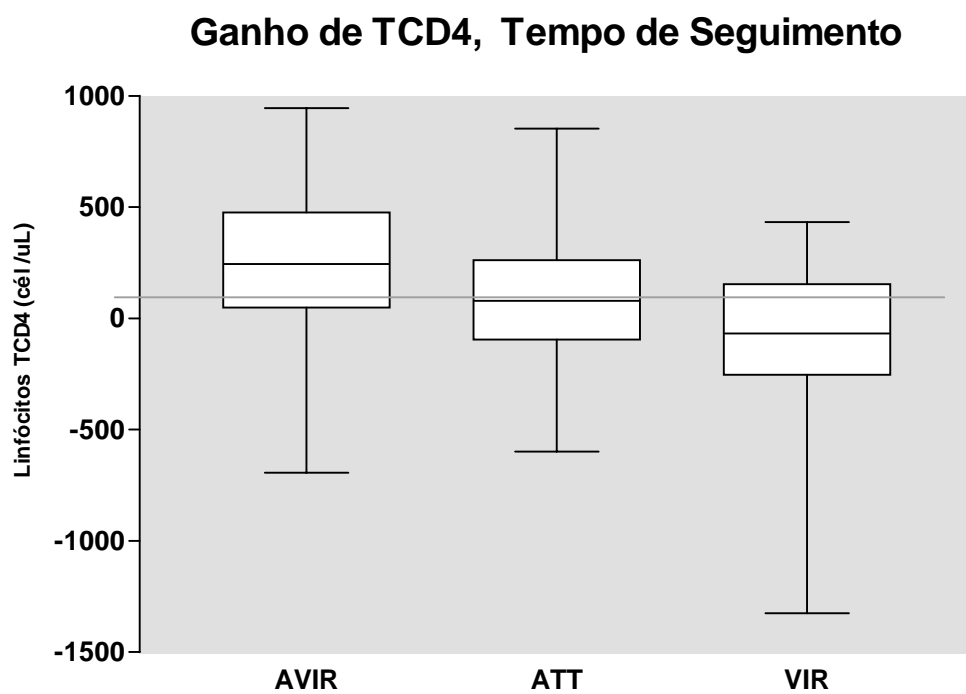




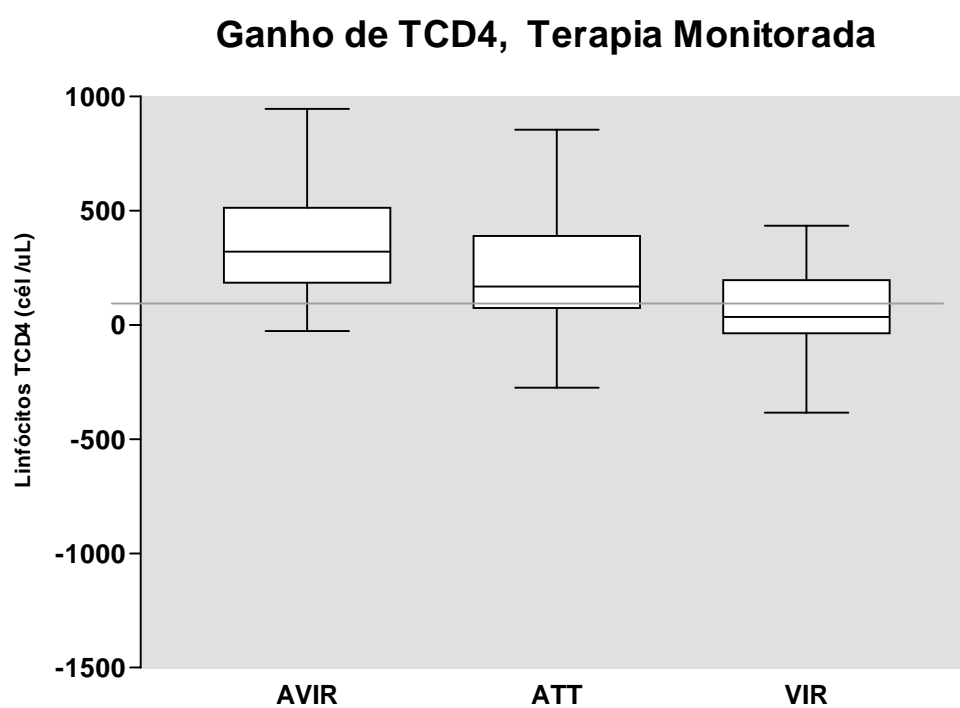
**FIGURA 3 - EVOLUÇÃO DA QUANTIFICAÇÃO DE TCD4 NA ENTRADA, PRÉ-TERAPIA ARV E ATUAL, POR GRUPO DE EFICÁCIA VIROLÓGICA.**



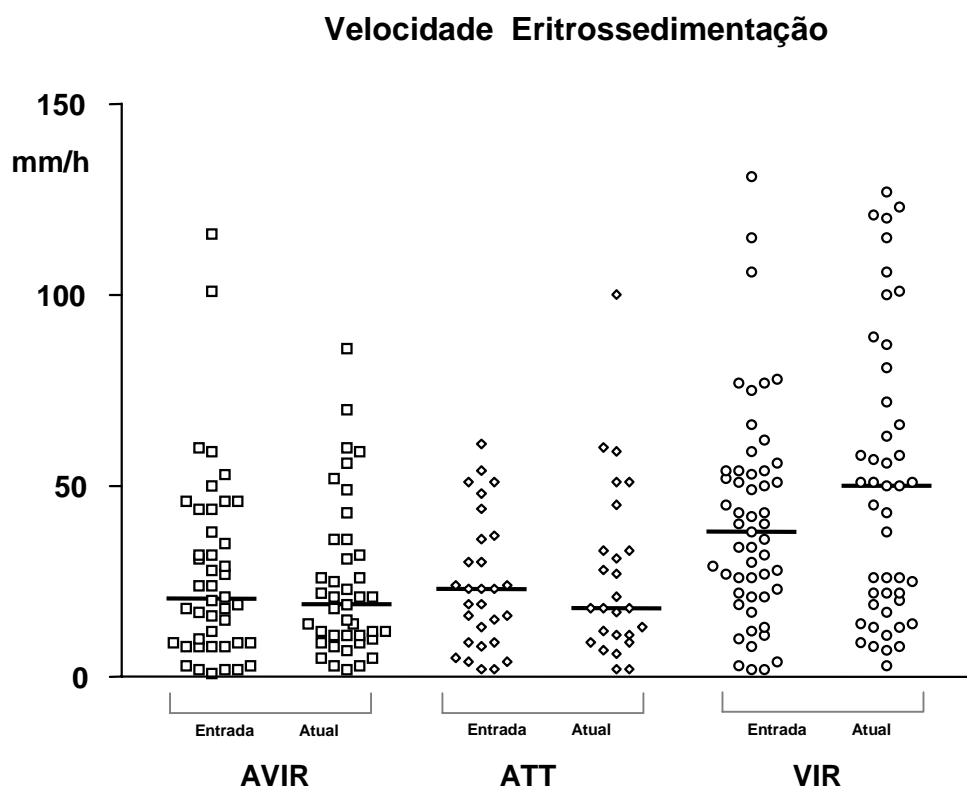
**FIGURA 4 - GANHO ABSOLUTO DE LINFÓCITOS TCD4 DURANTE O TEMPO DE SEGUIMENTO, POR GRUPO DE EFICÁCIA VIROLÓGICA.**



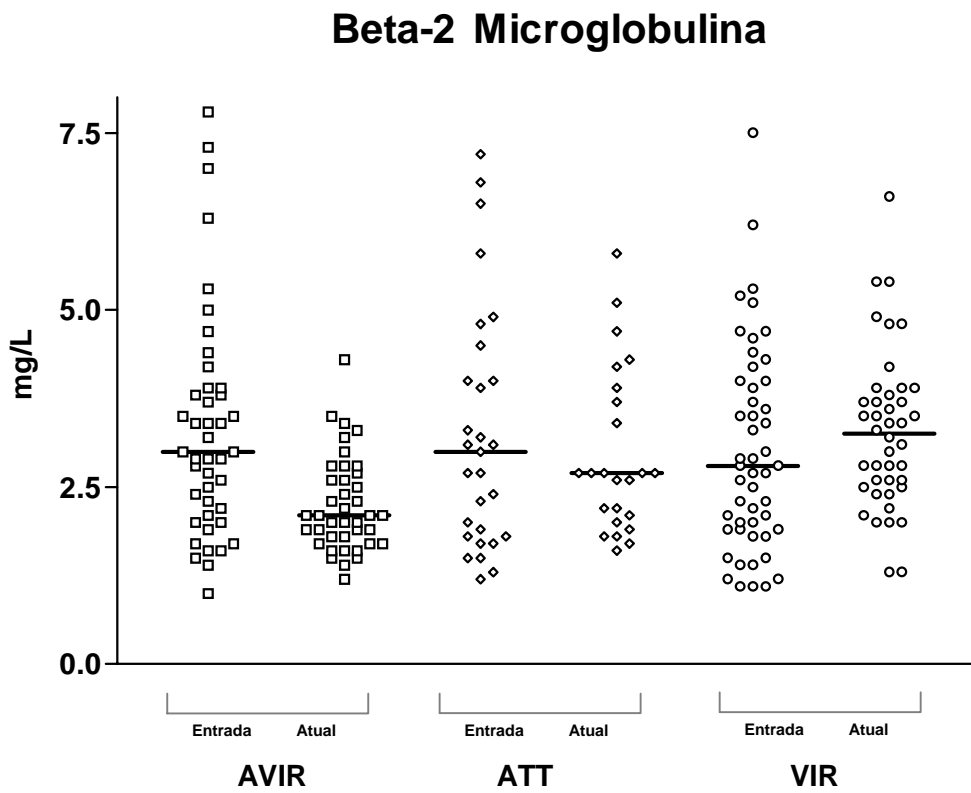
**FIGURA 5 - GANHO ABSOLUTO DE LINFÓCITOS TCD4 DURANTE A TERAPIA MONITORADA, POR GRUPO DE EFICÁCIA VIROLÓGICA.**



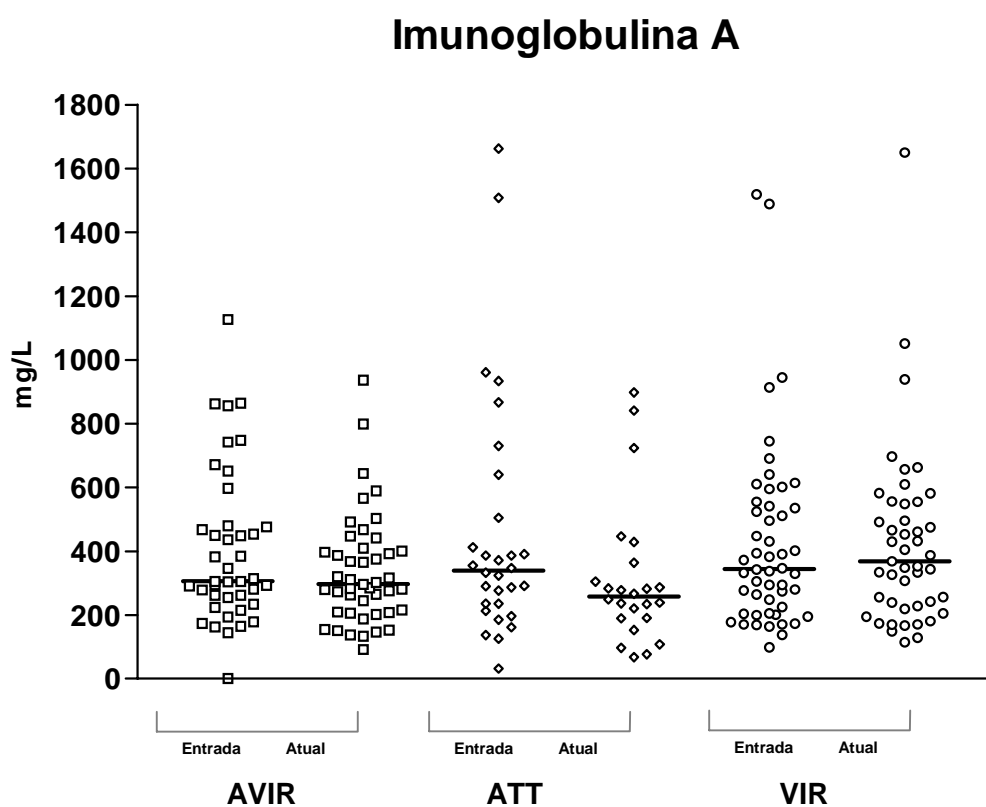
**FIGURA 6 -** VELOCIDADE DE ERITROSSEDIMENTAÇÃO (VHS), (MM/1H) NA ENTRADA E ATUAL, POR GRUPO DE EFICÁCIA VIROLÓGICA.



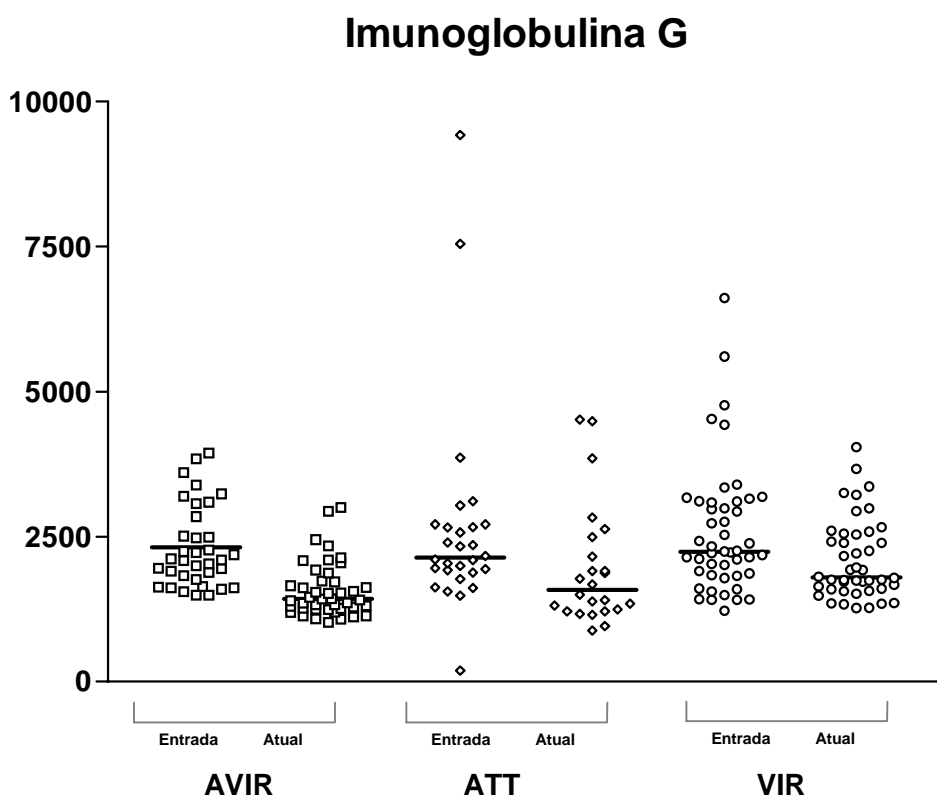
**FIGURA 7 - BETA-2- MICROGLOBULINA ( $\beta$ 2M) NA ENTRADA E ATUAL, POR GRUPO DE EFICÁCIA VIROLÓGICA.**



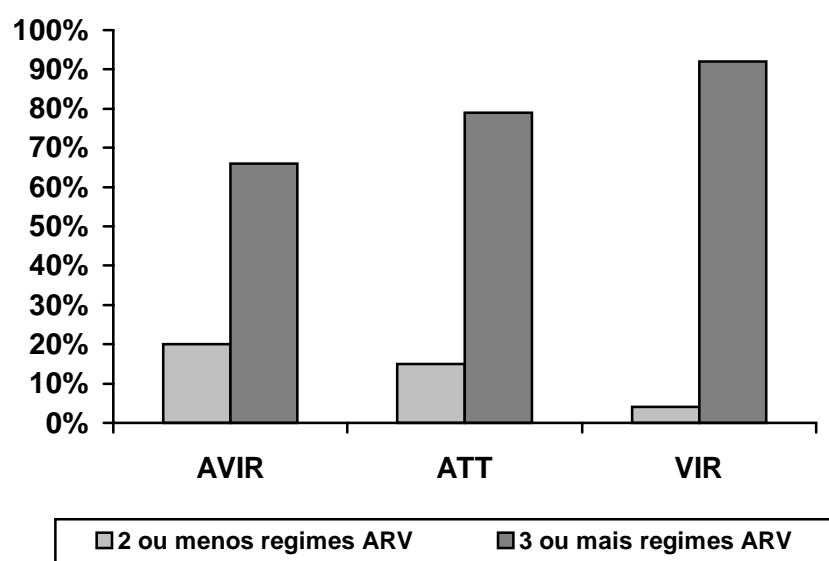
**FIGURA 8 - IMUNOGLOBULINA A (IGA) NA ENTRADA E ATUAL, POR GRUPO DE EFICÁCIA VIROLÓGICA.**



**FIGURA 9 - IMUNOGLOBULINA G (IGG) NA ENTRADA E ATUAL, POR GRUPO DE EFICÁCIA VIROLÓGICA.**

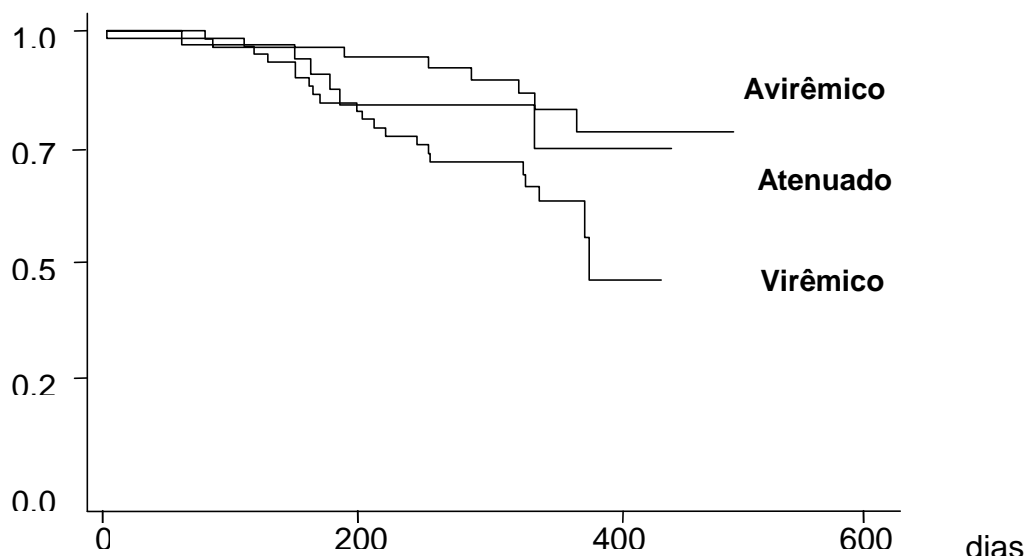


**FIGURA 10** - HISTÓRICO DE USO DE TERAPIA ANTI-RETROVIRAL, POR GRUPO DE EFICÁCIA VIROLÓGICA.



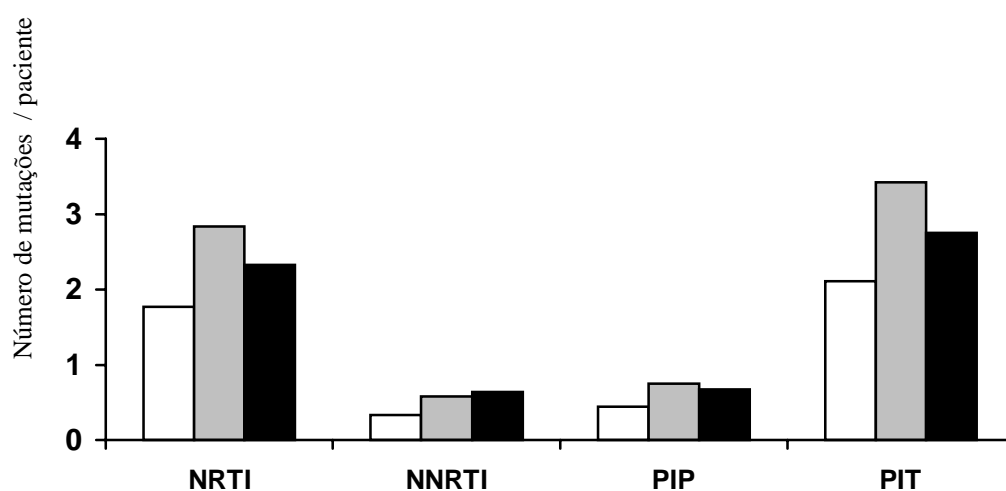


**FIGURA 11 - CURVA DE KAPLAN-MEIER, PARA EVENTOS DEFINIDORES DE AIDS NO TEMPO DE SEGUIMENTO (TS).**



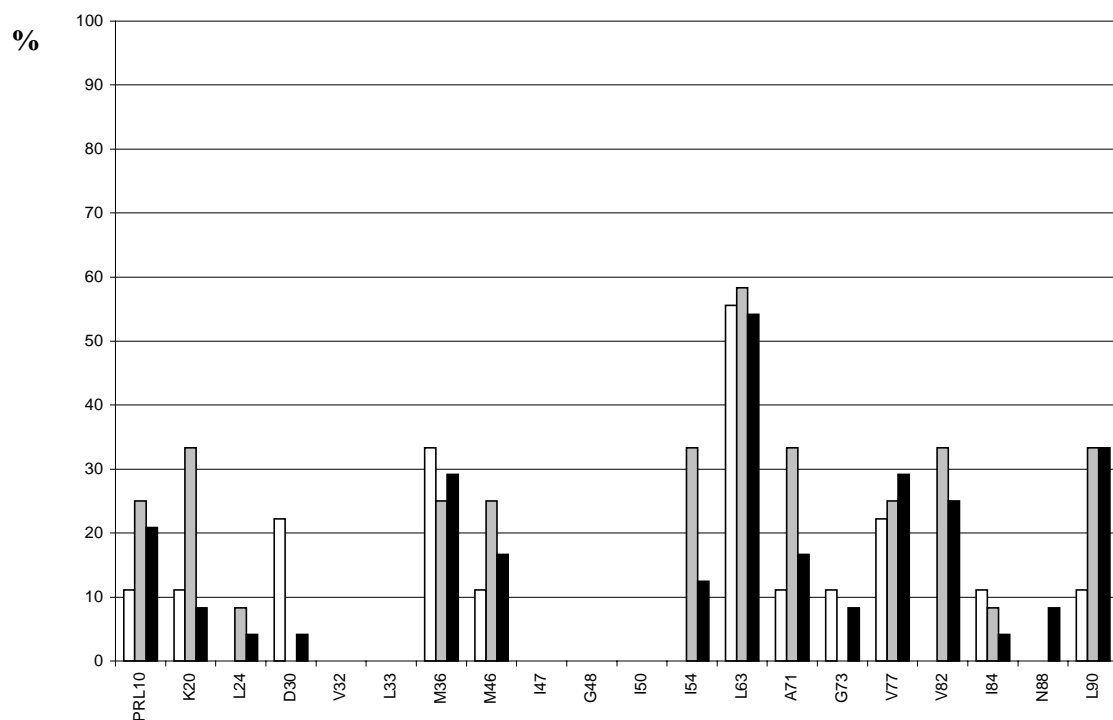
*A Figura 11 mostra a Curva de Sobrevivência, Kaplan Mayer, para eventos definidores de Aids, analisado da data de Entrada no Serviço a data da ultima observação, por Grupo de eficácia virológica. A incidência de condições clínicas definidoras de Aids foi significativamente maior no Grupo Virêmico (Cox regression teste,  $p < 0.001$ ).*

FIGURA 12 - NÚMERO MÉDIO DE MUTAÇÕES, POR PACIENTE, NOS GENES DA PROTEASE E TRANSCRIPTASE REVERSA DO HIV-1.



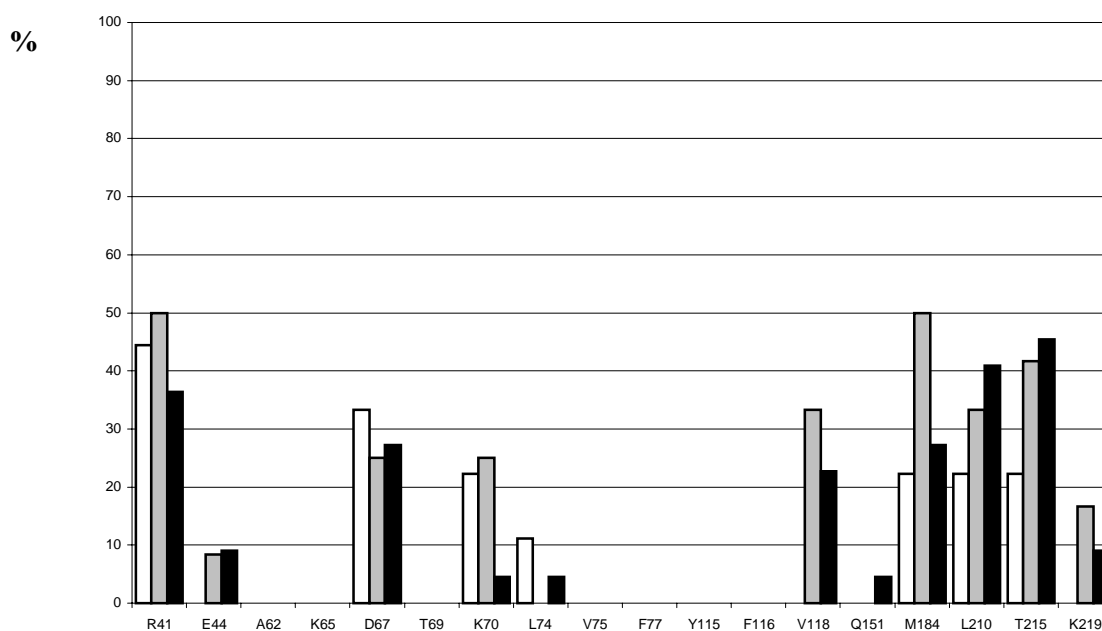
A Figura 12 mostra o número médio de mutações, por paciente, para a classe dos Análogos Nucleosídeos (NRTI); Análogos Não-Nucleosídeos (NNRTI) e para os Inibidores da Protease (IP), PIP significa mutações principais da protease. As colunas representam os Grupos de eficácia virológica: branco (AVIR); cinza (ATT) e preto (VIR).

**FIGURA 13 - PREVALÊNCIA DE MUTAÇÕES EM CÓDONS DO GENE DA *PROTEASE* RELACIONADOS À RESISTÊNCIA GENOTÍPICA, NA CLASSE DOS INIBIDORES DE *PROTEASE*.**



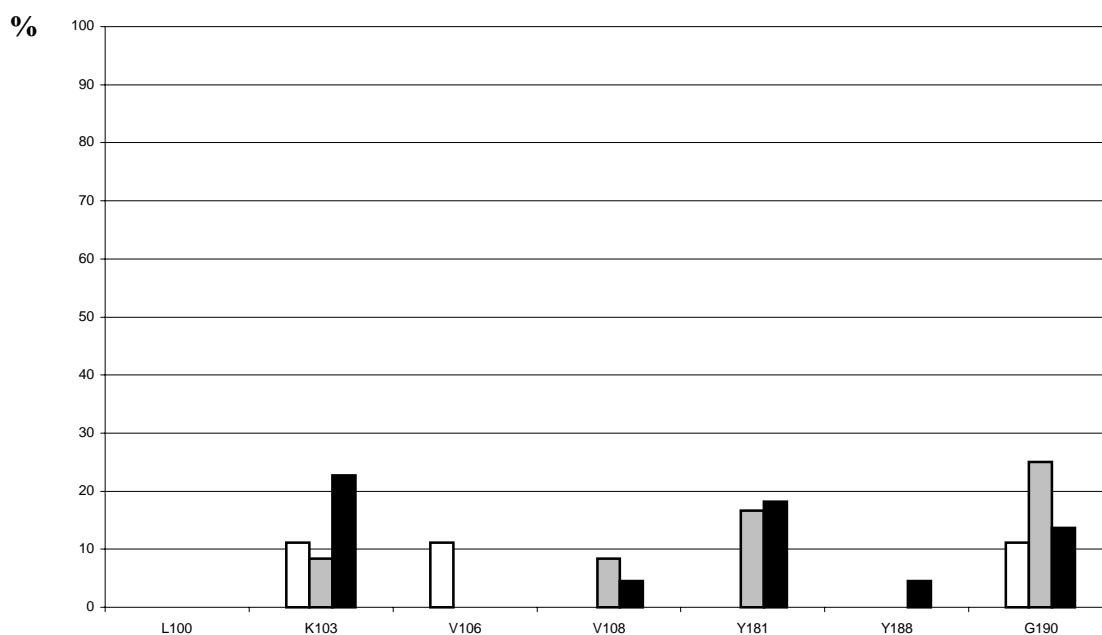
A Figura 13 mostra a porcentagem de mutações, de acordo com a definição de códons mutantes da International Aids Society (D'Aquila, 2002), para a classe dos Inibidores da Protease (IP). As colunas representam os Grupos de eficácia virológica: branco (AVIR); cinza (ATT) e preto (VIR).

**FIGURA 14 - PREVALÊNCIA DE MUTAÇÕES EM CÓDONS DO GENE DA *TRANSCRIPTASE REVERSA* RELACIONADOS À RESISTÊNCIA GENOTÍPICA, NA CLASSE DOS ANÁLOGOS NUCLEOSÍDEOS.**



A Figura 14 mostra a porcentagem de mutações, de acordo com a definição de códons mutantes da International Aids Society (D'Aquila, 2002), para a classe dos Análogos Nucleosídeos (NRTI). As colunas representam os Grupos de eficácia virológica: branco (AVIR); cinza (ATT) e preto (VIR).

**FIGURA 15 - PREVALÊNCIA DE MUTAÇÕES EM CÓDONS DO GENE DA *TRANSCRIPTASE REVERSA* RELACIONADOS À RESISTÊNCIA GENOTÍPICA, NA CLASSE DOS ANÁLOGOS NÃO-NUCLEOSÍDEOS.**



A Figura 14 mostra a porcentagem de mutações, de acordo com a definição de códons mutantes da *International Aids Society* (D'Aquila, 2002), para a classe dos Análogos Não-Nucleosídeos (NNRTI). As colunas representam os Grupos de eficácia virológica: branco (AVIR); cinza (ATT) e preto (VIR).

## REFERÊNCIAS

- Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Cellular and molecular immunology. Third Edition, 1997.
- AIDS CLINICAL TRIAL GROUP: *Virology manual*, versão 2.1 HOLLINGER FB editor NIH 1993.
- Antinori A, Luizzi G, Cingolani A, et al. Drug resistance mutation of HIV-1 in patients exhibiting increasing CD4 cell counts despite virological failure of HAART. *AIDS*. 2001, 15:2325-7.
- Arthos J, Cicala C, Selig SM, White AA, Ravindranath HM, Van Ryk D, Steenbeke TD, E Machado, P Khazanie, MS Hanback, DB Hanback, RL Rabin, and AS Fauci. The role of the CD4 receptor versus HIV coreceptors in envelope-mediated apoptosis in peripheral blood mononuclear cells. *Virology*. 2002; 292: 98-106.
- Autran B, Carcelain G, Li Ts, et al. Positive effects of combined antiretroviral therapy on CD4+ T cell homeostasis and function in advanced HIV disease. *Science*. 1997; 277:112-6.
- Autran B. Rationale for HIV-specific immunotherapy: lessons from chronic HIV infection and immune restoration. Program and Abstracts of the 2nd IAS Conference on HIV Pathogenesis and Treatment; July 13-16, 2003; Paris, France. Abstract 11.
- Bansa AS, Moran A, Potter M, Taylor R, Haeney MR, Mandal BK Lymphocyte transformation responses to phytohemagglutinin and pokeweed mitogen in patients at differing stages of HIV infection. Are they worth measuring? *J Clin Pathol*. 1993; 46: 846-8.
- Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Charnaret S, Gruest J, Dauguet C, Axler-Blin C, Vézinet-Brun F, Rouzioux C, Rozenbaum W, Montagnier L. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). *Science*. 1983; 220:868-71.
- Berkowitz RD, Beckerman KP, Schall TJ and McCune JM. CXCR4 and CCR5 Expression Delineates Targets for HIV-1 Disruption of T Cell Differentiation. *J Immunol*. 1998; 161:3702-10.
- Binley JM, Schiller DS, Ortiz GM, Hurley A, Nixon DF, Markowitz MM, Moore JP. The relationship between T cell proliferative responses and plasma viremia during treatment of human immunodeficiency virus type 1

infection with combination antiretroviral therapy. *J Infect Dis.* 2000; 181:1249-63.

- Bongertz V, Bou-Habib DC, Brígido LFM, Caseiro M, Ferreira PC, Freitas CO, Galvão-Castro B, Greco D, Guimarães ML, Linhares De Carvalho MI, Morgado M, Oliveira CAF, Osmanov S, Ramos CA, Rossini M, Sabino E, Tanuri A & Ueda M: HIV-1 Diversity in Brazil: genetic, biological and immunological characterization of HIV-1 strains in three potential HIV vaccine evaluation sites. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2000; 23:184-93.
- Brígido L, Rodrigues R, Casseb J, Oliveira D, Rossetti M, Menezes P, Duarte AJS. Impact of adherence to antiretroviral therapy (ART) in HIV-1-infected patients at a university public service in São Paulo City, Brazil. *Aids Patient Care and STDs.* 2001; 15: 587-93.
- Brígido L, Rodrigues R; Casseb J; Custodio RM; Fonseca LAM; Sanchez M; Duarte AJS. CD4+ T-Cell Recovery and Clinical Outcome in HIV-1-Infected patients exposed to multiple antiretroviral regimens: Partial control of viremia is associated with favorable outcome. *Aids Patient Care and STDs.* 2004; 18:189-98.
- Brindeiro RM, Diaz RS, Sabino EC, Morgado MG, Pires IL, Brígido L, Dantas MC, Barreira D, Teixeira PR, Tanuri A; And The Brazilian Network For Drug Resistance Surveillance. Brazilian Network for HIV Drug Resistance Surveillance (HIV-BResNet): a survey of chronically infected individuals. *AIDS* 2003; 17:1063-9.
- Burke DS: Recombination in HIV: an important viral evolutionary strategy. *Emerg Infect Dis.* 1997; 3:253-9.
- Campos-Mello DLP, Neves I, Souza B, Morgado MG. Viral load and CD4+ lymphocytes in HIV-1 positive individuals followed in Rio de Janeiro. *Rev Inst. Med Trop. São Paulo.* 1999; 41:S52.
- Carcelain G, Tubiana R, Samri A, Calvez V, Delaugerre C, Agut H, Katlama C, Autran B. Transient mobilization of human immunodeficiency virus (HIV)-specific CD4 T-helper cells fails to control virus rebounds during intermittent antiretroviral therapy in chronic HIV type 1 infection. *J Virol.* 2001; 75:1234-41.
- Casseb J, Komninakis S, Abdalla L, Brígido LF, Rodrigues R, Araujo F, Veiga AP, Almeida A, Flannery B, Hendry RM and Duarte AJS. HIV disease progression: is the Brazilian variant subtype B' (GWGR motif) less pathogenic than US/European subtype B (GPGR)? *Int J Infect Dis.* 2002; 6:164-9.
- Casseb J, Pereira Junior LC, Silva GL, Medeiros LA. Decreasing mortality and morbidity in adult AIDS patients from 1995 to 1997 at the Institute of

Infectious Diseases Emílio Ribas, São Paulo, Brazil. *AIDS Patient Care and STDs*. 1999; 13:213-4.

- CDC. 1993 Revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and adults. *MMWR*. 1992; 41(RR-17).
- Chun TW, Stuyver L, Mizell SB, Ehler LA, Mican JAM, Baseler M, Lloyd AL, Nowak MA, Fauci AS. Presence of an inducible HIV-1 latent reservoir during highly active antiretroviral therapy. *PNAS*. 1997; 94:13193-7.
- Coffin JM: *Genetic Variation in Retroviruses*. *Applied Virology Research*. 1991; 2:11-33.
- Coffin JM: HIV population dynamics in vivo: Implications for genetic variation, pathogenesis and Therapy. *Science*. 1995; 267:483-89.
- Cole SR, Hernán MA, Robins JM , et al. Effect of Highly Active Antiretroviral Therapy on Time to Acquired Immunodeficiency Syndrome or Death using Marginal Structural Models. *Am J Epidemiol*. 2003; 158:687-94.
- Condra JH, Schleif WA, Blahy OM, Gabryelski LJ, Graham DJ, Quintero JC, Rhodes A, Robbins HL, Roth E, and Shivaprakash M. In vivo emergence of HIV-1 variants resistant to multiple protease inhibitors. *Nature*. 1995; 374: 569-71.
- Croteau G, Doyon L, Thibeault D, McKercher G, Pilote L, Lamarre D. Impaired fitness of human immunodeficiency virus type 1 variants with high-level resistance to protease inhibitors. *J Virol*. 1997; 71:1089-96.
- D'Aquila RT, Shapiro JM, Brun-Vezinet F, et al. Drug Resistance Mutation in HIV-1. *Topics in HIV Medicine*. 2002; 10:21-5.
- D'Ettoire G, Forcima G, Andreotti M, et al. Discordant response to antiretroviral therapy: HIV isolation, genotypic mutations, T-cell proliferation and cytokine production. *AIDS*. 2002; 16:1877-85.
- Dalglish Ag, Beverley Pc, Clapham Pr, Crawford Dh, Greaves Mf, Weiss Ra: The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature*. 1981; 312:763-7.
- Dalod M, Harzic M, Pellegrin I, Dumon B, Hoen B, Sereni D, Deschemin JC, Levy JP, Venet A, and Gomard E. Evolution of cytotoxic T lymphocyte responses to human immunodeficiency virus type 1 in patients with symptomatic primary infection receiving antiretroviral triple therapy. *J Infect Dis*. 1998; 178: 61-9.



- Deeks SG, Barbour J, Martin J, Swanson M, Grant RM. Sustained CD4 T cell response after virologic failure of protease inhibitor based regimens in HIV infected patients. *J Infect Dis.* 2000; 181:946- 53.
- Deeks SG, Barbour JD, Grant RM, Martin JN. Duration and predictors of CD4 T-cell gains in patients who continue combination therapy despite detectable plasma viremia. *AIDS.* 2002; 16:201-7.
- Deeks SG, Hecht FM, Swanson M, Elbeik T, Loftus R, Cohen PT, and Grant RM. HIV RNA and CD4 cell count response to protease inhibitor therapy in an urban AIDS clinic: response to both initial and salvage therapy. *AIDS.* 1999; 13:35-43.
- Douek DC, McFarland RD, Keiser PH, Gage EA, Massey JM, Haynes BF, Polis MA, Haase AT, Feinberg MB, Sullivan JL, Jamieson BD, Zack JA, Picker LJ, and Koup RA. Changes in thymic function with age and during the treatment of HIV infection. *Nature.* 1998; 396:690-5.
- Douek DC, Brenchley JM, Betts MR, Ambrozak DR, Hill BJ, Okamoto Y, et al. HIV preferentially infects HIV-specific CD4+ T cells. *Nature.* 2002, 417:95-8.
- Dyer WB, Ogg GS, Demoitie MA, Jin X, Geczy AF, Rowland-Jones SL, McMichael AJ, Nixon DF, and Sullivan JS. Strong Human Immunodeficiency Virus (HIV)-Specific Cytotoxic T-Lymphocyte Activity in Sydney Blood Bank Cohort Patients Infected with *nef*-Defective HIV Type 1. *J Virol.* 1999; 73: 436-43.
- Fang G, Weiser B, Kuiken C et al. Recombination following superinfection by HIV-1. *Aids.* 2004; 18:153-9.
- Feinberg MB. Changing the natural history of HIV disease. *Lancet.* 1996; 348: 239-46.
- Fenyo E, Morfeldt-Mason L, Chiodi F, Lind B, Von Ga, Albert J & Asjö B: Distinctive replicative and cytopathic characteristics of human immunodeficiency virus isolates. *Journal Virol.* 1988; 62:4414-19.
- Ferbas J. Perspectives on the role of CD8+ cell suppressor factors and cytotoxic T lymphocytes during HIV infection. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 1998; 14 Suppl 2: S153-60.
- Ferguson NM, Wolf F, Ghani AC, Fraser C, Donnelly CA, Reiss P, Lange JMA, Danner SA, Garnett GP, Goudsmit J, and Anderson RM. Antigen-driven CD4+ T cell and HIV-1 dynamics: Residual viral replication under highly active antiretroviral therapy. *PNAS.* 1999; 96:15167-72.

- Fessel WJ, Krowka JF, Sheppard HW, *et al.* Dissociation of immunologic and virologic responses to highly active antiretroviral therapy. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2000; 23:314-20.
- Finzi D, Hermankova M, Pierson T, Carruth LM, Buck C, Chaisson RE, Quinn TC, Chadwick K, Margolick J, Brookmeyer R, Gallant J, Markowitz M, Ho DD, Richman DD & Siciliano RF. Identification of a Reservoir for HIV-1 in Patients on Highly Active Antiretroviral Therapy. *Science.* 1997; 278:1295-1300.
- Fonseca L, Reingold A, Casseb J, Brigido L, Duarte AJS. Aids incidence and survival in a hospital-based cohort of asymptomatic HIV seropositive patients in São Paulo, Brazil. *Int J Epidemiol.* 1999; 28:1156-60.
- Giorgi JV, Hultin LE, McKeating JA, Johnson TD, Owens B, Jacobson LP, Shih R, Lewis J, Wiley DJ, Phair JP, Wolinsky SM, and Detels R. Shorter survival in advanced human immunodeficiency virus type 1 infection is more closely associated with T lymphocyte activation than with plasma virus burden or virus chemokine coreceptor usage. *J Infect Dis.* 1999; 179: 859-70.
- GLOBAL PROGRAMME ON AIDS: Statement from the consultation on criteria for international testing of candidate HIV vaccines. *WHO/GPA/INF.* 1989; 89:1-13.
- Grabar S, Pradier C, Corfec E, *et al.* Factors associated with clinical and virological failure in patients receiving a triple therapy including a protease inhibitor. *AIDS.* 2000; 14:141-9.
- Hay CM, Ruhl DJ, Basgoz NO, Wilson CC, Billingsley JM, DePasquale MP, D'Aquila RT, Wolinsky SM, Crawford JM, Montefiori DC, Walker BD. Lack of Viral Escape and Defective In Vivo Activation of Human Immunodeficiency Virus Type 1-Specific Cytotoxic T Lymphocytes in Rapidly Progressive Infection. *J Virol.* 1999; 73:5509-19.
- Hazenberg MD, Otto SA, Van Benthem BH, Roos MT, Coutinho RA, Lange JM, Hamann D, Prins M, Miedema F. Persistent immune activation in HIV-1 infection is associated with progression to AIDS. *AIDS.* 2003; 17: 1881-8.
- Hejdeman B, Lenkei R, Leandersson AC, *et al.* Clinical and immunological benefits from HAART in spite of limited viral load reduction in HIV-1 infection. *Aids Res Hum Retroviruses.* 2001; 17:277-86.
- Ho DD, Neumann AU, Perelson AS, Chen W, Leonard JM, and Markowitz M. Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature.* 1995; 373:123-6.

- Hogg RS, Heath KV, Yip B, *et al.* Improved survival among HIV infected individuals following initiation of ARV therapy. *J Am Med Assoc.* 1998; 279:450-4.
- Hogg RS, Yip B, Chan KJ, *et al.* Rates of disease progression by baseline CD4 cell count and viral load after imitating triple-drug-therapy. *JAMA.* 2001; 286:2568-77.
- Hunt P, Martin J, Sinclair E, *et al.* T Cell Activation Is Associated with Lower CD4+ T Cell Gains in Human Immunodeficiency Infected Patients with Sustained Viral Suppression during Antiretroviral. *J Infect Dis.* 2003, 187:1534-43.
- Kanki PJ, Hamel DJ, Sankal'EJL, Hsieh CC, Thior I, Barin F, Woodcock AS, Gu'Eye-Ndiaye A, Zhang E, Montano M, Siby T, Marlink R, Ndoeye I, Essex Me & Mboup S. Human immunodeficiency virus type 1 subtypes differ in disease progression. *Journal Infect Dis.* 1999; 179:68-73.
- Karlsson AC, Younger SR, Martin JN, Grossman Z, Sinclair E, Hunt PW, Hagos E, Nixon DF, Deeks SG. Immunologic and virologic evolution during periods of intermittent and persistent low-level viremia. *AIDS.* 2004, 18:981-9.
- Katlama C, Costagliola D, Samri A, Alatrakchi N, Marcelin AG, Biligui A, Agher R, Astriti M, Calvez V, Autran B, Duvivier C. Characterization of a subset of patients with persistent low viral replication under combined antiretroviral therapy. 2ST IAS Conference on HIV Pathogenesis and Treatment. Paris, 2003 [Abstract 623].
- Kaufmann GR, Perrin L, Pantaleo G, Opravil M, Furrer H, Telenti A, Hirschel B, Ledergerber B, Vernazza P, Bernasconi E, Rickenbach M, Egger M, Battegay M; Swiss HIV Cohort Study Group. CD4 T-lymphocyte recovery in individuals with advanced HIV-1 infection receiving potent antiretroviral therapy for 4 years: the Swiss HIV Cohort Study. *Arch Intern Med.* 2003; 163:2187-95.
- Kinter A, Arthos J, Cicala C, and Fauci AS. Chemokines, cytokines and HIV: a complex network of interactions that influence HIV pathogenesis. *Immunol Rev.* 2000; 177: 88-98.
- Klein MR, van Baalen CA, Holwerda AM, Kerkhof Garde SR, Bende RJ, Keet IP, Eeftinck-Schattenkerk JK, Osterhaus AD, Schuitemaker H, and Miedema F. Kinetics of Gag-specific cytotoxic T lymphocyte responses during the clinical course of HIV-1 infection: a longitudinal analysis of rapid progressors and long-term asymptomatics. *J Exp Med.* 1995; 181:1365-72.
- Kohl NE, Emini EA, Schleif WA, Davis LJ, Heimbach JC, Dixon RA, Scolnick EM, and Sigal IS. Active human immunodeficiency virus protease is required for viral infectivity. *PNAS.* 1988; 85: 4686-90.

- Kousignian I, Abgrall S, Duval X, Descamps D, et al. Modeling the time course of CD4 T-lymphocyte counts according to the level of virologic rebound in HIV-1-infected patients on highly active antiretroviral therapy. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2003; 34:50-7.
- Learmont JC, Geczy AF, Mills J, Ashton LJ, Raynes-Greenow CH, Garsia RJ, Dyer WB, McIntyre L, Oelrichs RB, Rhodes DI, Deacon NJ, Sullivan JS, McPhee DA, Crowe S, Solomon AE, Chatfield C, Blasdall S, Kuipers H and The Sydney Blood Bank Cohort Research Group. Immunologic and Virologic Status after 14 to 18 Years of Infection with an Attenuated Strain of HIV-1. *N Engl J Med*. 1999; 340:1715-22.
- Lempicki RA, Kovacs JA, Baseler MW, Adelsberger JW, Dewar RL, Natarajan V, Bosche MC, Metcalf JA, Stevens RA, Lambert LA, Alvord WG, Polis MA, Davey RT, Dimitrov DS, Lane HC. Impact of HIV-1 infection and highly active antiretroviral therapy on the kinetics of CD4+ and CD8+ T cell turnover in HIV-infected patients. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000; 97:13778-83.
- Lori F et al. Control of SIV rebound through structured treatment interruptions during early infection. *Science*. 2000; 290:1591-3.
- Mackewicz CE, Garovoy MR, and Levy JA. HLA Compatibility Requirements for CD8<sup>+</sup>-T-Cell-Mediated Suppression of Human Immunodeficiency Virus Replication. *J Virol*. 1998; 72:10165-70.
- Mackewicz CE, Ortega H, and Levy JA. Effect of cytokines on HIV replication in CD4+ lymphocytes: lack of identity with the CD8+ cell antiviral factor. *Cell Immunol*. 1994; 153: 329-43.
- Markowitz M et al. Discontinuation of antiretroviral therapy commenced early during the course of human immunodeficiency virus type 1 infection, with or without adjunctive vaccination. *J Infect Dis*. 2002; 186:634-43.
- Mayers G, Korber B, Berzofsky JA, Smith RF & Pvlakis GN: Human retroviruses and AIDS. *Los Alamos National Laboratory*. 1992; 3:2-4.
- Mayers G: Human Retroviruses and AIDS. *Los Alamos: Los Alamos National Laboratory, Theoretical Biology and Biophysics*; 1996.
- McNeil AC, Shupert WL, Iyasere CA, Hallahan CW, Mican J, Davey RT, Connors M. High-level HIV-1 viremia suppresses viral antigen-specific CD4+ T cell proliferation. *PNAS*. 2001; 98: 13878-83.
- McNeil AC, Shupert WL, Iyasere CA, Hallahan CW, Mican JA, Davey RT Jr, Connors M. High-level HIV-1 viremia suppresses viral antigen-specific CD4(+) T cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001; 98:13878-83.

- Mollet L, Li T, Samri A, Tournay C, Tubiana R, Calvez V, Debré P, Katlama C and Autran B. Dynamics of HIV-Specific CD8+ T Lymphocytes with changes in Viral Load. *J Immunol.* 2000; 165:1692- 704.
- Mellors JW, Rinaldo CR, Gupta P, White RM, Todd JA, Kingsley LA. Prognosis in HIV-1 infection predicted by the quantity of virus in plasma. *Science.* 1996; 5265:1167-70.
- Miedema F and Klein MR. AIDS Pathogenesis: A Finite Immune Response to Blame? *Science* .1996; 272: 505-6.
- Miro JM et al. Structured treatment interruption in patients receiving HAART within 90 days after onset of primary HIV-1 infection symptoms: spontaneous control of viremia in only one their of cases after four cycles off therapy. Fourteenth International AIDS Conference, Barcelona abstract ThOrB1436, 2002.
- MMWR - Kaposi's sarcoma and Pneumocystis pneumonia among homosexual men--New York City and California. *MMWR Morb Mortal Wkly.* 1981; 30:305-8.
- MMWR - Pneumocystis pneumonia – Los Angeles. *MMWR Morb Mortal Wkly.* 1981; 30: 250-2.
- MMWR - Revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and adults. *MMWR.* 1993, 41(RR-17).
- Mullins JI: AIDS Pathogenesis & HIV Vaccine Development, Opportunities and Challenges, Keystone Symposia CO, 1999.
- Murphy EL, Collier AC, Kalish LA, et al. Highly Active Antiretroviral Therapy Decreases Mortality and Morbidity in Patients with Advanced HIV Disease. *Ann Intern Med.* 2001; 135:17-26.
- NIH - Guidelines for the Use of Antiretroviral Agents in HIV-1-Infected Adults and Adolescents - November 2003. US Department of Health and Human Services.
- Nijhuis M, Deeks S, Boucher C. Implications of antiretroviral resistance on viral fitness. *Curr Opinion in Infec Dis.* 2001; 14:23-8.
- Ostrowski MA, Krakauer DC, Li Y, Justement SJ, Learn G, Ehler LA, Stanley SK, Nowak M, Fauci AS. Effect of Immune Activation on the Dynamics of Human Immunodeficiency Virus Replication and on the Distribution of Viral Quasispecies. *J Virol* .1998; 72:7772-84.
- Owen C, Kazim F, Badley AD. Effect on CD4 T-cell count of replacing protease inhibitors in patients with successful HIV suppression: a meta-analysis. *AIDS.* 2004; 18: 693-5.

- Pakker NG, Notermans DW, De Boer RJ, et Al. Biphasic kinetics of peripheral blood T cells after triple combination therapy in HIV-1 infection: a composite of redistribution and proliferation. *Nature Med.* 1998; 4:208-14.
- Palella FJJ, Delaney KM, Moorman AC, et al. Declining morbidity and mortality among patients with advance human immunodeficiency virus infection. HIV outpatient study investigators. *N Engl J Med.* 1998; 13:853-60.
- Pierson T, McArthur J, Siciliano RF. Reservoirs for HIV-1: Mechanisms for Viral Persistence in the Presence os Antiviral Immune Responses and Antiretroviral Therapy. *Annu Rev Immunol.* 2000; 18: 665-708.
- Pitrak DL, Bolanos j, Hershov R, Novak RM. Discordant CD4 T lymphocyte responses to antiretroviral therapy for HIV infection are associated with ex-vivo rates of apoptosis. *AIDS.* 2001; 15; 1317-9.
- PN-DST-Aids, Brazil. Recomendações para Terapia Anti-retroviral em adultos e adolescentes infectados pelo HIV–2002/2003, PN-DST/Aids - Ministério da Saúde, Brazil. 2003 at [www.aids.gov.br](http://www.aids.gov.br).
- Price DA, Scullard G, Oxenius A, Braganza R, Beddows SA, Kazmi S, Clarke JR, Johnson GE, Weber JN, Phillips RE. Discordant outcomes following failure of antiretroviral therapy are associated with substantial differences in human immunodeficiency virus-specific cellular immunity. *J Virol.* 2003; 77: 6041-9.
- PROGRAMA NACIONAL DE DST/AIDS: Boletim Epidemiológico DST/AIDS. *Ministério da Saúde*, 2002 ([www.aids.gov.br](http://www.aids.gov.br)).
- Rinaldo C, Huang XL, Fan ZF, Ding M, Beltz L, Logar A, Panicali D, Mazzara G, Liebmann J, and Cottrill M. High levels of anti-human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) memory cytotoxic T-lymphocyte activity and low viral load are associated with lack of disease in HIV-1-infected long-term nonprogressors. *J Virol.* 1995; 69: 5838-42.
- Rodriguez B, Valdez H, Freimuth W, Butler T, Asaad R, Lederman MM. Plasma levels of B-lymphocyte syimulator increase with HIV disease progression. *Aids.* 2003; 17:10\983-2000.
- Rodrigues R; Gianna MC, Hong M, Leandro J, Oliveira M, Brígido, L. HIV polymorphism in São Paulo, Brazil. 1ST IAS Conference on HIV Pathogenesis and Treatment. Buenos Aires, July 8-12, 2001 [Abstract 385].
- Rosenberg ES, Altfeld M, Poon SH, Phillips MN, Wilkes BM, Eldridge RL, Robbins GK, D'Aquila RT, Goulder PJ, Walker BD. Immune control of HIV-1 after early treatment of acute infection. *Nature.* 2000; 407:523-526.

- Sabino EC, Diaz R, Brigido LF, Duarte AJS, Meyer A & Busch M: Distribution of HIV-1 subtypes seen in an AIDS clinic in São Paulo city, Brazil. *AIDS*. 1996; 10:1579-84.
- Santoro-Lopes G, Harrison LH, Tavares MD, Xexeo A, Dos Santos AC, and Schechter M. HIV disease progression and V3 serotypes in Brazil: is B different from B-Br? *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2000; 16: 953-8.
- Schwartlander B, Bek B, Skarabis H, Koch J, Burkowitz J, Koch MA. Improvement of the predictive value of CD4+ lymphocyte count by Beta<sub>2</sub>-microglobulin, immunoglobulin A and erythrocyte sedimentation rate. The Multicentre Cohort Study Group. *AIDS*. 1993; 7: 813-21.
- Shirasaka T, Yarchoan R, O'Brien MC, *et al*. Changes in drug sensitivity of human immunodeficiency virus type 1 during therapy with azidothymidine, dideoxycytidine, and dideoxyinosine: an in vitro comparative study. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993; 90:562-6.
- UNAIDS - AIDS Epidemic Update 2003. Joint United Nations Programme on HIV/AIDS and the World Health Organization (WHO). <http://www.unaids.org/en/Resources/Publications/Corporate+publications/AIDS+epidemic+update+-+December+2003.asp> Accessed December 15, 2003.
- UNAIDS; Expert Group Of The Joint United Nations Program on HIV/Aids: Implications of HIV variability for transmission: scientific and policy issues. *AIDS*. 1997; 11: S1-15.
- UNAIDS; Report on the global HIV/AIDS epidemic. *WHO/EMCVIR/ASD/98.2*, 1998.
- Van Rompay KK, Matthews TB, Higgins J, Canfield DR, Tarara RP, Wainberg MA, Schinazi RF, Pedersen NC, North TW. Virulence and reduced fitness of simian immunodeficiency virus with the M184V mutation in reverse transcriptase. *J Virol*. 2002; 76:6083-92.
- Van Vaerenbergh K, Harrer T, Schmit JC, *et al*. Initiation of HAART in Drug-Naive HIV Type 1 Patients Prevents Viral Breakthrough for a Median Period of 35.5 Months in 60% of the Patients. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2002; 18:419-26.
- Vasconcelos DM, Marao VL, Stellin R, *et al*. HIV Viral load among male and female patients derived from different sites of São Paulo. *Rev Inst Trop S Paulo*. 1999; 41: S28.
- Wain-Hobson S: Running the gamut of retroviral variation. *Trends in Microbiology*. 1996; 4:135-41.

- Walker BD, Allen T, Altfeld M, Yu X, Goulder P, Addo M, Dranert R, Brander C, Frahm N, Johnston M, Corcoran C, Trong H, Lee P, Maier E, O'Sullivan K, Eldridge R, Johnston M, Rosenberg E, Hess C, Luster. A Immune Control and Immune Failure in HIV Infection. Partners AIDS Res Ctr, Massachusetts Gen Hosp and Harvard Med Sch, Boston MA. 10 CROI, 2003.
- Walker BD. Prospects for immunotherapy of HIV infection: lessons from acute infection. Program and Abstracts of the 2nd IAS Conference on HIV Pathogenesis and Treatment; July 13-16, 2003; Paris, France. Abstract 12.
- Walker BD. Structured treatment interruption: novel strategy or oxymoron? State-of-the-Art lecture and summary. Eighth Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Chicago, 2001.
- Westby M, Manca F, and Dalgleish AG. The role of host immune responses in determining the outcome of HIV infection. *Immunol Today*. 1996; 17: 120-6.
- Wit FW, Van Leeuwen R, Weverling GJ, *et al*. Outcome and predictors of failure of highly active antiretroviral therapy: one-year follow-up of a cohort of human immunodeficiency virus type 1-infected persons. *J Infect Dis*. 1999; 179:790-8.
- World Health Organization Network for HIV Isolation and Characterization: HIV-1 type 1 variation in World Health Organization-sponsored vaccine evaluation sites: Genetic screening, sequence analysis and preliminary biological characterization of selected viral strains. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1994;10:1327-43.
- World Health Organization. Scaling up ARV therapy in resource-limited settings: guidelines for a public Health approach. 2002 available at <http://www.saathii.org/Training%20Manuals/>.
- Yang AG, Bai X, Huang XF, Yao C, and Chen SI. Phenotypic knockout of HIV type 1 chemokine coreceptor CCR-5 by intrakines as potential therapeutic approach for HIV-1 infection. *PNAS*. 1997; 94:11567-72.
- Zagury D, Lachgar A, Chams V, Fall LS, Bernard J, Zagury JF, Bizzini B, Gringeri A, Santagostino E, Rappaport J, Feldman M, O'Brien SJ, Burny A, Gallo RC. C-C chemokines, pivotal in protection against HIV type 1 infection. *Proc Natl Acad Sci*. 1998; 95:3857-61.
- Zhu T, Korber BT, Nahmias AJ, Hooper E, Sharp PM & Ho DD: An African HIV-1 sequence from 1959 and implications for the origin of the epidemic. *Nature*. 1998; 391:594.