



TAÍS NITSCH MAZZOLA

**VIREMIA NA INFECÇÃO VERTICAL
PELO VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA E
RESPOSTA IMUNOLÓGICA ADAPTATIVA**

CAMPINAS

2013



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Ciências Médicas

**Viremia na infecção vertical pelo Vírus da Imunodeficiência Humana e
resposta imunológica adaptativa**

TAÍS NITSCH MAZZOLA

*Tese apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos
exigidos para obtenção do Título de Doutora em Ciência, na
Área de Concentração em Saúde da Criança e do Adolescente.*

ORIENTADORA: Profa. Dra. Maria Marluce dos Santos Vilela

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Marcos Tadeu Nolasco da Silva

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE
DEFENDIDA PELA ALUNA TAÍS NITSCH MAZZOLA E
ORIENTADA PELO PROFA. DRA. MARIA MARLUCE DOS
SANTOS VILELA.

Assinatura do(a) Orientador(a)

Campinas

2013

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

M459v Mazzola, Taís Nitsch, 1982-
 Viremia na infecção vertical pelo vírus da
 imunodeficiência humana e resposta imunológica
 adaptativa / Taís Nitsch Mazzola. -- Campinas, SP : [s.n.],
 2013.

 Orientador : Maria Marluce dos Santos Vilela.
 Coorientador : Marcos Tadeu Nolasco da Silva.
 Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de
 Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

 1. HIV. 2. Criança. 3. Adolescente. 4. Imunidade
 celular. 5. Vacinas. I. Vilela, Maria Marluce dos Santos,
 1947-. II. Silva, Marcos Tadeu Nolasco da, 1960-. III.
 Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
 Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Viremia in vertical human immunodeficiency virus infection and adaptive immune response

Palavras-chave em inglês:

HIV

Child Adolescent

Cellular immunity

Vaccines

Área de concentração: Saúde da Criança e do Adolescente

Titulação: Doutora em Ciências

Banca examinadora:

Maria Marluce dos Santos Vilela [Orientador]

Adriana Gut Lopes Ricetto

Rogério de Jesus Pedro

Marisa Marcia Mussi Pinhata

Telma Miyuki Oshiro

Data de defesa: 12-12-2013

Programa de Pós-Graduação: Saúde da Criança e do Adolescente

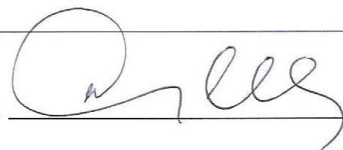
BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

TAIS NITSCH MAZZOLA

Orientador (a) PROF(A). DR(A). MARIA MARLUCE DOS SANTOS VILELA

MEMBROS:

1. PROF(A). DR(A). MARIA MARLUCE DOS SANTOS VILELA



2. PROF(A). DR(A). ADRIANA GUT LOPES RICETTO

Adriana Gut Lopes Ricetto

3. PROF(A). DR(A). ROGÉRIO DE JESUS PEDRO

Rogério de Jesus Pedro

4. PROF(A).DR(A). MARISA MARCIA MUSSI PINHATA



5. PROF(A).DR(A). TELMA MIYUKI OSHIRO

Telma Miyuki Oshiro

Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas

Data: 12 de dezembro de 2013

Dedico este trabalho a cada pequeno rostinho
que convive com HIV: estamos juntos nesta
luta!

Agradecimentos

A Deus, por ter atendido meu pedido e me concedido forças para realizar estes e tantos outros empreendimentos nesta etapa de minha vida.

À minha orientadora, Profa. Dra. Maria Marluce dos Santos Vilela, pela generosidade, exemplo de profissional estudiosa e amorosa com os pacientes, oportunidades que me oferece, conselhos que me concede e orientação para minha carreira de cientista.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Marcos Tadeu Nolasco da Silva, pelo exemplo de dedicação aos pacientes, educação de *Gentleman*, disponibilidade, companheirismo, senso crítico e amizade.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de São Paulo (FAPESP), por conceder o Auxílio Regular – processo 2010/16513-9. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), por me conceder uma bolsa de doutorado durante quatro meses. À Universidade Estadual de Campinas, pela oportunidade de fazer parte de seu corpo discente e servidor.

À Jéssica Santana Bernachi, meus braços direito e esquerdo que foram um presente de Deus, companheira fiel de fé e caminhada, amiga querida, que me ajuda organizadamente, humildemente e gentilmente todos os dias desde 2010.

A Emanuel Borges Vitor Anjos, que embarcou nesta aventura comigo, pela confiança, auxílio com os dados clínicos dos pacientes, exames e pela delicadeza de sempre lembrar-se de mim ao ver um bolo de rolo.

À Vanessa Oya, Beatriz Mariana Abramczuk, Vanessa Domingues Ramalho, Júlia Figueiredo Machado, amigas de longa data do Laboratório de Imunologia, por

compartilharem seus caminhos e sonhos comigo. À Caroline Natânia de Souza Ferreira, Ana Paula Moreira e Lia Marega, pela oportunidade de ensinar e aprender Imunologia e Biologia Molecular, por toda a ajuda com a manutenção do Laboratório, da formatação das referências deste trabalho e do meu bom humor.

À Josiane Francisca Ferreira, querida amiga que o destino colocou em minha vida para ensinar-me mais sobre cuidado, respeito e carinho pelas crianças.

A Paulo Cesar Alves e Suiellen Reis, pelas produtivas discussões de métodos, gráficos e resultados, e, especialmente, pela amizade, orações, acolhida, chocolates do almoço e palavras sábias.

A Luiz Carlos Ramalho, Aline Ernesto Santarém, Carina Gazini, Simone Lidington e Matheus Laterza Ribeiro, meus amigos de estudo de HIV/AIDS: fico feliz com a certeza de que há muitos profissionais sérios e competentes que dedicam seu tempo a melhorar a qualidade de vida das crianças e adolescentes com HIV. À equipe de Imunodeficiência Secundária do Ambulatório de Pediatria do HC: Renata Lemos, Maraísa Centeville e Lílian Wigman, pela ajuda clínica, pela torcida, e pela atenção imensurável aos pacientes pediátricos de HIV/AIDS; à equipe de enfermagem do Ambulatório de Pediatria: Maria do Carmo Vênega, Edna Martins, Kazuko Nisieimon, Suzana Emiliana Ferreira, Cristina Carvalho Silva Neves e Cristiane Príncipe Ribeiro Oliveira: pela disponibilidade e cooperação; à assistente social Márcia Gimenez, pelo empenho em me ajudar e aos pacientes. Ao Prof. Dr. André Morcillo, pelos ensinamentos em Estatística e discussões tão produtivas sobre a tese e a vida.

À Simone Cristina Ferreira, Milton César de Souza, Silvana Severino Dalgé, Maria Cristina Fernandes Alvim, Jussara Rehder, Paulo Latuf Filho, Antonio Salvador Pedretti

Filho, Thaís Ferreira de Oliveira, Jonathas Pereira Mota, Ana Carolina Diogo, Caroline Bondarik e Rosa Maria Genesio, que são ou foram grandes companheiros de construção do CIPED e da profissional que eu sou hoje.

À Dra. Telma Oshiro, Dr. Alexandre de Almeida, Laís Teodoro e Cláudia Finazzo, por terem gentilmente me acolhido no Laboratório LIM-56, por todo o aprendizado e atenção que me concederam sempre.

Aos médicos Dorival Soares e Eduardo Palandri, que atendem os pacientes do Ambulatório de Moléstias Infecciosas do Centro de Orientação e Apoio Sorológico (COAS) em Jundiaí, pela colaboração e disponibilidade.

Aos amigos das Seções de Coleta, Hematologia e Imunologia da Patologia Clínica do HC, especialmente a Edivilson da Costa, Angela Maria da Silveira Borsone, Adriana Pelais Lopes Pinheiro, Alexandre Camargo, Andrea da Silva, Marcia Luciméia Julian, Mariusa Terezinha dos Santos e à Profa. Dra. Maria Heloísa Blotta. Aos amigos do Hospital Dia, em especial a Rosana Fins Ramos da Silva. Aos amigos do Laboratório de Pesquisa em AIDS, em especial à Marcina Garcia, Elisandra Valéria Negrison Calixto, Vera Lúcia de Paulo Roderio e Prof. Dr. Francisco Hideo Aoki. Aos amigos da Farmácia da Unidade de Pesquisa Clínica, em especial à Maria Ivone Gonçalves Huehara.

Aos amigos do Laboratório de Biologia Molecular do Centro de Hematologia e Hemoterapia (Hemocentro), Ana Leda Figueiredo Longhini, Irene Pereira dos Santos, Janine Skincariol Sabino e Luís Gustavo Romani Fernandes. Aos amigos do Laboratório de Marcadores Celulares do Hemocentro, Fernanda Gonçalves Pereira Cunha, Rosangela Pereira de Souza, Felipe Franco da Rocha e Profa. Dra. Irene Lorand-Metze.

Aos responsáveis dos pacientes que participaram deste trabalho, pela confiança que me concederam. Às crianças, adolescentes e jovens adultos que cederam seu sangue e abriram suas vidas para que eu pudesse dar mais esse passo para entender a Imunologia de HIV, serei eternamente grata.

À Dra. Mariângela Ribeiro Resende e à Dra. Patrícia Ucelli Simioni, pelas sugestões e leitura atenciosa do manuscrito na minha Qualificação.

À Priscila Andressa Cortez e sua família, pelos treze anos de companheirismo, torcida, acolhida e carinho.

Aos amigos Renato, Elenir e Miguel, pelas orações e companheirismo.

Aos meus sogros Márcia e Ademir Lima, Maria Bernadete da Rosa e Nelson Teixeira, e à minha cunhada Laís Lima, pelo carinho, paciência e orações.

Aos meus avós Enny e Zéa Mazzola, Alayr e Paulo Nitsch (*in memoriam*) e a toda a família pela torcida carinhosa e pelas preces diárias.

À minha irmã, Karen Mazzola, pelas orações, pela ajuda na logística com o carro, horários e compromissos, pelo amor, pela preocupação e pela fé que me confia diariamente.

Aos meus pais, Marcia e Nivaldo Mazzola, pelo amor incondicional, pelas orações, pela ajuda na logística da minha vida pessoal e profissional, pelo desejo de que eu esteja feliz e realizada desde sempre.

Ao meu esposo, Kleber Fernando de Lima, meu companheiro para vida inteira, que me apoia todos os dias, de todas as formas possíveis e inimagináveis, para que eu possa realizar este meu sonho de estudar HIV/AIDS.

“Let us give publicity to HIV/AIDS and not hide it,
because [that is] the only way to make it appear like a
normal illness.”

Nelson Mandela



RESUMO

Resumo

Este estudo teve como objetivo analisar se há associação entre a viremia plasmática do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) e a resposta imunológica adaptativa de crianças e adolescentes com infecção vertical pelo HIV-1 em uso de terapia antirretroviral combinada (TARVc). Os pacientes foram recrutados no Ambulatório de Imunodeficiência Secundária Pediátrica do Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Campinas e no Centro de Orientação e Apoio Sorológico (COAS), em Jundiaí, ambos no estado de São Paulo, Brasil. Constituíram-se dois grupos de pacientes: a) com controle virológico sustentado por mais de um ano (Carga viral - CV < limite de detecção de 50 cópias de RNA viral/mL, pelo método de *Branched-DNA*); e b) com CV > 1000 cópias/mL. Crianças e adolescentes saudáveis participaram como controles.

Foram realizadas, por citometria de fluxo, imunofenotipagens de linfócitos T CD4⁺, T CD8⁺, B total e de memória e a proliferação de linfócitos T em culturas de células mononucleadas do sangue periférico estimuladas com HIV-1 inativado por aldrítol-2. A concentração de citocinas IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IFN- α , IFN- γ , TNF- α e TGF- β 1 no sobrenadante destas culturas foi analisada com *Cytometric Bead Array* e *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*. Também foram dosados imunoglobulinas por nefelometria; anticorpos anti-hepatite B e anti-rubéola por *Chemiluminescent Microparticle Immunoassay* e anti-tétano e anti-difteria por *Toxin Binding Inhibitor test*. Empregaram-se os testes estatísticos de Kruskal-Wallis, Wilcoxon, Mann-Whitney, exato de Fisher, Comparações Múltiplas Não Paramétricas e Correlação de Spearman, sendo o nível de significância de $p < 0,05$.

Não houve diferença na contagem de linfócitos T CD8⁺, B total e de memória entre os grupos de pacientes. O número de linfócitos T CD4⁺ estava reduzido no grupo virêmico no momento da avaliação da resposta vacinal. Observaram-se maiores valores absolutos de linfócitos B de memória nos pacientes com CV indetectável (CVI) de menor idade à introdução de TARVc. A concentração de IgM e IgG foi superior nos pacientes virêmicos em relação aos com CVI e controles. Pacientes com CVI tiveram maior nível de IgA que os controles.

Os pacientes com CVI apresentaram maior proliferação de linfócitos T e produção de IL-2 e IFN- α HIV-1 específicas em relação aos virêmicos. A proliferação e produção de IFN- γ e IL-2 se correlacionaram com a duração da TARVc bem-sucedida no controle da viremia. Em pacientes virêmicos, a concentração de IFN- γ correlacionou-se inversamente à CV e a proliferação foi menor nos que iniciaram TARV após um ano de idade.

A proporção de respondedores para as vacinas de tétano, difteria, rubéola e hepatite B foi similar entre os grupos de pacientes, e aqueles com CVI apresentaram maiores títulos de anti-hepatite B e anti-rubéola. Os controles apresentaram maior número de respondedores para rubéola, hepatite B e difteria e maiores títulos de anti-hepatite B, anti-rubéola e anti-tétano que os pacientes.

Concluimos que o controle virológico sustentado em crianças e adolescentes com infecção crônica pelo HIV trouxe benefícios diretos na manutenção das respostas anti-HIV e vacinais e que a administração de TARV precoce contribuiu para melhor resposta celular ao HIV e maior número de linfócitos B de memória.

Palavras-chave: HIV, criança, adolescente, imunidade celular, imunidade humoral, linfócitos B, hepatite B, rubéola, vacinas, memória imunológica.



ABSTRACT

Abstract

The aim of this study was to evaluate if there was an association of Human Immunodeficiency Virus (HIV) plasma viremia and the development of adaptative immune responses from vertically-HIV-1 infected children and adolescents under combination Antirretroviral Therapy (cART). The individuals were recruited at the Pediatric Immunodeficiency Outpatient Unit at the University of Campinas Clinical Hospital (UNICAMP, Campinas) and at the Center for Orientation and Serologic Support (COAS, Jundiaí), in São Paulo State, Brazil. They were separated in two groups, according to HIV RNA plasma viral load (VL): one had sustained undetectable VL (UVL, with VL < 50 copies of RNA/mL) for at least one year before blood collection; the other had VL > 1,000 copies/mL. Healthy children and adolescents participated in the study as controls.

Aldrithiol-2-inactivated HIV-1-stimulated peripheral blood mononuclear cells were cultured to evaluate HIV-specific lymphoproliferation by flow cytometry and IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IFN- α , IFN- γ , TNF- α and TGF- β 1 concentration by Cytometric Bead Array and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. Adaptative immunity was also evaluated with T CD4⁺, T CD8⁺, total and memory B cell counts by flow cytometry, immunoglobulin dosage by nephelometry, Chemiluminescent Microparticle Immunoassay to antibodies anti-hepatitis B and anti-rubella and *Toxin Binding Inhibiton test* to anti-tetanus and anti-diphtheria were carried out to humoral response evaluation. Kruskal-Wallis, Wilcoxon, Mann-Whitney, Fisher's exact, Nonparametric Multiple Comparisons and Spearman Correlation tests were used, with a p value < 0.05.

There was no difference in T CD8, total and memory B cell counts between the groups of patients. T CD4 cell numbers were decreased in the viremic group at the time

humoral immunity was performed. Greater memory B cell counts were observed among patients with UVL who were younger at cART beginning. IgM and IgG levels were higher in viremic patients in comparison to control and patients with UVL, which had increased levels of IgA in comparison to controls.

There was no difference in the proportion of responders for tetanus, diphtheria, rubella and hepatitis B vaccines between the two groups of patients; nevertheless, the group with UVL showed higher titers of anti-hepatitis B, anti-rubella and anti-tetanus than the viremic group. Controls showed higher frequency of responders to diphtheria, rubella and hepatitis B and titers to anti-hepatitis B, anti-rubella and anti-tetanus in comparison to patients.

Patients with UVL showed higher HIV-1-specific T lymphocyte proliferation and IL-2 and IFN- α production in comparison to viremic patients. Greater time since the start of successful cART in patients with UVL was associated with higher proliferation and IFN- γ and IL-2 levels in cultures with HIV. Among viremic patients, HIV-specific proliferation was lower in individuals who started ART after one year of age, and IFN- γ concentration was inversely correlated with VL.

We concluded that sustained HIV-1 virologic control was valuable on mounting responses to HIV and vaccines and the early initiation of ART contributed to improved HIV cellular immunity and greater memory B cell counts.

Key-words: HIV, child, adolescent, cellular immunity, humoral immunity, B-lymphocytes, hepatitis B, rubella, vaccines, immunologic memory.

SUMÁRIO

RESUMO	xv
ABSTRACT	xix
1- INTRODUÇÃO	25
Epidemiologia da AIDS e HIV	27
Transmissão vertical e profilaxia	27
HIV e AIDS em pacientes pediátricos	30
Sistema Imunológico da criança na infecção por HIV	32
Terapia antirretroviral	36
Reconstituição Imunológica com TARV	38
Resposta imunológica ao HIV	44
2- OBJETIVOS	51
Objetivo geral	53
Objetivos específicos	53
3- MÉTODOS	55
Populações estudadas	57
Aspectos éticos	58
Coleta de sangue	59
Hemograma	59
Imunoglobulinas	59
Carga viral de HIV	60
Imunofenotipagem de linfócitos T	60
Imunofenotipagem dos linfócitos B	61
Vacinação	62
Concentração de anticorpos anti-hepatite B e anti-rubéola	62
Concentração de anticorpos anti-tétano e anti-difteria	63
Resposta celular ao HIV-1 inativado	64
Concentração antigênica	64
Proliferação de CMSP	65
Dosagem de citocinas no sobrenadante das culturas	66
<i>Cytometric Bead Array</i> (CBA)	67
<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i> (ELISA)	68
Análise estatística	69
4- CAPÍTULOS	71
Capítulo I	73
Viremia and immunological memory in Human Immunodeficiency Virus vertical infection	73
Abstract	75
1. Introduction	76
2. Methods	77
3. Results	81
4. Discussion	85
References	91
Capítulo II	109
Does persistent plasma viremia modify cellular immune response to Human Immunodeficiency Virus in vertically infected pediatric patients?	109
Abstract	111
Introduction	112
Methods	113
Results	116
Discussion	120
Cited references	125
5- DISCUSSÃO	143

6- CONCLUSÃO	151
Após análise dos resultados deste trabalho, pôde-se concluir que:.....	153
7- REFERÊNCIAS	155
8- ANEXOS E APÊNDICES	191



1- INTRODUÇÃO

Epidemiologia da AIDS e HIV

A infecção com os Vírus da Imunodeficiência Humana (*Human Immunodeficiency Virus*, HIV-1 e HIV-2), retrovírus da família Lentiviridae, leva a uma disfunção progressiva do sistema imunológico, a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), marcada pela redução massiva de linfócitos T CD4+. A AIDS foi reconhecida primeiramente em 1981, nos Estados Unidos (Masur et al. 1985, Peterman et al. 1985). Três décadas depois, a *Joint United Nations Programme on HIV/AIDS* (UNAIDS, 2012) estimou que 34 milhões de pessoas estivessem infectadas por HIV no mundo. Na África Sub-Saariana, onde há a maior prevalência, estima-se que um em cada 20 adultos seja infectado pelo HIV (UNAIDS 2012). Embora o número de novas infecções esteja 20% menor em relação a uma década atrás, algumas regiões do mundo ainda apresentam aumento de 35% no número de novas infecções neste mesmo período de tempo (UNAIDS 2012).

No Brasil, o primeiro caso surgiu no estado de São Paulo na década de 1980 e, até junho de 2012, foram notificados 656.701 casos de AIDS (Gonçales Junior et al. 1983, Departamento de Doenças Sexualmente Transmissíveis -DST, AIDS e Hepatites Virais 2012a). Por ano, ocorreram, em média, 36 mil casos novos e 11,5 mil óbitos relacionados à AIDS (Departamento de DST, AIDS e Hepatites Virais 2012a). Atualmente, estima-se que 630 mil pessoas de 15 a 49 anos vivam com HIV/AIDS no Brasil (Departamento de DST, AIDS e Hepatites Virais 2012b).

Transmissão vertical e profilaxia

Desde o primeiro registro de AIDS pediátrica em 1983, a transmissão vertical do HIV ainda é destaque nos estudos de prevenção da infecção (Joshi 1996, Castilho &

Chequer 1997, Ministério da Saúde 2005). O HIV pode ser transmitido à criança durante a gestação, no momento do parto ou no aleitamento. Em 1998, *The United Nations Children's Fund* (UNICEF 1998) estimava que 3,8 milhões de crianças já haviam sido infectadas desde o início da epidemia, sendo que 2,7 milhões já haviam morrido.

O *screening* durante o pré-natal, a redução da carga viral plasmática (CV) materna pela administração de terapia antirretroviral (TARV) à gestante, a cesárea eletiva e a alimentação com leite artificial reduziram a transmissão perinatal do HIV (Hawkins et al. 2005). O estudo *Pediatric AIDS Clinical Trials Group Protocol 076* (PACTG 076) e outros recomendaram a administração do antirretroviral zidovudina (ZVD) à mãe a partir da 14^a semana de gestação, durante o parto e ao recém-nascido, o que reduziu significativamente o risco de transmissão vertical de HIV nos países desenvolvidos desde 1995 (Connor et al. 1994, Sperling et al. 1996, Musoke & Miiro 2000, Robinson & Lee 2000, Kourtis 2002). Outros protocolos de prevenção da transmissão vertical foram avaliados nos anos seguintes, sendo atualmente padrão tratar a gestante com terapia combinada de alta potência (TARVc), além das demais profilaxias acima descritas (MacGowan & Shah 2000, Hawkins et al. 2005, Feiterna-Sperling et al. 2007).

No Brasil, de 1990 a 1994, a única medida disponível para profilaxia era a contra-indicação do aleitamento materno; entre 1995 e 1996, era prescrito ZDV para a gestante e o recém-nascido; de 1997 a 1998, ZDV era utilizado também durante o parto; e partir de 1999, foram introduzidos o parto cesáreo eletivo e a TARV dupla ou tripla para as gestantes (Amaral et al. 2007, Schuelter-Trevisol et al. 2012). Atualmente, desde a 14^a semana de gestação é utilizada a TARVc com, no mínimo, três antirretrovirais (ARV) de duas classes distintas (Departamento de DST, AIDS e Hepatites Virais 2010).

Em 2011, 57% das gestantes infectadas por HIV receberam tratamento antirretroviral nos países em desenvolvimento como parte da profilaxia da transmissão vertical (UNIAIDS 2012). No mesmo ano, embora haja ocorrido uma redução de 43% de novas infecções em relação a 2003, ainda assim, 330 mil crianças foram infectadas por HIV no mundo (UNIAIDS 2012).

No Brasil, as intervenções para prevenção da transmissão perinatal foram introduzidas em 1996 (Vermelho et al. 1999). Até 1997, no estado de São Paulo, a transmissão vertical estimada era de 16%. Após a introdução da TARV e outras profilaxias, gradualmente reduziu para 6,8% em 2004 no Brasil, sendo 14,86% na região Norte do Brasil, 11,26% no Nordeste, 7,59% no Sudeste, 5,63% no Centro-Oeste e 5,50% no Sul, chegando a menos de 1% em alguns serviços brasileiros (Tess et al. 1998, Succi et al. 2007).

Entre 2010 e 2011, 84% das gestantes foram testadas para a presença de infecção por HIV no Brasil (Departamento de DST, AIDS e Hepatites Virais 2012a). De 1980 a 2012, 13.728 casos de AIDS em crianças verticalmente infectadas por HIV foram notificados pelo Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN). A cada ano, observou-se redução do número de casos novos a cada ano, e chegando a 137 nos seis primeiros meses de 2012 (Ministério da Saúde 2012). De 2002 a 2011, a incidência de crianças menores de cinco anos infectadas por HIV reduziu em 25% (Ministério da Saúde 2012).

HIV e AIDS em pacientes pediátricos

No Brasil, o diagnóstico de infecção por HIV em crianças abaixo de 18 meses se dá pela determinação da carga de RNA ou DNA viral em amostras obtidas com intervalo mínimo de um mês. Duas cargas virais positivas indicam infecção e duas negativas, provável não infecção, que é confirmada por um teste de anticorpos anti-HIV não reagente após 18 meses. Nas crianças acima de 18 meses, dois testes para anticorpos anti-HIV, coletados em momentos diferentes, podem definir se há ou não infecção (Ministério da Saúde 2009). As crianças com diagnóstico de infecção são acompanhadas em serviços especializados, em que a imunofenotipagem de linfócitos T, a determinação da CV de HIV-1, hemograma e antropometria são realizados trimestralmente no acompanhamento clínico dos pacientes. A porcentagem de linfócitos T CD4 < 25% do total de células CD45+ e altas CV são considerados preditores de progressão da doença (Ministério da Saúde 2009).

A primeira classificação de AIDS pediátrica foi publicada em 1987 e a utilizada atualmente surgiu de um consenso do *Centers for Diseases Control and Prevention* (CDC) em 1994, a qual inclui quatro categorias clínicas (N, A, B, C) e três imunológicas (1, 2, 3), apresentadas nas Tabelas 1 e 2 (CDC 1987, CDC 1994).

Nas crianças infectadas pelo HIV, a doença segue cursos diferentes: há os progressores rápidos (10 a 15% das crianças), cujos sintomas surgem nos dois primeiros anos de vida; progressores intermediários (50 a 70%), com sintomas iniciais leves nos primeiros cinco anos; e lentos (10 a 15%), os quais são livres de manifestações até oito anos (Blanche et al. 1990, Barnhart et al. 1996). Os progressores rápidos apresentam cargas virais plasmáticas de HIV maiores que progressores não rápidos até os dois primeiros anos de idade (Shearer et al. 1997).

Tabela 1: Categorias clínicas e imunológicas de acordo com as alterações imunológicas e com os sinais e sintomas apresentados pelas crianças com infecção pelo HIV.

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

Tabela 2: Categorias imunológicas de acordo com os números absolutos e percentuais de linfócitos T CD4+ apresentados pelas diferentes faixas etárias das crianças com infecção pelo HIV.

Alteração Imunológica	Linfócitos T CD4+ (células/mm³ e %)		
	< 12 meses	1 a 5 anos	6 a 12 anos
Ausente (1)	≥ 1500 (≥ 25%)	≥ 1000 (≥ 25%)	≥ 500 (≥ 25%)
Moderada (2)	750 - 1499 (15 - 24%)	500 - 999 (15 - 24%)	200 - 499 (15 - 24%)
Grave (3)	< 750 (< 15%)	< 500 (<15%)	< 200 (<15%)

As manifestações clínicas das crianças e adolescentes com HIV incluem hepatoesplenomegalia, linfadenopatia, falha do crescimento, candidíase, diarreia recorrente, parotidite, cardiomiopatia, hepatite, nefropatia, atraso do desenvolvimento, encefalopatia, síndrome consuptiva, anemia, trombocitopenia, pneumonia intersticial linfocítica, tumores (especialmente leiomiossarcomas e linfomas), toxoplasmose e infecções bacterianas de repetição. Uma das mais frequentes infecções oportunistas é a

pneumonia por *Pneumocystis jiroveci*. Além disso, a coinfeção pela tuberculose tem destaque, especialmente na África. Coinfeções por micobactérias atípicas e herpes vírus (como citomegalovírus, herpes simplex vírus e varicela zoster vírus) são também comuns (Carvalho & Tonelli 1999, Chakraborty 2005, Lodha et al. 2006, Guillén et al. 2010, Cruz et al. 2011, Alarcón et al. 2012, Patel et al. 2012).

Sistema Imunológico da criança na infecção por HIV

A infecção vertical pelo HIV se dá em um sistema imunológico ainda em desenvolvimento e amadurecimento (Jaspan et al. 2006). São relatadas alterações numéricas e funcionais em várias células do sistema imunológico, especialmente nos compartimentos T e B.

O início dos sintomas de AIDS e a morte já foram correlacionados às contagens de linfócitos CD4+ após seis meses de idade (Bamji et al. 1996). Desde a infância, lactentes infectados apresentaram uma queda mais acentuada dos valores percentuais e absolutos de CD4 e aumento significativo da subpopulação CD8, promovendo uma inversão das porcentagens de células T CD4 e T CD8 (Gallagher et al. 1997, Iwajomo et al. 2011).

No timo, os timócitos T CD4 e as células dendríticas são infectadas pelo HIV e morrem, comprometendo o processo de desenvolvimento e maturação de células T (Chakraborty 2005, Kolte 2013). Os *T cell receptor excision circles* (TREC), fragmentos de DNA gerados no timo durante o processo de rearranjo gênico e considerados marcadores moleculares de emigrantes tímicos para linfócitos T, estavam reduzidos na infecção por HIV e se correlacionavam positivamente ao percentual de CD4 e negativamente à CV (Douek et al. 2000, De Rossi et al. 2002).

Desde a infância, lactentes infectados apresentaram aumento significativo da porcentagem de células CD8⁺ de memória (CD45RO⁺) e CD4⁺ e CD8⁺ ativadas (CD38⁺ HLA-DR⁺) e redução da porcentagem de células CD4⁺ e CD8⁺ naive em relação a expostos não infectados e controles (Plaeger-Marshall et al. 1994, Gallagher et al. 1997, Ananworanich et al. 2010). Além disso, os lactentes com infecção vertical pelo HIV tiveram maiores índices de apoptose celular espontânea em relação a controles (Alfonzo et al. 2012). Além das alterações fenotípicas, foram relatadas alterações funcionais dos linfócitos T na infecção vertical pelo HIV. A proliferação de linfócitos T e a produção de citocinas Interleucina-10 (IL-10), IFN- γ e Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α) frente à fitohemaglutinina (PHA), um potente mitógeno, foi reduzida em lactentes com infecção pelo HIV em relação a controles saudáveis (Alfonzo et al. 2012).

Outras subpopulações de linfócitos T também sofrem alteração de número e função com a infecção por HIV. Alterações nas populações de TCR $\gamma\delta^+$ na periferia e mucosa foram reportadas desde a infecção aguda, sendo que a atividade citolítica, proliferação e produção de citocinas foram inibidas com a infecção (Poles et al. 2003, Alfano & Poli 2005). Em crianças infectadas pelo HIV com imunossupressão grave, houve aumento da porcentagem de linfócitos T regulatórios (Treg) em relação a controles, o que foi associado à progressão à AIDS (Cao et al. 2009, Argüello et al. 2012). Também foi descrita a redução na produção de IL-17 em *Enzyme-linked Immunosorbent Spot assay* (ELISPOT), correlacionando a menor frequência de células Th17 à viremia de HIV-1 (Ndhlovu et al. 2008).

Além das deficiências encontradas nos linfócitos T, células apresentadoras de antígeno também são comprometidas com a infecção pelo HIV. As células dendríticas (*dendritic cells*, DC) são capazes de capturar o vírus e o transmitir a linfócitos T,

propagando a infecção, mas também inibem a replicação viral pela secreção de Interferon- α (IFN- α) (Groot et al. 2006). A frequência dos dois tipos principais de DC, mielóide (mDC) e plasmocitóide (pDC), está diminuída em crianças infectadas por HIV, ocorrendo também alterações na expressão de moléculas e secreção de citocinas, como o IFN- α (Desai et al. 2007, Zhang et al. 2008). Da mesma forma, os monócitos podem contribuir para o controle da infecção pelo HIV pela produção de citocinas e quimiocinas; por outro lado, são permissíveis à infecção pelo vírus, contribuindo para a propagação da infecção (Borrow et al. 2008, Sassé et al. 2012). Embora a função fagocítica de monócitos em crianças com infecção pelo HIV fosse normal, a fusão fagolisossomal foi reduzida em relação a controles (Pittis et al. 1997, Tardei et al. 2000).

Na infecção por HIV, crianças apresentaram desequilíbrio das subpopulações de linfócitos Natural Killer (NK), emergindo inclusive populações com perda de funções efetoras, como degranulação (Ballan et al. 2007, Ananworanich et al. 2010). Os números de NKT também estavam reduzidos, em parte pela sua susceptibilidade à infecção pelo HIV (Sandberg et al. 2002, Li & Xu 2008).

Desde a fase aguda da infecção pelo HIV, o compartimento B apresentou redução do número de linfócitos B totais (Titanji et al. 2005, Ananworanich et al. 2010, Moir et al. 2010, Iwajomo et al. 2011). Os linfócitos B também apresentaram aumento da expressão dos marcadores de ativação celular e apoptose (De Milito et al. 2006, Cotugno et al. 2012). Um fenômeno identificado desde a fase inicial da doença e relacionado a essa maior ativação celular é a hipergamaglobulinemia, com níveis séricos de Imunoglobulina A (IgA) e IgG superiores aos normais, além de elevação da produção espontânea de IgG *in vitro* (De Milito et al. 2001, De Milito et al. 2004, Titanji et al. 2006, Chong et al. 2004, Ghosh et al.

2009). O número de linfócitos B de memória está reduzido, e as porcentagens de suas subpopulações estão alteradas em adultos (De Milito et al. 2001, De Milito et al. 2004, Titanji et al. 2006, D'Orsogna et al. 2007, Küppers 2008, Fogli et al. 2012) e em crianças (Ghosh et al. 2009, Iwajomo et al. 2011), especialmente em pacientes que apresentaram maiores níveis de CV. Além disso, há deficiência na proliferação de células B frente a estímulos por CD40 e ao mitógeno *pokeweed* (PWM), na produção de IgG frente a antígenos de pneumococos e na coestimulação aos linfócitos T CD4 via CD80 e CD86, fenômenos diretamente relacionados à viremia plasmática de HIV-1 (Malaspina et al. 2003, Moir et al. 2003, Iwajomo et al. 2011). Em adultos, fenótipos de linfócitos B com sinais de exaustão (redução da capacidade proliferativa, receptores inibitórios e alteração de receptores de *homing*) já foram descritos (Moir et al. 2008a).

As crianças e adultos infectados por HIV apresentaram imunidade específica deficiente para antígenos vacinais (Obaro et al. 2004, Tejioken et al. 2007, Farquhar et al. 2009, Miller & Rathore 2012). A comparação da resposta imune específica entre infectados e expostos não infectados revelou melhor resposta ao toxóide diftérico (Borkowsky et al. 1992), à vacina de hepatite B (Watanaveeradej et al. 2002), à de rubéola (Lima et al. 2004) e à de sarampo (Scott et al. 2011) entre as crianças não infectadas. A maioria das crianças imunizadas com as vacinas de sarampo, caxumba e rubéola (SCR) e tétano não tinha proteção sorológica para os antígenos vacinais, diferentemente do observado para *Haemophilus influenzae* tipo b (Melvin & Mohan 2003, Rosenblatt et al. 2005, Bekker et al. 2006, Farquhar et al. 2009). Os títulos de anticorpos anti-sarampo e anti-pneumococos de adultos com infecção crônica pelo HIV foram menores que os encontrados em controles saudáveis (Titanji et al. 2006).

Terapia antirretroviral

A introdução TARV às crianças com infecção vertical pelo HIV, especialmente a TARVc, tem como objetivo a redução da morbimortalidade, adequação do crescimento e desenvolvimento, aumento da qualidade de vida e preservação ou reconstrução do sistema imunológico, por meio da supressão da replicação viral e consequente aumento dos números de linfócitos T CD4⁺ (Ministério da Saúde 2009, Guillén et al. 2010, Bunupuradah et al. 2011).

Com a introdução da TARV, o número de mortes associadas a AIDS no mundo caiu em 25% em relação a 2005, mas ainda foi de 1,7 milhões de pessoas em 2011 (UNAIDS 2012). Em 2012, cerca de 10 milhões de pessoas recebiam TARV nos países em desenvolvimento, dentre os quais 630 mil eram crianças (WHO 2013). No mundo inteiro, apenas 28% das crianças elegíveis à terapia recebia TARV em 2011 (UNAIDS 2012).

No Brasil, a zidovudina foi a primeira TARV a ser disponibilizada, em 1991 e, desde 1996, o governo garante o tratamento universal e gratuito aos pacientes infectados por HIV elegíveis ao uso de TARV em monoterapia ou terapia dupla (Departamento de DST, AIDS e Hepatites Virais 2012a). Atualmente, cinco classes de ARV estão disponíveis para os pacientes com infecção pelo HIV: Inibidores Nucleosídeos da Transcriptase Reversa, Inibidores Não Nucleosídeos da Transcriptase Reversa, Inibidores da Protease, Inibidores de Fusão e Inibidores da Integrase, sendo todos inibidores do ciclo de replicação viral (Ministério da Saúde 2009, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos 2012). Entre 1995 e 1996, os medicamentos mais eficazes (como os Inibidores da Protease) já estavam disponíveis no Brasil e, a partir de 1999, houve a introdução de esquemas

terapêuticos triplos (Brito et al. 2000). Somente em 2012, 780 milhões de reais foram investidos pelo governo brasileiro para manter o programa de tratamento universal (Departamento de DST, AIDS e Hepatites Virais 2012a, Departamento de DST, AIDS e Hepatites Virais 2012c). Em dezembro de 2012, 217 mil pessoas estavam em tratamento (Departamento de DST, AIDS e Hepatites Virais 2012a).

Para os pacientes pediátricos, os primeiros ARV disponíveis em 1996 pelos guias brasileiros de tratamento foram a ZDV, didanosina, zalcitabina e lamivudina; entre 1997 a 1998, foram disponibilizados a estavudina, ritonavir e nelfinavir; a partir de 1999, nevirapina e efavirenz; em 2000, amprenavir, abacavir e indinavir; em 2001, a formulação de lopinavir e ritonavir combinada; entre 2002 e 2003, tenofovir, atazanavir e saquinavir; em 2006, tipranavir, enfuvirtida; e, a partir de 2009, darunavir, fosamprenavir e raltegravir (Ramos et al. 2011).

No guia de manejo de crianças e adolescentes de 2009, o Ministério da Saúde recomenda que crianças menores de 12 meses com diagnóstico de infecção por HIV devem iniciar a TARVc, devido a benefícios da terapia precoce na recuperação imunológica (Walker et al. 2004, Turkova et al. 2012). Em maiores de 12 meses de idade, crianças nas categorias clínicas B e C são tratadas. Deve-se considerar a terapia para pacientes N ou A se CV > 100.000 cópias/mL e tratar, independentemente de CV, os pacientes destas categorias com imunossupressão, cujo critério é definido por faixas etárias (Ministério da Saúde 2009). Recomenda-se o uso de, no mínimo, três drogas de duas classes diferentes (Ministério da Saúde 2009).

A terapia envolve riscos de toxicidade a curto e longo prazo. Foram relatados casos de anemia, neutropenia, dislipidemia, trombocitopenia, *rash* cutâneo e exantema, aumento

de risco de doenças cardiovasculares, redução da densidade mineral óssea e nefrotoxicidade associados ao uso de TARV (Funk et al. 2008, Foster & Fidler 2010, Marón et al. 2010).

A proporção de crianças que sofre falha virológica no primeiro esquema de TARVc é alta, chegando a 22,4% nas primeiras 24 semanas de tratamento e 44% no final do primeiro ano (Bunuparah et al. 2011, Rath et al. 2013). Quando o paciente não responde à terapia, a viremia plasmática de HIV sofre rebote, voltando aos níveis pré-TARVc (Ometto et al. 2002). A falha da terapia pode ser devida à resistência viral aos medicamentos, má absorção, dose inadequada por interações entre medicamentos ou ingestão subótima, palatabilidade, restrição de medicamentos para crianças menores e má adesão (Marón et al. 2010, Turkova et al. 2012, Rath et al. 2013). Pacientes na adolescência experimentam grandes dificuldades para manter a adesão, especialmente devido a barreiras cognitivas (Futterman 2005). Em crianças e adolescentes brasileiros, foram associados à menor adesão: intolerância à medicação, dificuldade de administração, falta de supervisão do responsável à tomada da medicação, menor classe sócio-econômica, viremia plasmática detectável, cuidador sem prática de religião e faltas no atendimento ambulatorial (Ernesto et al. 2012). Em casos de falha terapêutica, toxicidade à TARV ou mesmo para simplificar o esquema, procede-se a mudança do esquema de TARVc, visando a supressão da replicação viral e a qualidade de vida do paciente (Funk et al. 2008, Schiavi et al. 2009, Foster & Fidler 2010).

Reconstituição Imunológica com TARV

O acompanhamento de coortes de AIDS pediátrica ao longo dos anos mostrou que, juntamente ao aumento progressivo do número de células T CD4, o uso de TARV

proporcionou redução do número de novos casos de AIDS, de infecções e da morbimortalidade, principalmente após a introdução de TARVc (Resino et al. 2006a, Funk et al. 2008, Guillén et al. 2010, Micheloud et al. 2012).

A introdução de primeiro esquema de TARVc levou à recuperação imunológica ($CD4 \geq 25\%$) de 89% das crianças em 96 semanas, sendo que 75% apresentavam também a supressão da viremia plasmática (Bunuparah et al. 2011). Após um ano de TARVc, valores de T CD4⁺ em crianças infectadas pelo HIV foram similares ao observado no grupo controle (Vrisekoop et al. 2008). Para alguns pacientes, o aumento de linfócitos CD4 chega a um *plateau* rapidamente (Essajee et al. 1999). Embora o número de T CD4 tenha aumentado ao longo de 100 semanas de TARVc em crianças e adolescentes com imunossupressão grave ($CD4 < 15\%$), a mediana de CD4 não ultrapassou 25% neste período (Essajee et al. 1999, Rigaud et al. 2008, Bunuparah et al. 2011).

A reconstituição imunológica por TARVc na criança está ligada ao tamanho e à função do timo (Hardy et al. 2004, Kolte et al. 2009). Os valores de TREC se correlacionaram positivamente com o número de células T CD4⁺ e com a frequência de células CD4 *naïve* (Chavan et al. 2001, Ometto et al. 2002, Resino et al. 2004a, Saitoh et al. 2006, Anselmi et al. 2007) e negativamente com a CV de HIV-1 (Chavan et al. 2001). Os níveis de TREC e células T *naïve* em crianças e adolescentes infectados por HIV sob TARVc foram semelhantes aos de controles saudáveis de mesma idade e superiores aos encontrados em adultos infectados (Lee et al. 2006, Resino et al. 2006b, Badolato et al. 2008, Vrisekoop et al. 2008, Weinberg et al. 2008). Os pacientes pediátricos tendem a apresentar uma expansão preferencial de células T *naïve* após o início de TARVc bem sucedida, com restabelecimento mais rápido e mais diverso do repertório de linfócitos T

CD4⁺ que nos adultos (Van Rossum et al. 2001). Houve redução do percentual de fenótipos de CD4 ativados (CD38⁺ HLA-DR⁺), equiparando-se a controles saudáveis (Zaccarelli-Filho et al. 2007, Weinberg et al. 2008). Assim, enquanto os linfócitos T CD4 naive (CD27⁺ CD45RO⁻, CD28⁺ CD95⁻, CD45RA⁺ CCR7⁺, CD45RA⁺ CD62L⁺ e CD27⁺ CD45RA⁺) retornaram aos níveis normais após anos de TARVc, o número ou proporção de T CD4 de memória (CD45RO⁺, CD45RO⁺ HLA-DR⁺, CD28⁺ CD95⁺ e CD27⁻ CD45RA⁻) ainda estava reduzido em relação a controles, especialmente em pacientes com replicação viral persistente (Resino et al. 2002a, Lee et al. 2006, Anselmi et al. 2007, Zaccarelli-Filho et al. 2007, Vrisekoop et al. 2008, Weinberg et al. 2008, Ssewanyana et al. 2009).

No entanto, mesmo após mais de um ano em TARVc e recuperação dos valores normais de T CD4, crianças e adolescentes apresentaram maiores números absolutos e percentuais de T CD8 que controles (Lee et al. 2006, Montoya et al. 2007, Zaccarelli-Filho et al. 2007, Weinberg et al. 2008). Após a introdução de TARVc, crianças com infecção vertical pelo HIV tiveram redução da proporção de células ativadas CD8⁺ CD38⁺ HLA-DR⁺ (Resino et al. 2004b). No entanto, em comparação a controles de mesma idade, a expressão de moléculas de ativação nos linfócitos CD8 (CD38⁺ HLA-DR⁺) foi elevada em crianças em TARV e TARVc, especialmente as com progressão mais rápida ou com replicação viral, o que não foi verificado em adolescentes (Paul et al. 2001, Lee et al. 2006, Zaccarelli-Filho et al. 2007, Weinberg et al. 2008). Em crianças em uso de TARVc, o percentual de linfócitos CD4 foi diretamente correlacionado ao percentual de CD8 naive (CD45RA⁺ CD62L⁺), mas inversamente correlacionado à porcentagem de CD8 totais, efetores (CD8⁺ CD57⁺ e CD8⁺ CD28⁺ CD57⁺) e ativados de memória (CD8⁺ CD45RO⁺ CD38⁺) (Navarro et al. 2001). A CV de HIV tinha correlação positiva com a porcentagem

de linfócitos CD8 de memória (CD45RO⁺ e CD45RO⁺ CD38⁺) e ativados (CD38⁺ e/ou HLA-DR⁺) e negativa com células CD8 sem o fenótipo de ativação (Navarro et al. 2001). Após mais de dois anos em TARVc de sucesso, os percentuais de CD8 naive (CD45RA⁺ CD62L⁺, CD45RA⁺ CCR7⁺ e CD45RA⁺ CD27⁺) e de memória CD45RA⁻ CD62L⁺ de crianças infectadas alcançaram valores normais, mas não a população de memória central CD45RA⁻ CCR7⁺ (Pahwa et al. 2006, Anselmi et al. 2007, Zicarelli-Filho et al. 2007, Weinberg et al. 2008). A expressão da molécula de regulação negativa *Programmed Cell Death-1* (PD-1) em células CD8⁺ foi superior em crianças infectadas pelo HIV em TARVc em relação a controles, sendo diretamente correlacionada à frequência de naive ativada (CD27⁺ CD45RA⁺ CD38⁺ HLA-DR⁺) e inversamente ao percentual de naive total CD27⁺ CD45RA⁺ (Ssewanyana et al. 2009).

As alterações numéricas de TCR $\gamma\delta^+$ apresentaram reversão durante a TARVc (Poles et al. 2003). A supressão viral sustentada e a manutenção ou recuperação da proporção de linfócitos CD4 foram associadas à recuperação da frequência de Tregs, pDC, mDC e NK (Sandberg et al. 2002, Badolato et al. 2008, Freguja et al. 2011). No entanto, TARVc não foi capaz de normalizar completamente a distribuição dos subtipos de NK e a produção de IFN- α (Azzoni et al. 2005, Usuga et al. 2008).

Após TARVc, crianças apresentaram valores de linfócitos B similares a controles (Montoya et al. 2007, Zicarelli-Filho et al. 2007). Reduções significativas nos níveis de IgG e IgM ocorreram após a introdução da TARVc (Bekker et al. 2006, Titanji et al. 2006). Apesar de alguns estudos mostrarem aumento e até restauração dos números de linfócitos B de memória com TARVc precoce, as porcentagens de suas subpopulações continuavam alteradas (Moir et al. 2008b, Pensieroso et al. 2009, Moir et al. 2010, Cagigi et al. 2010).

Alguns estudos sobre a recuperação das funções do sistema imunológico foram realizados em pacientes com infecção vertical. O uso de TARV em crianças, sobretudo nas com maior imunossupressão, não foi capaz de restaurar a proliferação frente à PHA e ao PWM, nem a produção de IL-2, IL-4, IFN- γ e TNF- α à PHA e IL-12 a *Staphylococcus aureus* Cowan I (Than et al. 1997, Resino et al. 2002b). Após três anos de TARVc, a proliferação de células frente a PWM, PHA e *S. aureus* Cowan I aumentaram, chegando até valores normais em crianças que alcançaram CD4 > 500 células/mm³ (Ghosh et al. 2009, Resino et al. 2002a). No entanto, mesmo após anos de TARVc, o perfil de citocinas em sobrenadante de cultura foi diferente de controles de mesma idade (Resino et al. 2002a). Em crianças infectadas pelo HIV em TARVc, o número de respondedores a, no mínimo, um de cinco antígenos pelo teste de hipersensibilidade tardia foi reduzida em relação a controles (Costa et al. 2011). A resposta celular ao tétano foi baixa e infrequente (Resino et al. 2002a, Ching et al. 2007, Alsina et al. 2013). Embora a aplicação da vacina de hepatite A tenha induzido significativa resposta proliferativa, a produção de citocinas frente ao antígeno de hepatite A foi muito baixa (Weinberg et al. 2009).

Estudando respostas vacinais em crianças em TARVc, as respostas protetoras foram mais frequentes para tétano e *Streptococcus pneumoniae*, havendo alta proporção de não respondedores para hepatite B, difteria, sarampo, varicela e rubéola (Melvin & Mohan 2003, Siriaksorn et al. 2006, Fernandes et al. 2008, Pippi et al. 2008, Farquhar et al. 2009, Myers et al. 2009, Mutwa et al. 2013). Além disso, os títulos de anticorpos anti-HBs e anti-influenza de crianças e adolescentes com infecção vertical por HIV foram inferiores em relação aos dos controles (Montoya et al. 2007, Fernandes et al. 2008, Pessoa et al. 2010).

Vários fatores influenciaram a resposta vacinal de pacientes com HIV em TARVc. Maior nadir de CD4, menor CV na vacinação e maior percentual de CD4 na vacinação foram preditores de resposta à vacinação para pneumococos em crianças e adolescentes infectados pelo HIV (Abzug et al. 2006). Maior percentual de CD4 atual e menor categoria imunológica pelo CDC foram associados à proteção para difteria e tétano em crianças, sendo este último também influenciado por maiores níveis de T CD4 naive (Rosenblatt et al. 2005, Tejioken et al. 2007, Myers et al. 2009). Já uma melhor resposta à vacina de hepatite B foi associada com maior nadir de CD4, maior percentual de CD4 e CD19 atuais, maiores números absolutos de CD4 na vacinação, menor categoria imunológica pelo CDC, menores CV atuais e na época da vacinação (Bailey et al. 2008, Fernandes et al. 2008, Pippi et al. 2008, Abzug et al. 2009, Mehta et al. 2010, Pessoa et al. 2010, Flynn et al. 2011, Lao-Araya et al. 2011, Mena et al. 2012, Mutwa et al. 2013). A resposta para a vacinação de varicela foi associada com menor CV na vacinação (Levin et al. 2001, Levin et al. 2006), a de hepatite A com maiores níveis de CD4 e CD19 e menor CV pré-vacinação (Rigaud et al. 2008, Weinberg et al. 2009), a de sarampo e coqueluche com maior percentual de CD4 no momento da avaliação (Tejioken et al. 2007) e a de rubéola com menor categoria imunológica pelo CDC (Lima et al. 2004). O número de doses e tempo desde a última vacinação também influenciaram as respostas vacinais de crianças (Tejioken et al. 2007).

Foi demonstrado que os pacientes infectados pelo HIV, mesmo estando em TARVc, perderam sua resposta imunológica para SCR, hepatite B, varicela e tétano ao longo do tempo (Rey et al. 2000, Melvin & Mohan 2003, Bekker et al. 2006, Levin et al. 2006, Aurpibul et al. 2007, Rigaud et al. 2008, Farquhar et al. 2009, Aurpibul et al. 2010, Lao-Araya et al. 2011). Assim, foi proposta a revacinação das crianças sem títulos protetores

para as vacinas da infância (Sutcliffe & Moss 2010, Rainwater-Lovett & Moss 2011). As respostas para tétano e SCR aumentaram após a revacinação durante TARVc (Rosenblatt et al. 2005, Aurpibul et al. 2007, Rigaud et al. 2008, Ghosh et al. 2009).

A introdução de TARVc na fase inicial da infecção por HIV promoveu maior frequência de células B de memória específicas para influenza (em adultos), sarampo e tétano (em crianças), em relação a pacientes que iniciaram o tratamento na fase crônica (Pensiero et al. 2009, Moir et al. 2010). Além disso, as crianças tratadas precocemente apresentaram maiores títulos de anticorpos anti-sarampo e aumento do número de respondedores para as vacinas de sarampo e tétano (Pensiero et al. 2009). No entanto, adultos infectados por HIV apresentaram títulos de anticorpos anti-sarampo reduzidos em relação a controles, independentemente se a TARVc foi iniciada na fase crônica ou aguda da doença (Titanji et al. 2006).

Resposta imunológica ao HIV

Desde o período neonatal, a frequência de lactentes com infecção vertical por HIV que apresentaram anticorpos HIV-específicos foi maior de 87%, sendo a ausência da resposta humoral associada à imunossupressão grave (Pollack et al. 1993). A frequência de linfócitos B HIV-específicos em ELISPOT é baixa, reduzindo ainda mais após a introdução de TARVc (Doria-Rose & Connors 2009). A concentração total de anticorpos anti-HIV e o número de proteínas do vírus reconhecidas pelos lactentes em *Western Blott* aumentaram com a idade, sendo mais comuns respostas anti-Env que anti-Pol e anti-Gag (Pollack et al. 1993). No entanto, os anticorpos neutralizantes (anti-Env) não são efetivos no controle da

infecção pelo alto grau de glicosilação das proteínas do envelope do HIV e alta taxa de mutação do vírus sem sofrer perda de *fitness* (Bailey et al. 2004).

Na infecção pelo HIV, as células CD4 e CD8 específicas têm importante papel na limitação da replicação do vírus e na progressão mais lenta da doença (Klein et al. 1995, Rosenberg et al. 1997, Norris & Rosenberg 2001, Munier & Kelleher 2007, Dyer et al. 2008). Desde a primeira semana de vida, lactentes infectados intra-útero apresentaram produção de IFN- γ por linfócitos em ELISPOT em resposta a um painel de *overlapping* peptídeos do HIV (Thobakgale et al. 2007). A produção de IFN- γ frente a peptídeos de HIV foi relatada em 77% a 85% das crianças com infecção vertical com ou sem uso de TARV, sendo predominante tanto em linfócitos CD4 como CD8, em comparação a IL-2 e TNF- α (Sandberg et al. 2003, Thobakgale et al. 2007, Huang et al. 2008). Em relação a adultos, crianças apresentaram maior frequência de CD4⁺ IL-2⁺ HIV-específica, que foi inversamente correlacionada à CV, maior número de respondedores e maior magnitude de linfoproliferação frente ao antígeno p24 Gag do nucleocapsídeo do HIV (Feeney et al. 2003, Kapogiannis et al. 2006, Correa et al. 2007). Por outro lado, Alfonzo et al. (2012) não conseguiram identificar resposta proliferativa e produção de citocinas IFN- γ , IL-10 e TNF- α por *Cytometric Bead Array* frente a peptídeos do envelope (Env) do HIV em lactentes virgens de TARV. Além disso, lactentes menores de um mês não apresentaram atividade citolítica frente a *overlapping* peptídeos da p24 Gag do HIV (Spiegel et al. 1999).

Estudos com pacientes pediátricos de diferentes faixas etárias divergem quanto às respostas imunológicas ao vírus. Lactentes menores de seis meses tiveram menor número de linfócitos produtores de IFN- γ frente a peptídeos do HIV que bebês entre nove e 24 meses de idade (Scott et al. 2001). Em crianças menores de cinco anos, a proliferação frente

a p24 gag do HIV não foi significativa (Feeney et al. 2003). Em relação aos lactentes de até três meses de vida, as crianças com idade de dois a 12 anos estudadas por Thobakgale et al. (2007) apresentaram maior frequência de respondedores e maior magnitude da produção de IFN- γ HIV-específica. De forma similar, a frequência de respondedores e a magnitude da produção de IFN- γ foram reduzidas em crianças menores de quatro anos em relação aos de maior idade (Sandberg et al. 2003). Em crianças sem ou com uso de TARVc, a produção de IFN- γ para o HIV *in vitro* se correlacionou diretamente à idade (Buseyne et al. 2005, Huang et al. 2008). Interessantemente, a idade também influenciou a imunodominância da resposta ao HIV, com lactentes respondendo principalmente aos peptídeos de Nef e Env, enquanto que as crianças mais velhas geraram respostas a Gag (Huang et al. 2008). Assim, a maturação do sistema imunológico das crianças influencia a montagem da resposta específica ao HIV.

Na infecção pediátrica por HIV, a resposta imunológica ao HIV também depende do estágio de progressão da doença. Com a progressão da doença, as respostas citotóxicas específicas paulatinamente decaem e a consequência é a persistência do vírus (Norris & Rosenberg 2001). Crianças com controle espontâneo da viremia e CD4 > 25% apresentaram exuberante resposta linfoproliferativa ao antígeno p24 Gag do HIV e maior expressão de RNAm de IL-2 frente a Env do HIV (Wasik et al. 2000, Feeney et al. 2003). Além disso, progressores rápidos tiveram menor proliferação e frequência de CD4 IFN- γ ⁺, TNF- α ⁺ e polifuncionais a antígenos de HIV em relação a progressores lentos (Chakraborty et al. 2005, Hainaut et al. 2011, Thobakgale et al. 2011). Já a produção de IFN- γ , IL-5 e IL-13 em cultura de células mononucleares com p24 do HIV, a produção de IFN- γ por

ELISPOT e a expressão de perforina em células CD8 de progressores rápidos e lentos não diferiram (Chakraborty et al. 2005b, Hainaut et al. 2011).

A introdução de TARV e TARVc modifica o padrão de resposta ao vírus. Alguns estudos mostram uma ação relevante da preservação ou recuperação do número e percentual das células CD4; outros apontam para o papel da supressão da viremia (Scott et al. 2003, Feeney et al. 2003, Sandberg et al. 2003, Hainaut et al. 2011, Sharp et al. 2011). A restauração da proporção de CD4 > 25% e a supressão da viremia promoveram uma maior produção de IL-5 e IL-13 frente a p24 do HIV (Hainaut et al. 2011). Em pacientes maiores de cinco anos, a supressão da viremia esteve relacionada à maior proliferação a p24 gag do HIV (Feeney et al. 2003). O tempo em TARVc foi diretamente correlacionado à frequência de linfócitos CD4 IFN- γ + IL-2+ duplo positivos (Kapogiannis et al. 2006). Em crianças e adolescentes sob TARV e sem supressão da viremia, a preservação de linfócitos CD4 esteve relacionada à maior frequência de CD8 produtoras de IFN- γ e *Macrophage Inflammatory Protein-1 β* (Sharp et al. 2011). No estudo longitudinal de Weinberg et al. (2003), crianças e adolescentes sob TARVc apresentaram proliferação e produção de IFN- γ ao HIV inativado em, ao menos, uma ocasião, sendo que a proliferação foi inversamente correlacionada à CV. Ao longo do uso da TARVc pelas crianças com infecção perinatal, a produção de IFN- γ foi reduzida em linfócitos CD8 estimulados por peptídeos de HIV e aumentada em células CD4 incubadas com HIV inativado quimicamente por aldrítol-2 (Weinberg et al. 2008). No entanto, a atividade citolítica frente ao HIV foi suprimida após a introdução de TARVc (Spiegel et al. 1999).

Contudo, os estudos são divergentes quanto à relação entre produção de IFN- γ *in vitro* e a CV sob TARV. Enquanto alguns estudos encontraram alta proporção de pacientes

com infecção vertical ao HIV com maior magnitude e frequência de células CD4 e CD8 produtoras de IFN- γ frente a antígenos de HIV, outros mostram o contrário (Sandberg et al. 2003, Scott et al. 2003, Zhang et al. 2006, Huang et al. 2008). Alguns trabalhos mostram uma correlação direta entre a produção da citocina e a CV (Buseyne et al. 2002, Buseyne et al. 2005, Kapogiannis et al. 2006, Zhang et al. 2006); em outros, esta correlação é inversa (Montesano et al. 2010, Sharp et al. 2011) ou dependente do peptídeo estudado (Huang et al. 2008). Uma curva quadrática inversa com amostras de 101 crianças descreveu o padrão de produção de IFN- γ por estímulo com HIV em relação à CV, sendo o pico entre 10^3 e 10^4 cópias de RNA/mL (Borkowsky et al. 2004).

Quando TARVc foi iniciada até os três meses de idade, a produção HIV-específica de IFN- γ por células CD8, a concentração de anticorpos anti-HIV e a proliferação para p24 e gp160 de HIV foram fracas, infrequentes ou ausentes, podendo ser aumentadas com posterior interrupção da TARVc ou devido a *rebound* viral (Luzuriaga et al. 2000, Zanchetta et al. 2008, Thobakgale et al. 2011). A produção de IFN- γ por ELISPOT para peptídeos de HIV de células mononucleares foi superior nas crianças infectadas com início de TARVc após um ano de idade em relação às com início precoce (Spiegel et al. 2000, Borkowsky et al. 2004). Por outro lado, após suspensão da TARVc iniciada na primeira semana de vida, uma lactente de dois anos de idade teve redução drástica na proliferação e na frequência de linfócitos CD4+ IL-2+ e IFN- γ + para os antígenos Gag e Env de HIV (Viganò et al. 2006). Em lactentes que iniciaram TARVc entre três e oito meses de idade, a proliferação frente a antígenos de HIV foi detectável e persistente (Palma et al. 2008). Na caracterização de respostas CD4+ para a proteína p55 gag do HIV, crianças com produção predominante de IFN- γ + apresentaram maiores níveis de viremia ao longo de dois anos que

as crianças com respostas predominantes de IL-2 e polifuncionais (Correa et al. 2007). Assim, é possível que a magnitude e época de exposição aos antígenos virais regulem a construção e manutenção da resposta imunológica ao HIV.

À semelhança de outras infecções congênicas, o HIV tem impacto no desenvolvimento e crescimento, especialmente no sistema imune. No entanto, falta uma compreensão sobre a relação dessa infecção crônica e o desenvolvimento da imunidade adaptativa para antígenos vacinais e para o próprio HIV. Dessa forma, estudar nas crianças e adolescentes com infecção pelo HIV a função dos linfócitos T e B trará novas informações sobre o desenvolvimento da resposta imune adquirida na infecção por HIV.



2- OBJETIVOS

Objetivo geral

Avaliar a associação entre a carga viral plasmática do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) e o sistema imunológico adaptativo de crianças e adolescentes com infecção vertical pelo HIV.

Objetivos específicos

Em pacientes pediátricos com infecção vertical pelo HIV sob terapia antirretroviral (TARV):

1. Comparar pacientes com viremia e com supressão da replicação viral quanto a:
 - a) Número de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺;
 - b) Número de linfócitos B com fenótipo de memória;
 - c) Resposta humoral à imunização para hepatite B, rubéola, tétano e difteria;
 - d) Proliferação de linfócitos T e produção de citocinas em culturas de células mononucleares do sangue periférico estimuladas com HIV-1.

2. Verificar se o controle virológico proveniente do uso de TARV está associado a:
 - a) Número de linfócitos B com fenótipo de memória;
 - b) Resposta humoral à imunização para hepatite B, rubéola, tétano e difteria;
 - c) Proliferação de linfócitos T e produção de citocinas em culturas de células mononucleares do sangue periférico estimuladas com HIV-1.



3- MÉTODOS

Populações estudadas

População de pacientes e local do estudo

O estudo transversal foi conduzido em crianças e adolescentes infectados com HIV, com idade de um a 21 anos. O recrutamento dos indivíduos deu-se no Ambulatório de Imunodeficiência Secundária da Pediatria do Hospital de Clínicas (HC) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) em Campinas, e no Ambulatório de Moléstias Infeciosas do Centro de Orientação e Apoio Sorológico (COAS) em Jundiaí, ambos no estado de São Paulo, Brasil. O acompanhamento dos indivíduos ocorreu nos próprios Ambulatórios.

Os critérios de inclusão foram a presença da infecção por transmissão vertical do HIV comprovada de acordo com os critérios do Ministério da Saúde (2009) e uso de terapia antirretroviral.

Os critérios de não inclusão para os pacientes foram a evidência clínica e laboratorial de infecção recente por hepatite B ou C, citomegalovírus, sífilis, toxoplasmose ou tuberculose e ocorrência de malformação congênita, doença genética ou condição clínica grave. Os dados clínicos foram coletados dos prontuários dos pacientes.

Os pacientes foram separados em dois grupos, de acordo com sua carga viral plasmática (CV) de HIV-1:

- Pacientes com controle virológico: apresentavam CV indetectável ($CV < 50$ cópias de RNA de HIV-1/mL) na data de coleta dos exames e um ano antes, no mínimo.
- Pacientes virêmicos: apresentavam $CV \geq 1000$ cópias/mL na data de coleta dos exames e $CV > 50$ cópias/mL nos últimos seis meses.

Cálculo amostral

Considerando um teste bicaudal com desvio padrão de 4,5 (em resultados preliminares de ensaios de proliferação celular específica para o HIV-1), a diferença a ser detectada de 5, o nível de significância de 5% e o poder do teste de 80%, o número amostral calculado foi de 13 indivíduos em cada grupo de pacientes com HIV.

População de controles saudáveis

Crianças e adolescentes saudáveis entre quatro e 20 anos de idade foram convidados a participar do estudo como controles. Foi realizada uma consulta médica e exames laboratoriais para avaliar a saúde destes indivíduos. Os critérios de exclusão para os controles foram a evidência clínica e laboratorial de infecção por HIV, hepatite B ou C, citomegalovírus, sífilis, toxoplasmose ou tuberculose, ou ocorrência de malformação congênita, imunodeficiência primária, doença genética, condição clínica grave ou uso de imunossupressor.

Aspectos éticos

O projeto inicial desta tese foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) da UNICAMP, segundo protocolo 876/2010 (Anexo 1). Todos os procedimentos obedeceram às recomendações para pesquisas biomédicas envolvendo seres humanos propostas pela Resolução nº 196 de 10 de outubro de 1996 do Conselho Nacional de Saúde. Após explicados os objetivos e métodos do projeto de pesquisa, foi pedido aos responsáveis legais pelas crianças e adolescentes que lessem e assinassem o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 2) no momento de adesão ao estudo.

Coleta de sangue

Entre agosto de 2010 a junho de 2013, as coletas dos controles saudáveis foram realizadas no Centro de Investigação em Pediatria (CIPED) na FCM da UNICAMP, enquanto que as coletas das crianças infectadas com o HIV foram realizadas na Seção de Coleta da Patologia Clínica do HC da UNICAMP. O volume total de amostra de sangue periférico coletado foi de 20mL.

Hemograma

O hemograma foi realizado a partir de 0,5mL de sangue periférico coletado em tubo com EDTA K3 líquido na Seção de Hematologia do Laboratório de Patologia Clínica do HC da UNICAMP, havendo a contagem de células global e diferencial no equipamento XE 5000 (Sysmex Corporation, Japão).

Imunoglobulinas

A quantificação de imunoglobulinas A (IgA), IgE, IgM e IgG foi realizada a partir do soro obtido da centrifugação de 4mL de sangue periférico coletado em tubo seco. O exame foi realizado por nefelometria no equipamento BN ProSpec System (Siemens Healthcare Global, EUA), na Seção de Imunologia do Laboratório de Patologia Clínica do HC da UNICAMP.

Carga viral de HIV

A quantificação de carga viral de HIV-1 foi realizada a partir do plasma obtido de 4mL de sangue periférico coletado em tubo com EDTA K3 líquido no Laboratório de AIDS do HC da Unicamp, por meio do método quantitativo de Branched-DNA no equipamento Versant 440 (Siemens Healthcare Diagnostics inc., EUA). Os limites mínimo e máximo para detecção do RNA de HIV-1 foram de 50 e 500.000 cópias/mL, respectivamente.

Imunofenotipagem de linfócitos T

A imunofenotipagem dos linfócitos CD3⁺, T CD4⁺ e T CD8⁺ foi realizada a partir de 0,5mL de sangue periférico coletado em tubo com EDTA K3 líquido, por meio de citometria de fluxo (citômetro de fluxo BD FACS Calibur, BD Biosciences, EUA). Os exames dos pacientes foram efetuados no Laboratório de AIDS do HC da UNICAMP (citometria com quatro marcadores: anti-CD3 conjugado a isotiocianato de fluoresceína - FITC, anti-CD4 conjugado a alofocianina - APC, anti-CD8 conjugado a ficoeritrina - PE e anti-CD45 conjugado a proteína clorofila peridina - Percp, ensaio Trucount para contagem absoluta de células). A imunofenotipagem dos controles saudáveis foi feita no Laboratório de Marcadores Celulares do Centro de Hematologia e Hemoterapia (Hemocentro) da UNICAMP, usando citometria com três marcadores monoclonais: anti-CD3 Percp, anti-CD4 APC, e anti-CD8 PE, gerando as porcentagens de cada população linfocitária. Para a contagem absoluta de linfócitos T dos controles, foram usados os dados do hemograma da mesma amostra.

Imunofenotipagem dos linfócitos B

A imunofenotipagem dos linfócitos B foi realizada a partir de 0,5mL de sangue periférico coletado em tubo com EDTA K3 líquido. O exame foi efetuado no Laboratório de Imunologia do CIPED da FCM da UNICAMP.

Primeiramente, 100uL de sangue total foram incubados com anticorpos monoclonais de camundongo anti-CD20 conjugado a ficoeritrina cianina 5 - PECy5, anti-CD19 FITC e anti-CD27 PE (Beckman-Coulter, EUA) por 20 minutos a 4°C, protegidos da luz. A seguir, houve a adição de uma solução de lise com cloreto de amônio, bicarbonato de potássio e ácido etilenodiamino tetra-acético (NH₄Cl 0,15M, KHCO₃ 10mM e EDTA 4Na 37mg/L, Sigma-Aldrich, EUA) para provocar hemólise, incubando por 15 minutos à temperatura ambiente. Após lavagem com Salina Tamponada com Fosfato (PBS, preparado com NaCl 137mM, KCl 2,7mM, Na₂HPO₄ 8,1mM e KH₂PO₄ 1,5mM, Sigma-Aldrich, EUA), acrescida de 1% de soro bovino fetal inativado pelo calor (Sigma-Aldrich, EUA) e 0,1% de azida sódica (Êxodo Científica, Brasil), as células foram ressuspendidas em uma solução de paraformaldeído 1% (diluído em PBS em pH 7,2, Sigma-Aldrich, EUA) e a leitura foi realizada no citômetro de fluxo BD FACS Calibur (BD Biosciences, EUA) do Laboratório de Citometria do Hemocentro da UNICAMP. Foram adquiridos no mínimo 20.000 eventos no *gate* de linfócitos para análise no programa computacional FACSDiva versão 6.2 (BD Biosciences, EUA). Para a contagem absoluta de linfócitos CD19⁺, foi usado o número de linfócitos do hemograma da mesma amostra. As subpopulações CD19⁺ CD20⁺, CD19⁺ CD27⁺ e CD19⁺ CD20⁺ CD27⁺ foram calculadas a partir do número de linfócitos CD19⁺.

Vacinação

As crianças saudáveis e os pacientes infectados com HIV foram imunizados de acordo com o Programa Nacional de Imunização (PNI) do Brasil, que inclui a administração de uma dose da vacina para sarampo, caxumba de rubéola (SCR) entre 12 e 15 meses e três doses da vacina de Hepatite B (ao nascimento, no primeiro e no sexto meses de vida). Para os pacientes infectados com HIV de classificação C3 (CDC 1994) não é recomendada a administração da vacina SCR (Ministério da Saúde 2009). No entanto, os registros de imunização recuperados das carteiras de vacinação das crianças revelaram que a grande maioria dos pacientes aqui incluídos já haviam sido vacinados antes do diagnóstico ou antes de serem estadiados como C3.

Concentração de anticorpos anti-hepatite B e anti-rubéola

A concentração de anticorpos contra o antígeno de superfície do vírus da hepatite B (anti-HBs) e anticorpos IgG contra o vírus da rubéola foi realizada em soro obtido da centrifugação de 4mL de sangue periférico coletado em tubo seco. As dosagens foram realizadas pelo imunoensaio quimioluminescente por micropartículas (*Chemiluminescent Microparticle Immunoassay*, CMIA) no equipamento Architect System (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, EUA) na Seção de Imunologia do Laboratório de Patologia Clínica do HC da UNICAMP.

As amostras com concentração de anti-HBs menor que o limite mínimo de detecção de 10mIU/mL foram nomeadas como 5mIU/mL; amostras que ultrapassaram o limite superior de detecção (1000mIU/mL) foram nomeadas 1001 mIU/mL. As amostras de anticorpos IgG contra rubéola com concentração abaixo do limite inferior de detecção de 5

IU/mL foram nomeadas como 2,5IU/mL. Foram consideradas protegidos pacientes com anti-HBs \geq 10mIU/mL e IgG anti-rubéola \geq 10IU/mL (WHO 2009, WHO 2011).

Concentração de anticorpos anti-tétano e anti-difteria

As dosagens de anticorpos anti-tétano e anti-difteria foram realizadas em soro obtido da centrifugação de 4mL de sangue periférico coletado em tubo seco. Foi empregado o *Modified Toxin-Binding Inhibition test* (ToBI), padronizado pelo estudo de Hendriksen et al. (1989), mas usando toxóide diftérico ao invés da toxina (Marcovitz et al. 2002, Souza Matos et al. 2002, Sonobe et al. 2007). O ensaio foi realizado no Instituto Butantan, São Paulo, no estado de São Paulo, Brasil. O teste foi constituído de duas etapas: a soroneutralização e *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA).

Para a soroneutralização, placas de poliestireno de 96 poços com fundo arredondado (Nunc, Dinamarca) foram bloqueadas com 0,1% de albumina bovina (Sigma-Aldrich, EUA), seguida de lavagem. As amostras em diluição seriada (de 1:4 a 1:512) e padrões de referência (anti-toxóide tetânico e anti-toxóide diftérico) foram colocados nos poços. Uma solução de toxóide a 0,1Lf/mL foi adicionada e incubada por uma hora a 37°C, com exceção do controle negativo. Em seguida, placas MaxiSorp de 96 poços com fundo achatado (Nunc, Dinamarca) foram incubadas com anti-toxóide tetânico ou anti-toxóide diftérico de soro equino a 0,1IU/poço, diluído em tampão carbonato 50mM *overnight*. Após lavagem e bloqueio, as amostras soroneutralizadas foram adicionadas à placa de ELISA e incubadas por 90 minutos a 37°C. Após lavagem, houve a incubação com anti-toxóide tetânico ou anti-toxóide diftérico equino, conjugado à *horseradish* peroxidase, por duas

horas à temperatura ambiente. A revelação da reação foi realizada com uma solução substrato e cromógeno e a parada com a adição de ácido. A leitura foi realizada em 450nm. Os títulos de anticorpos foram calculados por meio de um modelo sigmoidal com o programa Combistats© (EDQM, França).

As amostras com concentração de menor que o limite mínimo de detecção de foram nomeadas como IU/mL. As amostras de anticorpos com concentração abaixo do limite inferior de detecção (0,1IU/mL para difteria e 0,01IU/mL para tétano) foram nomeadas como 0,05IU/mL para difteria e 0,005 IU/mL para tétano. Foram consideradas protegidos pacientes com anti-tétano > 0,01IU/mL e anti-difteria \geq 0,1IU/mL (WHO 2006a, WHO 2006b).

Resposta celular ao HIV-1 inativado

Os ensaios de resposta celular ao HIV foram realizados a partir de 15mL de sangue total periférico coletado em tubo heparinizado (Vacuette, Brasil). O método de citometria de fluxo empregado foi modificado do protocolo de Gaines et al. (1996).

Concentração antigênica

O antígeno estudado foi o HIV-1 *clade* B (MN) cultivado em células H9 e, em seguida, inativado por aldritol (AT-2), gentilmente cedido pelo Dr. Jeffrey D. Lifson, coordenador de *AIDS and Cancer Virus Program* da Instituição SAIC-Frederick, NCI-Frederick, EUA. O antígeno foi diluído em PBS estéril (Sigma-Aldrich, EUA) e utilizado na concentração ótima de 400ng/mL de equivalente de p24 em cultura. Como controle negativo, foi usada uma solução de microvesículas (Micro) de uma cultura de células H9

não infectadas por HIV-1, diluídas em PBS estéril (Sigma-Aldrich, EUA) de forma que a concentração de proteína total final (3,07µg/mL de cultura) fosse semelhante à de HIV-1 AT-2.

A fitohemaglutinina (PHA, Sigma-Aldrich, EUA), na concentração de 7,5µg/mL, foi utilizada como controle positivo. O meio RPMI 1640 (LGC, Brasil), suplementado com 10µg/mL de gentamicina e 10% de soro AB humano inativado (Sigma-Aldrich, EUA), foi usado como cultivo sem estímulo.

Proliferação de CMSP

Após diluição do sangue em soro fisiológico 0,9%, foi realizado o isolamento das células mononucleadas do sangue periférico (CMSP) por gradiente de densidade (Ficoll-Paque, GE Healthcare, Suécia) a 1800rpm por 20 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, foram realizadas duas lavagens com soro fisiológico a 1200rpm por 10 minutos à temperatura ambiente. As CMSP foram então cultivadas na concentração de 1×10^6 células/mL, com meio RPMI 1640 suplementado e os estímulos já descritos, em placas de poliestireno de 96 poços com fundo arredondado (Nunc, Dinamarca) em incubadora a 37°C (Revco Technologies, EUA), com atmosfera de 5% de CO₂ durante seis dias.

Após a colheita da cultura, foi realizada a marcação fenotípica dos linfócitos. As células foram coletadas e incubadas com 100uL de EDTA 20mM por 15 minutos, para desfazer possíveis agregados celulares. Em seguida, foram lavadas com tampão de lavagem constituído por PBS acrescida de 1% de soro bovino fetal inativado pelo calor (Sigma-Aldrich, EUA) e 0,1% de azida sódica (Êxodo Científica, Brasil), a 2200rpm à temperatura ambiente. O pellet foi ressuspensionado em PBS e incubado por 5 minutos com 20uL de

Imunoglobulina Humana para bloquear os sítios Fc, seguido de incubação com anticorpos anti-CD3 PercP, anti-CD4 FITC e anti-CD8 APC (BD Biosciences, EUA). Após centrifugação com tampão de lavagem a 2200rpm à temperatura ambiente, foi efetuada a leitura das amostras no citômetro de fluxo FACS Calibur (BD Biosciences, EUA) do Laboratório de Biologia Molecular do Hemocentro da UNICAMP. Foram adquiridos 50.000 eventos totais para análise no programa computacional FACSDiva versão 6.2 (BD Biosciences, EUA). Após estabelecer o *gate* de células CD3⁺, linfócitos pequenos (*resting lymphocytes*) e blásticos foram identificados por observação em *forward* (tamanho celular) e *side scatters* (complexidade interna). A proliferação linfocitária foi avaliada pelo percentual de blastos viáveis CD3⁺, células inviáveis foram excluídas da análise. Para cada cultura, o percentual de blastos foi dado por:

$$\frac{\text{Percentual de células no gate de blastos} \times 100}{\text{Percentual de blastos} + \text{percentual de linfócitos pequenos}}$$

O cálculo de blastos para cada cultura estimulada foi feito da seguinte forma:

- 1- Blastos de HIV = percentual de blastos de HIV - percentual de blastos de Micro
- 2- Blastos de PHA = percentual de blastos de PHA - percentual de blastos do controle sem estímulo

Dosagem de citocinas no sobrenadante das culturas

Após isolamento por gradiente de densidade (Ficoll-Paque, GE Healthcare, Suécia), CMSP foram cultivadas na concentração de 2×10^6 células/mL, com meio RPMI suplementado e os estímulos já descritos, em placas de poliestireno de 96 poços com fundo arredondado (Nunc, Dinamarca) em incubadora a 37°C (Revco Technologies, EUA), com atmosfera de 5% de CO₂ pelo tempo otimizado de 48 horas. O sobrenadante de cultura de CMSP sem estímulo, com estímulo de HIV, Micro e PHA (nas concentrações já descritas

no protocolo de proliferação) foi armazenado a -80°C até a realização das dosagens de citocinas por *Cytometric Bead Array* (CBA) e ELISA.

Cytometric Bead Array (CBA)

Foram verificadas as concentrações de Interleucina-2 (IL-2), IL-4, IL-5, IL-10, Fator de Necrose tumoral- α (TNF- α) e Interferon- γ (IFN- γ) com CBA kit (BD Biosciences, EUA) e IFN- α com CBA Flex (BD Biosciences, EUA). Para o ensaio de CBA Kit, houve primeiramente a incubação de 25 μL de cada amostra ou diluição da curva padrão com 25 μL de anticorpos de captura conjugados a *beads* fluorescentes e 25 μL de anticorpos de detecção contra cada uma das citocinas por três horas à temperatura ambiente, protegidos de luz. Para o ensaio de CBA Flex de IFN- α , 25 μL de cada amostra ou diluição da curva padrão com 25 μL de anticorpos de captura anti-IFN- α , conjugados a *beads* fluorescentes por uma hora. Em seguida, foram adicionados 25 μL de anticorpos de detecção contra IFN- α , havendo a incubação por mais duas horas. Após uma lavagem com tampão de lavagem (BD Biosciences, EUA), as amostras foram ressuspensas em tampão de lavagem e 2000 eventos foram adquiridos para CBA Kit e 300 eventos para CBA Flex com o citômetro FACS Calibur (BD Biosciences, EUA). A análise foi realizada com o programa computacional FCAP Array (versão 3.0.1., BD Biosciences, EUA). Os limites de detecção foram 2,6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para IL-2 e IL-4, 2,4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para IL-5, 2,8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para IL-10 e TNF- α , 7,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para IFN- γ e 1,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para IFN- α . Amostras com concentrações inferiores a estes limites foram estabelecidas em 2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para IL-2 e IL-4, 2,3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para IL-5, 2,7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para IL-10 e TNF- α , 7,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para IFN- γ e 1,4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for IFN- α .

Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)

Para as dosagens de TGF- β 1 foi utilizado um Kit comercial (DuoSet, RD Systems, EUA). Os ensaios foram realizados em placas MultiSorp (Nunc, Dinamarca). Todo o procedimento ocorreu à temperatura ambiente e, entre cada incubação, houve uma etapa de três lavagens com PBS com 0,05% de Tween 20 (Amresco, EUA). Sucintamente, as placas foram incubadas com anticorpos de captura anti-TGF- β 1 diluído em PBS por 15 horas. Em seguida, foi realizado o bloqueio dos sítios inespecíficos com PBS com 1% de albumina bovina (Sigma-Aldrich, EUA). As amostras foram submetidas à ativação de TGF- β 1 com ácido clorídrico (Synth, Brasil) por 10 minutos e neutralizadas com hidróxido de sódio (Merck, Alemanha) pelo mesmo tempo. A placa foi então incubada com as amostras e diluições do padrão recombinante do Kit por duas horas. Em seguida, houve a incubação com anticorpos de detecção, conjugados a biotina por duas horas. A incubação seguinte ocorre com uma solução de streptoavidina conjugada à peroxidase por 20 minutos. A revelação da reação foi feita com uma solução de 3uL de peróxido de hidrogênio a 30% (Fisher Chemicals, EUA) e 100uL de tetrametil-benzidina (TMB, Sigma-Aldrich, EUA) em 10mL de uma solução de acetato de sódio a 0,8% e pH 5,5 (Fisher Chemicals, EUA) por 30 minutos e a parada ocorreu com a adição de H₂SO₄ 2N (F. Maia Indústria e Comércio, Brasil). A leitura foi realizada em 450nm. O limite de detecção de TGF- β 1 foi de 15,6pg/mL.

Em todos os ensaios foi estabelecida uma curva padrão, com gráfico de dispersão, no qual a variável *X* foi a densidade óptica obtida nas leituras e *Y*, a concentração das citocinas. A equação da figura do gráfico foi adquirida através de uma linha de tendência polinomial, aceita somente se r^2 fosse maior que 0,95 no programa Microsoft Excel versão

2010 (Microsoft Corporation, EUA). Todas as amostras e pontos da curva padrão foram feitos em duplicata.

Análise estatística

Os dados foram organizados e analisados em SPSS® software for Windows, versão 17.0.0. (SPSS Inc, EUA). A análise estatística foi realizada com os testes de Kruskal-Wallis, Wilcoxon, Mann-Whitney, Comparações Múltiplas Não Paramétricas, Correlação de Spearman e exato de Fisher. O nível de significância adotado foi p valor < 0,05. Os gráficos foram feitos no Software GraphPad Prism, version 5.0 (GraphPad Software, EUA).



4- CAPÍTULOS

Capítulo I

Viremia and immunological memory in Human Immunodeficiency Virus vertical infection

Taís N. MAZZOLA ^a, Jéssica S. BERNACHI ^a, Emanuel B.V. ANJOS ^b, Ana L.F. LONGHINI ^c, Renata M.B.P. LEMOS ^d, Josiane F. Ferreira ^a, Wagner QUINTILIO ^e, Fábio A. de FREITAS ^e, André M. MORCILLO ^f, Sara T.O. SAAD ^c, Irene G.H. Lorand-Metze ^c, Sandra C.B. COSTA ^b, Marcos T.N. Da SILVA ^g, Maria M.S. VILELA ^{a*}

^a Laboratory of Immunology, Center for Investigation in Pediatrics (CIPED), Faculty of Medical Sciences, University of Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brazil

^b Laboratory for the Diagnosis of Infectious Diseases by Molecular Biology Techniques and Antigenemia, Faculty of Medical Sciences, UNICAMP, Campinas, São Paulo, Brazil

^c Hematology and Hemotherapy Center (HEMOCENTRO), UNICAMP, Campinas, São Paulo, Brazil

^d Pediatrics Immunodeficiency Out-Patients' Unit, Clinical Hospital, UNICAMP, Campinas, São Paulo, Brazil

^e Center of Biotechnology, Butantan Institute, São Paulo, São Paulo, Brazil.

^f Center for Investigation in Pediatrics (CIPED), Faculty of Medical Sciences, University of Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brazil

^g Laboratory of Translational Research in Child and Adolescent Health, Center for Investigation in Pediatrics (CIPED), Faculty of Medical Sciences, University of Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brazil

* **Corresponding author at:** Center for Pediatrics Investigation, Faculty of Medical Sciences, University of Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brazil.

E-mail address: marluce@fcm.unicamp.br (M.M.S. Vilela)

Journal: The Pediatric Infectious Disease Journal

Classification: HIV Reports

Conflicts of Interest and Source of Funding: This study was supported by São Paulo Research Foundation (Fapesp), Brazil. The authors declare there were no conflicts of interest and that the paper “Viremia and immunological memory in Human Immunodeficiency Virus vertical infection” was not submitted for consideration elsewhere.

Abstract

Objective: To evaluate the association of HIV-1 viral load control mediated by Antiretroviral Therapy (ART) and memory B lymphocyte counts and humoral immune response to hepatitis B, rubella, tetanus and diphtheria from vertically HIV-infected children and adolescents under ART. **Design:** Cross-sectional study. **Methods:** Complete blood counts, T and B lymphocyte immunophenotyping, immunoglobulin dosage, humoral response to hepatitis B, rubella, tetanus and diphtheria were carried out in 34 HIV-1-infected children and adolescents with undetectable viral load (UVL, below 50 RNA copies/mL), 17 viremic patients (above 1,000 RNA copies/mL) and 27 healthy age-matched controls. ANOVA, Turkey's, Kruskal-Wallis, Nonparametric Multiple Comparison, Spearman and Fisher's exact tests were employed ($p < 0.05$). **Results:** Memory B cell counts were not different among the three groups. Controls had higher number of responders for rubella, hepatitis B and diphtheria and higher Geometric Mean Titers (GMT) of anti-HBs, anti-rubella and anti-tetanus than HIV-infected patients. Higher numbers of memory B cells were seen among patients with lower age at the start of successful cART. Viremic patients had higher serum IgM and IgG and lower GMTs of anti-HBs and anti-rubella, but similar proportions of responders for the vaccines in comparison to patients with UVL. Protection to a vaccine was related to higher T CD4⁺ percentage (hepatitis B), nadir T CD4⁺ count (rubella), number of doses (hepatitis B), and lower time since the last dose (hepatitis B, diphtheria and tetanus) and age at the start of ART (hepatitis B). **Conclusions:** Even after years on cART, HIV-infected, pediatric patients showed lower humoral immunity to the four vaccines although improved immunity to hepatitis B and

rubella were seen in those with suppression of viremia. Nevertheless, memory B cells counts were comparable in HIV-infected patients and controls.

Keywords: HIV; Humoral immunity; Child; Adolescent; B-Lymphocytes; Vaccines.

1. Introduction

Vertically transmitted HIV infection compromises the developing immune system, resulting in early damage to cellular and humoral immune responses [1]. B cell development and maturation are not yet completely understood either in health or in immunocompromised children [2]. Commonly found abnormalities in the B cell compartment are hypergammaglobulinemia, B cell activation, decline in memory B cell numbers, increased expression of activation markers, higher frequency of B cell malignancies, and loss of protective antibody titers to vaccines [3-14].

Use of antiretroviral therapy (ART) and especially combination ART (cART) has increased life expectancy of HIV-1-infected patients [15-16]. The recovery of total B cell number and percentage was promoted by cART use from children and adults [10,17,18]. However, B cell subpopulations (including memory phenotypes) were not fully recovered after treatment [3,11,17,18,19,20].

HIV plasma viral load (VL), age of cART introduction and T CD4⁺ (CD4) count at the time of vaccination can influence restoration and maintenance of response to vaccination with new or recall antigens, varying with the studied antigens [8,12,21,22,23,24,25]. Even after years on cART, HIV-1-infected children had low titers and decreased percentages of responders for rubella, tetanus, diphtheria, hepatitis B,

mumps and measles [8,10,24,26]. Booster vaccination after ART initiation could increase tetanus, rubella, mumps and measles humoral responses [8,11,23].

Few studies have demonstrated a direct impact of ongoing HIV replication on phenotypes or functions from B cell compartment. Higher VL in patients under ART were associated with defective expression and function of costimulatory molecules and altered phenotypes of peripheral B cell subpopulations, including lower counts of memory B cells [4,11,27,28]. In children, HIV plasma replication due to viral failure can be detected as early as 24 weeks after the beginning of the treatment [29]. The present study aimed to shed light on the relationship between viral control by ART, memory B cells and humoral responses to vaccines in HIV-vertically-infected individuals.

2. Methods

Study participants

Fifty-one HIV-1-vertically infected children and adolescents were recruited at the Pediatrics Immunodeficiency Outpatients Unit at the University of Campinas Clinical Hospital (UNICAMP, Campinas, Brazil) and at the Infectious Diseases Outpatients Unit in the Center for Orientation and Serologic Support (COAS, Jundiaí, Brazil). Patients with genetic defects, recent diagnosis of tuberculosis, cytomegalovirus, mononucleosis and toxoplasmosis, or syphilis, hepatitis B or C infection were not included. Clinical data such as time since ART beginning and nadir CD4 were recovered from medical records.

Patients were separated into two groups according to HIV RNA VL:

- With undetectable VL (UVL) for at least one year before blood collection, with a lower limit of quantification at 50 copies of RNA/mL; and

- With VL higher than 1,000 copies of RNA /mL at the date of blood collection and detectable VL in the last six months.

Healthy children and adolescents from five to 20 years were invited to join this study as a control group. They did not have clinical or laboratory evidence of neither genetic defects nor infection by HIV, syphilis, hepatitis B and C.

The study protocol was approved by the UNICAMP Ethical Committee (project 876/2010) and in accord with Helsinki Declaration. Written informed consent was obtained from each patient's parent or legal guardian.

Blood collection

The blood collections were performed from August 2010 to June 2013. Six mL of peripheral venous blood were collected in serum-separating tubes to evaluate immunoglobulin concentration and immune responses to hepatitis B, rubella, tetanus and diphtheria. Two mL of peripheral blood were collected with ethylene diaminetetracetic acid (EDTA) for peripheral blood counts and B and T cell immunophenotyping.

T cell immunophenotyping, complete blood counts (CBC) and HIV-1 RNA viral load

Hemoglobin concentration, hematocrit and platelets, whole leukocytes, neutrophils, lymphocytes, monocytes, eosinophils, basophils and red cells counts were performed in XE 5000 blood cell counter (Sysmex Corporation, Japan). Peripheral counts of CD3⁺ (CD3), CD4 and T CD8⁺ (CD8) cells were quantified by flow cytometry (BD FacsCalibur, BD Biosciences flow cytometer, USA). The Versant 440 Molecular System for Branched-DNA (Siemens Healthcare Diagnostics inc., USA) was used to quantify plasma HIV-1 RNA, with lower limit of detection of 50 HIV-1 RNA copies/mL and an upper limit of 500,000 copies/mL.

B cell immunophenotyping

Whole blood samples were stained with anti-human CD19 conjugated to fluorescein isothiocyanate (FITC), anti-CD20 phycoerythrin-Cy5 (PE-Cy5) and anti-CD27 conjugated to phycoerythrin (PE) monoclonal antibodies (Beckman Coulter, USA) before acquisition of 20,000 events in the lymphocyte gate (BD FACS Calibur flow cytometer, BD Biosciences, USA) and analysis (FACSDiva version 6.2, BD Biosciences, USA). Isotype controls were used to discriminate positive populations. CD19-gated cells were analyzed for CD20 and CD27 (memory) expression. Absolute numbers of B lymphocytes were derived from simultaneously collected CBC.

Determination of immunoglobulin levels

Total Immunoglobulin G (IgG), IgA, IgE and IgM were determined in serum by nephelometric method in a BN ProSpec (Siemens Healthcare Global, German) in the Immunology Section from UNICAMP Clinical Hospital.

Quantitative determination of antibodies anti-HBs and IgG anti-Rubella

The quantitative determination of anti-hepatitis B surface antigen (anti-HBs) and anti-rubella IgG antibodies was performed on serum samples using a chemiluminescent microparticle immunoassay (CMIA) in Architect System (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL) in the Immunology Section from UNICAMP Clinical Hospital. For anti-HBs titers, samples below the lower limit (10mIU/mL) were scored as 5IU/mL; higher levels (1,000mIU/mL) from upper limit were scored as 1,001mIU/mL. For rubella IgG, samples below the lower limit (5IU/mL) were scored as 2.5IU/mL.

Quantitative determination of antibodies anti-tetanus and anti-diphtheria toxoids

The determination of anti-tetanus and anti-diphtheria toxoid (anti-TTxd and anti-DTxd, respectively) antibody levels in serum were carried out in Butantan Institute by a standardized modified Toxin-Binding Inhibition test (TOBI) as described by Hendriksen and colleagues [30] but some modifications [31-33]. Samples below the lower limit for the tests (0.1IU/mL for diphtheria and 0.01IU/mL for tetanus) were considered as 0.05IU/mL for diphtheria and 0.005 IU/mL for tetanus.

Immunization Schedule

HIV-infected children were immunized according to the Brazilian Immunization National Program, which included diphtheria, tetanus, and pertussis vaccine (DPT) administered at 2, 4, 6 months of life, with two booster doses at 15 months and 4–6 years of age and DT booster at 15 years-old; measles, mumps, and rubella vaccine (MMR) administered at 12 months of age. Hepatitis B vaccine was introduced for HIV-infected children in 1998 in Brazil, at a minimum of a 3-dose schedule, given at birth and at the first and sixth months of age. The dates and number of doses from the vaccines taken by the patients were recovered from the immunization record cards.

Statistical considerations

Analyses of CBC, B and T lymphocyte phenotypes, and immunoglobulins were performed with SPSS® for Windows (version 17.0, USA), using Mann-Whitney, Kruskal-Wallis and Nonparametric Multiple Comparison tests. Correlations were performed with

Spearman's rank correlation tests, and Spearman's rho (r_s) was reported. The level of significance was established as p value < 0.05.

Antibody titers were censored by excluding two non-vaccinated subjects, seven children without information about vaccination and one intravenous immunoglobulin user. The comparison of vaccine responses between groups was performed by Fisher's exact test. Children and adolescents were classified as responders when they showed antibody levels \geq 10IU/mL for rubella, \geq 10mIU/mL for hepatitis B, $>$ 0.01IU/mL for tetanus and \geq 0.1IU/mL for diphtheria [34-37]. To evaluate the vaccine titers, the calculation of the geometric mean titers (GMTs) of antibodies was performed on log₁₀-transformed data, and we reported the antilogarithms. For each group, GMTs and 95% confidence intervals (CI) were calculated. One way ANOVA and Tukey's test were applied for comparisons of the log of anti-HBs, anti-tetanus and anti-diphtheria titers. Anti-rubella titers were compared with Kruskal-Wallis and Nonparametric Multiple Comparison tests.

3. Results

Study participants

Samples from 51 patients were studied for B cell compartment. Thirty four patients presented undetectable viral load (UVL) and 17 showed HIV viremia. Table 1 shows gender, age, ART, clinical and immunological classifications (based on the 1994 revised guidelines of the Centers for Disease Control and Prevention) [38]. One child in viral failure used cART for more than three years and was using only lamivudine (3TC) at time of the study. Three viremic patients had multiresistant HIV-1 genotyping, three had reduced options of ART because of the age; all the others had poor adherence to ART.

Twenty-seven healthy children (11 male and 16 female) were included as a control group (median: 15.7 years, aged 4.8 - 19.1). There was no significant difference in age among the three groups (Kruskal-Wallis test, $p=0.287$).

T cell immunophenotyping, CBC, and HIV-1 RNA viral load

The results from CBC, T cell immunophenotyping and VL are shown in Table 2. Monocyte counts were higher in both patient groups than in control children (Nonparametric Multiple Comparison test, $p<0.05$). Red blood cell counts were lower in patients with UVL in comparison to controls (Nonparametric Multiple Comparison test, $p<0.05$), but there was no difference for hemoglobin concentration and hematocrit among the three groups. The absolute number of CD3 and CD8 were higher and CD4/CD8 ratio was lower in both groups of patients than in control children (Nonparametric Multiple Comparison test, $p<0.05$). CD4 cell count was higher in peripheral blood from patients with UVL when compared to viremic patients (Nonparametric Multiple Comparison test, $p<0.05$).

Children with UVL for the last year had, in median, 4.0 (1.5 – 10.7) years of viremic control with median 1 (0 to 5) VL blips since the first UVL.

B cell immunophenotyping and immunoglobulin levels

B cell immunophenotyping and immunoglobulin concentrations are shown in Table 3. The absolute number of total CD19⁺, total CD19⁺ CD20⁺, CD19⁺ CD27⁺ and CD19⁺ CD20⁺ CD27⁺ memory B cells and the percentage of CD27⁺ cells among CD19⁺ and CD19⁺ CD20⁺ cells were not different among the three groups. Memory B cells did not correlate to VL (Spearman's correlation test, $p>0.05$).

The nadir CD4 count from both groups of patients correlated with the absolute counts of CD19⁺ CD27⁺ and CD19⁺ CD20⁺ CD27⁺ ($r_s=0.466$, $p=0.001$; and $r_s=0.490$, $p=0.001$, respectively). Among patients with UVL, the nadir CD4 count also correlated with the percentage of CD27⁺ positive cells among total CD19⁺ and CD19⁺ CD20⁺ cells ($r_s=0.487$, $p=0.007$, and $r_s=0.462$, $p=0.012$). Such a correlation was not observed in viremic patients.

CD4 counts at blood draw (but not percentages) from both groups of patients correlated to the absolute counts of total CD19⁺, total CD19⁺ CD20⁺, CD19⁺ CD27⁺ and CD19⁺ CD20⁺ CD27⁺ B cells ($r_s=0.517$, $p<0.001$, $r_s =0.528$, $p<0.001$, $r_s =0.491$, $p=0.001$, and $r_s =0.532$, $p<0.001$, respectively).

Patients with VL > 1,000 RNA copies/mL showed higher serum IgM and IgG than patients with UVL and higher IgG than controls (Nonparametric Multiple Comparison test, $p<0.05$). Their IgG concentration correlated to VL ($r_s =0.518$, $p=0.040$) and their IgA and IgM levels inversely correlated to CD4 percentage ($r_s= -0.615$, $p=0.011$; and $r_s= -0.765$, $p=0.001$, respectively) and numbers ($r_s= -0.506$, $p=0.046$; and $r_s= -0.588$, $p= 0.017$, respectively).

Patients with UVL had higher IgA concentration than control children (Nonparametric Multiple Comparison test, $p<0.05$), and their IgA levels inversely correlated to CD4 absolute numbers ($r_s= -0.363$, $p=0.041$) and CD4 nadir ($r_s= -0.364$, $p=0.040$).

Immunoglobulin levels did not correlate with memory B cell counts in either group of patients (Spearman's correlation test, $p>0.05$).

Among patients with UVL, absolute numbers of both CD19⁺ and CD19⁺ CD20⁺ memory cells correlated inversely with their age at the start of successful cART ($r_s= -0.390$,

$p=0.037$, and $r_s = -0.412$, $p=0.026$, respectively). Immunoglobulin levels did not correlate with the total time of controlled viremia (Spearman's correlation test, $p>0.05$).

Within children with viremia, the age of ART start correlated inversely with absolute numbers of CD19⁺ CD20⁺ memory cells ($r_s = -0.539$, $p=0.026$).

Analyzing all patients together, there was no difference in the absolute counts of memory B cells or immunoglobulin levels in relation to CDC clinical (N, A and B versus C) and immunological (1 and 2 versus 3) categories (Mann-Whitney test, $p>0.05$).

Quantitative determination of antibodies anti-HBs and anti-rubella and anti-tetanus and anti-diphtheria antitoxoids

No patient studied for humoral immune responses had laboratorial or clinical records of hepatitis B, rubella, tetanus or diphtheria infection. Table 4 shows number of responders and nonresponders in the groups of patients and controls for anti-HBs, anti-rubella, anti-tetanus and anti-diphtheria. Most patients had protective responses against tetanus (30/31, 96.8%) but a large percentage lacked antibodies to hepatitis B (31/46, 67.4%), rubella (18/45, 40.0%) and diphtheria (13/32, 40.6%).

There was no significant difference between the number of responders for the four vaccines in the group of patients with UVL and in the viremic group. Therefore, as we compared the groups of patients to controls, there was a significant difference in the number of responders for anti-rubella (Fisher's exact test, $p=0.001$ for patients with UVL, $p<0.001$ for viremic patients), anti-hepatitis B (Fisher's exact test, $p=0.001$ for patients with UVL, $p<0.001$ for viremic patients) and anti-diphtheria toxin (Fisher's exact test, $p=0.032$ for patients with UVL).

The GMTs are showed in Table 5. Patients with UVL showed higher GMTs of anti-HBs (Tukey's test, $p=0.018$) and anti-rubella (Nonparametric Multiple Comparison test, $p<0.05$) than viremic children. In comparison to both groups of patients, controls had higher GMTs of anti-HBs (Tukey's test, $p=0.018$ for patients with UVL, $p<0.001$ for viremic patients), anti-rubella (Nonparametric Multiple Comparison test, $p<0.05$ for viremic patients) and anti-tetanus (Tukey's test, $p=0.018$ for patients with UVL, $p=0.008$ for viremic patients).

Among viremic patients, anti-HBs titers showed a negative correlation with the age at the beginning of ART ($r_s = -0.676$, $p=0.008$) and a positive correlation with the nadir CD4 count and CD4 count at the blood collection ($r_s=0.682$, $p=0.007$, $r_s=0.685$, $p=0.010$).

Among patients with UVL, anti-HBs, anti-diphtheria and anti-tetanus titers correlated inversely with the time since the last dose of the vaccine taken by the patient ($r_s = -0.481$, $p=0.008$; $r_s = -0.515$, $p=0.014$; $r_s = -0.667$, $p=0.001$, respectively). Anti-HBs titers correlated with the number of doses of hepatitis B vaccine taken by the patients ($r_s=0.487$, $p=0.007$). Antibody titers for hepatitis B, rubella, diphtheria and tetanus showed no correlation with the time since the start of the successful cART (Spearman's correlation test, $p>0.05$).

4. Discussion

The present study aimed to characterize memory B cell numbers and function in asymptomatic, HIV-1-infected children and adolescents under long-term ART, with or without VL control. We used CD27 membrane cell marker, which identifies somatic mutated peripheral memory B lymphocytes [39]. There was no significant difference in the absolute numbers of CD19⁺ CD27⁺ and CD19⁺ CD20⁺ CD27⁺ memory B cells from

viremic patients, patients with UVL and an age-matched control group. Accordingly, a study from Mehta et al. [40] showed that HIV-infected adolescents had similar percentage of memory B cells than controls. HIV-infected adults with or without viremia had similar percentages of CD27⁺ CD19⁺ cells, nevertheless reduced in comparison to controls [3]. While Ghosh and colleagues [11] showed that children with higher VL had decreased number of switched memory B cells, other authors did not find this relation [24,41,42]. Among HIV viremic adults without ART, VL correlated inversely with IgM⁺ memory B cell counts [19].

Maintenance of serologic memory is carried out by plasma and memory B cells, and memory B cells are the major responsible for generating protective antibody levels upon secondary antigenic stimulation, such as vaccine preventable infections [43-44]. We studied humoral immunity to four common immunizing, T-dependent antigens: recombinant protein HBsAg, attenuated rubella virus, tetanus and diphtheria toxins. In general, the number of responders was low among both patient groups, thus we did not notice differences between them for all four vaccines. Unexpectedly, we did not find an association between memory B cell numbers and humoral response to the antigens explored from pediatric patients, differently that was reported before [5,9]. Patients with UVL showed higher GMTs of anti-HBs and anti-rubella than the viremic group, but VL did not correlate with GMTs. Zaccarelli-Filho and colleagues [10] showed that children in different groups of virological response to cART had similar tetanus, diphtheria, hepatitis B and rubella titers and proportion of responders. Lower VL was not related to protection to tetanus and measles from HIV-infected children [45-46]. On the other hand, improved

immunity to rubella, pneumococcal, varicella and hepatitis B vaccines had an association with lower viremia [21,22,47-53].

In our study, CD4 counts correlated with the absolute counts of memory B cells from both groups of patients. Additionally, CD4 counts from viremic patients also had a positive correlation with anti-HBs titers and negative with total IgG levels. CD4 percentage or counts was shown to be inversely correlated with IgG levels, while a directly correlation was observed with total and switched memory B cell frequencies in some studies, but not in others [3,9,11,19,41]. In HIV-infected children and adults, having a higher CD4 was associated with better hepatitis B, rubella, tetanus, measles, diphtheria, pertussis and poliovirus serotype 3 serologic responses [22,47,50,51,54]. Moreover, we reported that the nadir CD4 count correlated with memory B cell counts from HIV-infected patients and with anti-HBs titers from the viremic group. Likewise, lower nadir and pre-vaccination (or revaccination) CD4 percentage or count had a negative association with the immune response from HIV-infected children to hepatitis B vaccine and pneumococcal serotypes [21,50,53,55-56].

Taken together, these results showed that only memory B cell numbers were restored, but specific antibody secretion was impaired in individuals from both groups, particularly in patients with viremia and present or past deficiencies in CD4 counts. HIV antigens were shown to directly modify B cell phenotype and function, inhibiting CD40 signaling, weakening class switching to IgA and IgG, downregulating CD80, and enhancing inhibitory receptor Fc Receptor-like 4 (FcRL4) expression in memory B cells, which impaired B cell proliferation [57-59]. Indeed, higher frequency of FcRL4+ B cells was described in periphery from HIV-infected patients with ongoing HIV replication [27].

Besides, B cells from viremic HIV-infected patients showed lower CD80 and CD86 expression following stimulation, which failed to activate T cells, consequently reducing T lymphoproliferation [4]. Furthermore, quality and quantity defects in T cells, such as lower interleukin-21 production and higher Programmed Cell Death-1 expression, which regulate memory B cell long term survival, may intensify B cell compartment weaknesses [44,60]. Thus, HIV infection fails to permit the successful interaction from B and T cells, impairing the montage of protective immune responses against T-dependent antigens.

Since CDC clinical and immunological categories have been used to classify children even before cART era, it was not expected to find associations between CDC classifications and memory B cells or humoral immunity to vaccines, in the contrary that was formerly described [3,12,24,47].

Altered levels of IgM, IgA and IgG were described in HIV-infected children before and after ART [6, 8, 11,61]. Our cART-treated patients with at least one year of UVL still maintained higher IgA in comparison to controls. In contrast, viremic patients showed higher IgM and IgG than patients with UVL and higher IgG than controls, and their IgG level correlated to VL. Contrarily, Ghosh and colleagues [11] did not find a correlation between immunoglobulins and VL in HIV-infected children. Continuously high immunoglobulin levels in HIV chronic infection was explained by polyclonal B cell activation that occurs since acute infection [7,62]. HIV-infected individuals, especially those with detectable plasma viremia, may suffer a shift in B cell differentiation towards terminally differentiated plasma cells [7]. Plasmacytosis was commonly reported in the bone marrow from HIV-infected patients and plasmablasts accounted for 5% of B cells in the periphery [27,58,63-64]. Moreover, viremic patients had increased frequency of CD21-

B cells, which have increased ability to secrete immunoglobulins, lower somatic hypermutation and proliferation capacity and similar micrograph features to plasma cells [27,65-66]. In the same way, we did not find a correlation between immunoglobulin levels and memory B cells, similar to what was seen formerly [41], probably because classical memory B cells were not immunoglobulin source [11,65].

Both total CD19⁺ and total CD19⁺ CD20⁺ counts were not significant different between patients under cART with or without viremia and controls in our study and before [42] Differently, Ghosh and coworkers [11] reported that children with higher VL had decreased number of total CD20⁺ cells. In another study, cART-treated adults with one year of UVL showed higher absolute numbers of CD19⁺ B cells than cART-naive patients with ongoing HIV viremia and healthy individuals [18].

As expected, when we compared the immunity of the HIV-infected groups to controls, there were higher numbers of nonresponders for rubella, hepatitis B and diphtheria among patients, even after years on ART. In the same way, controls had higher GMTs of anti-HBs, anti-rubella and anti-tetanus than HIV-infected patients. In our study, the most frequent protective response was against tetanus (30/31, 96.8%), and the majority of the patients lacked immunity to hepatitis B (31/46, 67.4%), rubella (18/45, 40.0%) and diphtheria (13/32, 40.6%). Similar proportions were reported before [12].

As previously suggested, we showed that antibody levels for hepatitis B, diphtheria and tetanus were inversely correlated with the time since the last dose of the vaccine taken by patients with UVL [50,54]. Additionally, we demonstrated that anti-HBs titers correlated with the number of doses taken by the patients with viral control. Higher number of pertussis and hepatitis B vaccine doses was associated with higher titers and numbers of

responders, respectively [51,54]. Unfortunately, immunity to varicella, measles, rubella and tetanus waned within one year of vaccination or even less [23,48,67-68]. While on cART, children with HIV-1 infection also showed vaccine failure on boosting, which resulted in seroconversion for some children: 89% (8/9) for mumps, 88% (7/8) for tetanus, 80% (4/5) for rubella, 60% (6/10) for measles, 29% (44/154) for hepatitis B [8, 50,69]. After three years from revaccination with three doses of hepatitis B and MMR vaccines, both the number of responders and GMTs for rubella and hepatitis B decreased over time [68,70]. Since primary HIV infection, memory B cells were prone to apoptosis [7]. In chronic infection, HIV-1-associated B cell exhaustion also might contribute to weak and waning immunity to recall antigens in HIV-infected children under cART [27,44].

In our study, we detected an inverse correlation of the age at the start of successful cART with memory B cells from patients with UVL. Furthermore, memory B cells and anti-HBs titers from viremic patients showed a negative correlation with the age at the beginning of ART. On the other hand, antibody titers for all vaccines showed no correlation with the time since the start of the successful cART in patients with sustained suppression of viral replication, what was seen before for hepatitis B response [55]. Starting cART before one year of age was shown to restore memory B cell percentage and antibody titers to tetanus and measles to similar values to uninfected children [24]. Also, children under a longer duration of a cART regimen before vaccination had increased GMC to pneumococcal serotypes [21]. In adults, reduced humoral memory for vaccine-preventable antigens was reported since primary HIV infection, and early ART was not able to completely restore these responses, although early treated patients showed greater frequency of influenza-specific antibody-secreting cells [9, 20]. In this regard, early

treatment may have a role towards normal development and preservation of B cell compartment number and function in HIV-vertically infected children. Possibly, cART improved effective B cell responses and functions by restoring B cell subpopulations and by providing the appropriate signals for the interaction between B and T lymphocytes [7, 17, 66].

In 2012, Miller and Rathore [25] revised vaccination schedules for HIV-infected children and commented on factors which interfere with safety and protection. The higher frequency of protective responses, in general, was seen in patients on stable cART, with normal CD4 counts and suppressed viremia. Yet, the heterogeneity in vaccine response and the loss of protective immunity even on cART suggests that HIV-infected children may not be uniformly protected [25]. Loss of specific antibodies determines an increased risk for preventable infections. Therefore, our results indicate that a periodically test for specific antibody levels for hepatitis B, rubella and diphtheria and additional booster vaccinations to maintain adequate humoral immunity are required in HIV-1 vertically-infected children, even after years on cART and suppressed viremia.

References

1. Jaspan HB, Lawn SD, Safrit JT, Bekker LG. The maturing immune system: implications for development and testing HIV-1 vaccines for children and adolescents. *AIDS* 2006 Feb 28;20(4):483-94.
2. Pieper K, Grimbacher B, Eibel H. B-cell biology and development. *J Allergy Clin Immunol.* 2013 Apr;131(4):959-71.
3. De Milito A, Mörch C, Sönnernborg A, Chiodi F. Loss of memory (CD27) B lymphocytes in HIV-1 infection. *AIDS.* 2001 May 25;15(8):957-64.

4. Malaspina A, Moir S, Kottlilil S, Hallahan CW, Ehler LA, Liu S, Planta MA, Chun TW, Fauci AS. Deleterious effect of HIV-1 plasma viremia on B cell costimulatory function. *J Immunol.* 2003 Jun 15;170(12):5965-72.
5. De Milito A. B lymphocyte dysfunctions in HIV infection. *Curr HIV Res.* 2004 Jan;2(1):11-21.
6. Resino S, Gallán I, Pérez A, León JA, Seoane E, Gurbindo D, Munõz-Fernandez MA. HIV-infected children with moderate/severe immune-suppression: changes in the immune system after highly active antiretroviral therapy.
7. Titanji K, Chiodi F, Bellocco R, Schepis D, Osorio L, Tassandin C, Tambussi G, Grutzmeier S, Lopalco L, De Milito A. Primary HIV-1 infection sets the stage for important B lymphocyte dysfunctions. *AIDS.* 2005 Nov 18;19(17):1947-55.
8. Bekker V, Scherpbier H, Pajkrt D, Jurriaans S, Zaaijer H, Kuijpers TW. Persistent humoral immune defect in highly active antiretroviral therapy-treated children with HIV-1 infection: loss of specific antibodies against attenuated vaccine strains and natural viral infection. *Pediatrics.* 2006 Aug;118(2):e315-22.
9. Titanji K, De Milito A, Cagigi A, Thorstensson R, Grützmeier S, Atlas A, Hejdeman B, Kroon FP, Lopalco L, Nilsson A, Chiodi F. Loss of memory B cells impairs maintenance of long-term serologic memory during HIV-1 infection. *Blood.* 2006 Sep 1;108(5):1580-7.
10. Zaccarelli-Filho CA, Ono E, Machado DM, Brunialti M, Succi RC, Salomão R, Kallás EG, de Moraes-Pinto MI. HIV-1-infected children on HAART: immunologic features of three different levels of viral suppression. *Cytometry B Clin Cytom.* 2007 Jan 15;72(1):14-21.

11. Ghosh S, Feyen O, Jebran AF, Huck K, Jetzek-Zader M, Bas M, Niehues T. Memory B cell function in HIV-infected children-decreased memory B cells despite ART. *Pediatr Res.* 2009 Aug;66(2):185-90.
12. Myers C, Posfay-Barbe KM, Aebi C, Cheseaux JJ, Kind C, Rudin C, Nadal D, Siegrist CA; Pediatric Infectious Disease Group of Switzerland (PIGS); Swiss Mother and Child HIV Cohort Study (MoCHIV). Determinants of vaccine immunity in the cohort of human immunodeficiency virus-infected children living in Switzerland. *Pediatr Infect Dis J.* 2009 Nov;28(11):996-1001.
13. Shen X, Tomaras GD. Alterations of the B-cell response by HIV-1 replication. *Curr HIV/AIDS Rep.* 2011 Mar;8(1):23-30.
14. Cotugno N, Douagi I, Rossi P, Palma P. Suboptimal immune reconstitution in vertically HIV infected children: a view on how HIV replication and timing of HAART initiation can impact on T and B-cell compartment. *Clin Dev Immunol.* 2012;2012:805151.
15. Resino S, Bellon JM, Resino R, Navarro ML, Tomás Ramos J, de José MI, Mellado MJ, Muñoz-Fernández MA. Extensive implementation of highly active antiretroviral therapy shows great effect on survival and surrogate markers in vertically HIV-infected children. *Clin Infect Dis.* 2004 Jun 1;38(11):1605-12. Epub 2004 May 5.
16. Funk MB, Buchholz B, Notheis G, et al. Disease progression in HIV-1 infected children and adolescents - results of a German-Austrian cohort study. *Eur J Med Res* 2008; 18;13(8):371-8.
17. Moir S, Malaspina A, Ho J, Wang W, Dipoto AC, O'Shea MA, Roby G, Mican JM, Kottlilil S, Chun TW, Proschan MA, Fauci AS. Normalization of B cell counts and

- subpopulations after antiretroviral therapy in chronic HIV disease. *J Infect Dis.* 2008 Feb 15;197(4):572-9.
18. Fogli M, Torti C, Malacarne F, Fiorentini S, Albani M, Izzo I, Giagulli C, Maggi F, Carosi G, Caruso A. Emergence of exhausted B cells in asymptomatic HIV-1-infected patients naïve for HAART is related to reduced immune surveillance. *Clin Dev Immunol.* 2012;2012:829584.
19. D'Orsogna LJ, Krueger RG, McKinnon EJ, French MA. Circulating memory B-cell subpopulations are affected differently by HIV infection and antiretroviral therapy. *AIDS.* 2007 Aug 20;21(13):1747-52.
20. Moir S, Buckner CM, Ho J, Wang W, Chen J, Waldner AJ, Posada JG, Kardava L, O'Shea MA, Kottlil S, Chun TW, Proschan MA, Fauci AS. B cells in early and chronic HIV infection: evidence for preservation of immune function associated with early initiation of antiretroviral therapy. *Blood.* 2010 Dec 16;116(25):5571-9.
21. Abzug MJ, Pelton SI, Song LY, Fenton T, Levin MJ, Nachman SA, Borkowsky W, Rosenblatt HM, Marcinak JF, Dieudonne A, Abrams EJ, Pathak I; Pediatric AIDS Clinical Trials Group P1024 Protocol Team. Immunogenicity, safety, and predictors of response after a pneumococcal conjugate and pneumococcal polysaccharide vaccine series in human immunodeficiency virus-infected children receiving highly active antiretroviral therapy. *Pediatr Infect Dis J.* 2006 Oct;25(10):920-9.
22. Bailey CL, Smith V, Sands M. Hepatitis B vaccine: a seven-year study of adherence to the immunization guidelines and efficacy in HIV-1-positive adults. *Int J Infect Dis.* 2008 Nov;12(6):e77-83.

23. Rigaud M, Borkowsky W, Muresan P, et al. Impaired immunity to recall antigens and neoantigens in severely immunocompromised children and adolescents during the first year of effective highly active antiretroviral therapy. *J Infect Dis* 2008; Oct 15;198(8):1123-30.
24. Pensieroso S, Cagigi A, Palma P, Nilsson A, Capponi C, Freda E, Bernardi S, Thorstensson R, Chiodi F, Rossi P. Timing of HAART defines the integrity of memory B cells and the longevity of humoral responses in HIV-1 vertically-infected children. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009 May 12;106(19):7939-44.
25. Miller MA, Rathore MH. Immunization in special populations. *Adv Pediatr*. 2012;59(1):95-136.
26. Alsina L, Noguera-Julian A, Fortuny C. Impaired cellular immune response to tetanus toxoid but not to cytomegalovirus in effectively HAART-treated HIV-infected children. *Vaccine* 2013 May 7;31(20):2417-9.
27. Moir S, Ho J, Malaspina A, Wang W, DiPoto AC, O'Shea MA, Roby G, Kottlilil S, Arthos J, Proschan MA, Chun TW, Fauci AS. Evidence for HIV-associated B cell exhaustion in a dysfunctional memory B cell compartment in HIV-infected viremic individuals. *J Exp Med*. 2008 Aug 4;205(8):1797-805.
28. Cagigi A, Palma P, Nilsson A, Di Cesare S, Pensieroso S, Kakoulidou M, Bernardi S, Rossi P, Chiodi F. The impact of active HIV-1 replication on the physiological age-related decline of immature-transitional B-cells in HIV-1 infected children. *AIDS*. 2010 Aug 24;24(13):2075-80.
29. Bunupuradah T, Puthanakit T, Kosalaraksa P, Kerr S, Boonrak P, Prasitsuebsai W, Lumbiganon P, Mengthaisong T, Phasomsap C, Pancharoen C, Ruxrungtham K,

- Ananworanich J. Immunologic and virologic failure after first-line NNRTI-based antiretroviral therapy in Thai HIV-infected children. *AIDS Res Ther.* 2011 Oct 26;8:40.
30. Hendriksen CF, van der Gun JW, Kreeftenberg JG. Combined estimation of tetanus and diphtheria antitoxin in human sera by the in vitro Toxin-Binding Inhibition (ToBI) test. *J Biol Stand.* 1989 Apr;17(2):191-200.
31. Marcovitz R, Matos DC, Georgini RA, Sakauchi D. Potency control of diphtheria component in adsorbed vaccines by in vitro neutralization tests. *Biologicals.* 2002 Jun;30(2):105-12.
32. Souza Matos DC, Marcovitz R, Cabello PH, Georgini RA, Sakauchi D, da Silva LL. Immunogenicity test of tetanus component in adsorbed vaccines by toxin binding inhibition test. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2002 Sep;97(6):909-13.
33. Sonobe MH, Trezena AG, Guilhen FB, Takano VL, Fratelli F, Sakauchi D, Morais JF, Prado SM, Higashi HG. Determination of low tetanus or diphtheria antitoxin titers in sera by a toxin neutralization assay and a modified toxin-binding inhibition test. *Braz J Med Biol Res.* 2007 Jan;40(1):69-76.
34. 2006a World Health Organization. Tetanus vaccine: WHO position paper. *Wkly Epidemiol Rec* 2006 May;81(20):198-208.
35. 2006b World Health Organization. Diphtheria vaccine: WHO position paper. *Wkly Epidemiol Rec* 2006 Jan;81(3):24-32.
36. World Health Organization. Hepatitis B vaccines: WHO position paper. *Wkly Epidemiol Rec* 2009 Oct;84(40):405-419.

37. World Health Organization. Rubella vaccines: WHO position paper. *Wkly Epidemiol Rec* 2011 Jul;86(29):301-316.
38. Centers for Disease Control and Prevention 1994 Revised Classification System for Human Immunodeficiency Virus Infection in Children Less Than 13 Years of Age. *MMWR* 1994;43(12):1-10.
39. Agematsu K, Hokibara S, Nagumo H, Komiyama A. CD27: a memory B-cell marker. *Immunol Today*. 2000 May;21(5):204-6.
40. Mehta N, Cunningham CK, Flynn P, Pepe J, Obaro S, Kapogiannis BG, Bethel J, Luzuriaga K; Adolescent Trials Network for HIV/AIDS Interventions. Impaired generation of hepatitis B virus-specific memory B cells in HIV infected individuals following vaccination. *Vaccine*. 2010 May 7;28(21):3672-8.
41. Chong Y, Ikematsu H, Kikuchi K, Yamamoto M, Murata M, Nishimura M, Nabeshima S, Kashiwagi S, Hayashi J. Selective CD27+ (memory) B cell reduction and characteristic B cell alteration in drug-naïve and HAART-treated HIV type 1-infected patients. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2004 Feb;20(2):219-26.
42. Jacobsen MC, Thiébaud R, Fisher C, Sefe D, Clapson M, Klein N, Baxendale HE. Pediatric human immunodeficiency virus infection and circulating IgD+ memory B cells. *J Infect Dis*. 2008 Aug 15;198(4):481-5
43. Bernasconi NL, Traggiai E, Lanzavecchia A. Maintenance of serological memory by polyclonal activation of human memory B cells. *Science*. 2002 Dec 13;298(5601):2199-202.
44. Pallikkuth S, Pilakka Kanthikeel S, Silva SY, Fischl M, Pahwa R, Pahwa S. Upregulation of IL-21 receptor on B cells and IL-21 secretion distinguishes novel

- 2009 H1N1 vaccine responders from nonresponders among HIV-infected persons on combination antiretroviral therapy. *J Immunol*. 2011 Jun 1;186(11):6173-81.
45. Rosenblatt HM, Song LY, Nachman SA, Stanley KE, Krogstad PA, Johnson GM, Wiznia AA; Pediatric Aids Clinical Trials Group 377 Study Team. Tetanus immunity after diphtheria, tetanus toxoids, and acellular pertussis vaccination in children with clinically stable HIV infection. *J Allergy Clin Immunol*. 2005 Sep;116(3):698-703.
46. Farquhar C, Wamalwa D, Selig S, John-Stewart G, Mabuka J, Majiwa M, Sutton W, Haigwood N, Wariua G, Lohman-Payne B. Immune responses to measles and tetanus vaccines among Kenyan human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-infected children pre- and post-highly active antiretroviral therapy and revaccination. *Pediatr Infect Dis J*. 2009 Apr;28(4):295-9.
47. Lima M, De Menezes Succi RC, Nunes Dos Santos AM, Weckx LY, De Moraes-Pinto MI. Rubella immunization in human immunodeficiency virus type 1-infected children: cause for concern in vaccination strategies. *Pediatr Infect Dis J*. 2004 Jul;23(7):604-7.
48. Levin MJ, Gershon AA, Weinberg A, Song LY, Fentin T, Nowak B; Pediatric AIDS Clinical Trials Group 265 Team. Administration of live varicella vaccine to HIV-infected children with current or past significant depression of CD4+ T cells. *J Infect Dis*. 2006 Jul 15;194(2):247-55.
49. Lao-araya M, Puthanakit T, Aурpibul L, Sirisanthana T, Sirisanthana V. Antibody response to hepatitis B re-vaccination in HIV-infected children with immune

- recovery on highly active antiretroviral therapy. *Vaccine*. 2007 Jul 20;25(29):5324-9.
50. Abzug MJ, Warshaw M, Rosenblatt HM, Levin MJ, Nachman SA, Pelton SI, Borkowsky W, Fenton T; International Maternal Pediatric Adolescent AIDS Clinical Trials Group P1024 and P1061s Protocol Teams. Immunogenicity and immunologic memory after hepatitis B virus booster vaccination in HIV-infected children receiving highly active antiretroviral therapy. *J Infect Dis*. 2009 Sep 15;200(6):935-46.
51. Mena G, Llupià A, García-Basteiro AL, Díez C, León A, García F, Bayas JM. Assessing the immunological response to hepatitis B vaccination in HIV-infected patients in clinical practice. *Vaccine*. 2012 May 21;30(24):3703-9.
52. Potsch DV, Camacho LA, Tuboi S, Villar LM, Miguel JC, Ginuño C, Silva EF, Mendonça RM, Moreira RB, Barroso PF. Vaccination against hepatitis B with 4-double doses increases response rates and antibodies titers in HIV-infected adults. *Vaccine*. 2012 Sep 7;30(41):5973-7.
53. Mutwa PR, Boer KR, Rusine JB, Muganga N, Tuyishimire D, Reiss P, Lange JM, Geelen SP. Hepatitis B virus prevalence and vaccine response in HIV-infected children and adolescents on combination antiretroviral therapy in Kigali, Rwanda. *Pediatr Infect Dis J*. 2013 Mar;32(3):246-51.
54. Tejiokem MC, Gouandjika I, Béniguel L, Zanga MC, Tene G, Gody JC, Njamkepo E, Kfutwah A, Penda I, Bilong C, Rousset D, Pouillot R, Tangy F, Baril L. HIV-infected children living in Central Africa have low persistence of antibodies to

- vaccines used in the Expanded Program on Immunization. *PLoS One*. 2007 Dec 5;2(12):e1260.
55. Pippi F, Bracciale L, Stolzuoli L, Giaccherini R, Montomoli E, Gentile C, Filetti S, De Luca A, Cellesi C. Serological response to hepatitis B virus vaccine in HIV-infected children in Tanzania. *HIV Med*. 2008 Aug;9(7):519-25.
56. Pessoa SD, Miyamoto M, Ono E, Gouvêa AF, de Moraes-Pinto MI, Succi RC. Persistence of vaccine immunity against hepatitis B virus and response to revaccination in vertically HIV-infected adolescents on HAART. *Vaccine*. 2010 Feb 10;28(6):1606-12.
57. Qiao X, He B, Chiu A, Knowles DM, Chadburn A, Cerutti A. Human immunodeficiency virus 1 Nef suppresses CD40-dependent immunoglobulin class switching in bystander B cells. *Nat Immunol*. 2006 Mar;7(3):302-10.
58. Doria-Rose NA, Connors M. Antibody-secreting B cells in HIV infection. *Curr Opin HIV AIDS*. 2009 Sep;4(5):426-30.
59. Jelicic K, Cimbro R, Nawaz F, Huang DW, Zheng X, Yang J, Lempicki RA, Pascuccio M, Van Ryk D, Schwing C, Hiatt J, Okwara N, Wei D, Roby G, David A, Hwang IY, Kehrl JH, Arthos J, Cicala C, Fauci AS. The HIV-1 envelope protein gp120 impairs B cell proliferation by inducing TGF- β 1 production and FcRL4 expression. *Nat Immunol*. 2013 Oct 27.
60. Ruffin N, Thang PH, Rethi B, Nilsson A, Chiodi F. The impact of inflammation and immune activation on B cell differentiation during HIV-1 infection. *Front Immunol*. 2012 Jan 5;2:90.

61. Da Silva MTN, Centeville M, Tani SM, Toro AADC, Rossi C, Vilela MMS. Serum immunoglobulins in children perinatally exposed to human immunodeficiency virus. *J Pediatr (Rio J)*. 2001; 77(3): 209-18.
62. Levesque MC, Moody MA, Hwang KK, Marshall DJ, Whitesides JF, Amos JD, Gurley TC, Allgood S, Haynes BB, Vandergrift NA, Plonk S, Parker DC, Cohen MS, Tomaras GD, Goepfert PA, Shaw GM, Schmitz JE, Eron JJ, Shaheen NJ, Hicks CB, Liao HX, Markowitz M, Kelsoe G, Margolis DM, Haynes BF. Polyclonal B cell differentiation and loss of gastrointestinal tract germinal centers in the earliest stages of HIV-1 infection. *PLoS Med*. 2009 Jul 7;6(7):e1000107.
63. Nagase H, Agematsu K, Kitano K, Takamoto M, Okubo Y, Komiyama A, Sugane K. Mechanism of hypergammaglobulinemia by HIV infection: circulating memory B-cell reduction with plasmacytosis. *Clin Immunol*. 2001 Aug;100(2):250-9.
64. Morais JC, Machado M, Biasoli I, Barroso PF, Milito C, Spector N. Changing patterns of AIDS: impact on the indications and diagnostic yield of bone marrow biopsies. *Braz J Infect Dis*. 2010 Jul-Aug;14(4):419-21.
65. Moir S, Malaspina A, Ogwaro KM, Donoghue ET, Hallahan CW, Ehler LA, Liu S, Adelsberger J, Lapointe R, Hwu P, Baseler M, Orenstein JM, Chun TW, Mican JA, Fauci AS. HIV-1 induces phenotypic and functional perturbations of B cells in chronically infected individuals. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Aug 28;98(18):10362-7.
66. Sciaranghella G, Tong N, Mahan AE, Suscovich TJ, Alter G. Decoupling activation and exhaustion of B cells in spontaneous controllers of HIV infection. *AIDS*. 2013 Jan 14;27(2):175-80.

67. Melvin AJ, Mohan KM. Response to immunization with measles, tetanus, and Haemophilus influenzae type b vaccines in children who have human immunodeficiency virus type 1 infection and are treated with highly active antiretroviral therapy. *Pediatrics*. 2003 Jun;111(6 Pt 1):e641-4.
68. Aурpibul L, Puthanakit T, Sirisanthana T, Sirisanthana V. Persistence of measles, mumps, and rubella protective antibodies 3 years after revaccination in HIV-infected children receiving antiretroviral therapy. *Clin Infect Dis*. 2010 May 15;50(10):1415-8.
69. Ching N, Deville JG, Nielsen KA, Ank B, Wei LS, Sim MS, Wolinsky SM, Bryson YJ. Cellular and humoral immune responses to a tetanus toxoid booster in perinatally HIV-1-infected children and adolescents receiving highly active antiretroviral therapy (HAART). *Eur J Pediatr*. 2007 Jan;166(1):51-6.
70. Lao-araya M, Puthanakit T, Aурpibul L, Taecharoenkul S, Sirisanthana T, Sirisanthana V. Prevalence of protective level of hepatitis B antibody 3 years after revaccination in HIV-infected children on antiretroviral therapy. *Vaccine*. 2011 May 23;29(23):3977-81.

Table 1: Clinical and laboratory characteristics of HIV-1 infected, pediatric patients with undetectable viral load (UVL) or VL >1,000 RNA copies/mL.

	UVL	VL > 1,000 copies/mL
N	34	17
Gender		
Male	18	11
Female	16	6
Age in years		
Median (minimum - maximum)	13.2 (5.8 - 20.5)	12.0 (1.6 - 20.8)
≤ 2	0	2
2 - 5	0	1
5 - 10	7	5
10 - 21	27	9
Clinical CDC Classification		
N	2	2
A	1	0
B	22	9
C	9	6
Immunological CDC Classification		
1	6	1
2	16	5
3	12	11
Age at the beginning of ART (years)	2.4 (0.1 - 16.7)	1.77 (0.3 - 11.4)
Age at the beginning of successful cART (years)	8.6 (0.1 - 16.7)	NA
Total time of controlled viremia (years)	4.2 (1.7 - 11.5)	NA
Median nadir CD4 (minimum - maximum)	388 (20 - 1,291)	360 (27 - 1,377)
ART		
2 NRTI + 1 PI	13	8
2 NRTI + 1 NNRTI	12	6
2 NRTI + 2 PI	3	0
2 NRTI + 1 NNRTI + 1 PI	3	0
3 NRTI + 1 NNRTI + 1 PI	0	1
2 NRTI + 1 PI + RAL	1	0
1 NRTI + 2 PI + RAL	1	0
2 NRTI + 2 PI + RAL	0	1
2 NRTI + 1 NNRTI + 1 PI + RAL	1	0
Only 3TC	0	1

CDC: Centers for Disease Control and Prevention; NA: not applicable; NRTI: Nucleoside/Nucleotide Reverse Transcriptase Inhibitors; NNRTI: Non-Nucleoside Nucleotide Reverse Transcriptase Inhibitors; PI: Protease Inhibitor; RAL: raltegravir; 3TC: lamivudine.

Table 2: Median (minimum and maximum) of peripheral blood counts, T lymphocyte immunophenotyping and HIV-1 viral load (VL) from HIV-1 infected, pediatric patients with undetectable VL (UVL) or VL >1,000 RNA copies/mL and controls.

Parameter	UVL	VL > 1,000 copies/mL	Control	P value
Leukocytes (10⁹ cells/L)	5.96 (3.83 - 10.92)	5.72 (2.22 – 19.75)	6.49 (3.62 - 8.56)	0.579
Lymphocytes (10⁹ cells/L)	2.39 (1.14 – 5.83)	2.49 (1.00 – 13.88)	2.14 (1.2 - 3.96)	0.358
Monocytes (10⁹ cells/L)	0.50 (0.21 – 1.16)	0.55 (0.33 – 2.62)	0.41 (0.19 - 0.74)	0.01
Neutrophils (10⁹ cells/L)	2.73 (1.28 – 7.87)	2.46 (0.82 – 7.35)	3.59 (1.36 - 5.12)	0.064
Eosinophils (10⁹ cells/L)	0.02 (0.02 - 0.77)	0.20 (0 – 2.39)	0.17 (0.03 - 0.81)	0.444
Basophils (10⁹ cells/L)	0.02 (0 – 0.07)	0.01 (0 – 0.11)	0.02 (0 - 0.06)	0.107
Erythrocytes (10¹² cells/L)	3.98 (2.90 – 4.97)	4.29 (3.46 – 5.26)	4.75 (3.88 - 5.34)	< 0.001
Hemoglobin (g/dL)	13.2 (11.3 – 16.7)	13.2 (9.00 – 16.1)	13.4 (12.1 - 16.3)	0.551
Hematocrit (%)	38.1 (32.1 – 45.8)	38.0 (29.5 - 46.8)	39.8 (35.9 - 47.0)	0.073
Platelets (10⁹ cells/L)	269 (118 - 451)	249 (86 - 420)	276 (141 - 405)	0.521
CD3⁺ (10⁶ cells/L)	1,990 (887 - 5,357)	1,745 (771 - 8,590)	1,410 (731 - 2,941)	0.001
CD3⁺ CD4⁺ (10⁶ cells/L)	829 (392 – 2,514)	530 (93 - 2,161)	805 (413 - 1,261)	0.047
CD3⁺ CD8⁺ (10⁶ cells/L)	851 (359 – 2,909)	1,286 (474 – 6,216)	514 (223 - 1,451)	< 0.001
CD4/CD8 ratio	0.86 (0.44 - 2.36)	0.49 (0.15 - 1.72)	1.57 (0.86 - 2.40)	< 0.001
HIV-1 VL (RNA copies/mL)	< 50	4,195 (1,215 – 71,089)	NA	NA
Log HIV-1 VL (RNA copies/mL)	NA	3.62 (3.09 - 4.85)	NA	NA

P values were performed with Kruskal-Wallis test; N/A: non-applicable.

Table 3: Median (minimum and maximum) of B lymphocyte immunophenotyping and immunoglobulins from HIV-1 infected, pediatric patients with undetectable VL (UVL) or VL >1,000 RNA copies/mL and controls.

Parameter	UVL	VL > 1,000 copies/mL	Control	P value
CD19 ⁺ (10 ⁶ cells/L)	308.7(58.1 - 775.6)	249.8 (118.9 - 2,665.0)	296.9 (104.4 - 693.0)	0.977
CD19 ⁺ CD20 ⁺ (10 ⁶ cells/L)	293.3 (51.3 - 746.3)	231.8 (112.8 - 2609.4)	282.2 (102.0 - 644.0)	0.989
CD19 ⁺ CD27 ⁺ (10 ⁶ cells/L)	55.1 (12.7 - 268.2)	67.0 (20.0 - 624.6)	71.0 (36.6 - 195.8)	0.308
CD19 ⁺ CD20 ⁺ CD27 ⁺ (10 ⁶ cells/L)	52.7 (10.4 - 254.5)	59.5 (10.9 - 600.2)	67.9 (31.6 - 177.7)	0.350
CD27 ⁺ in total CD19 ⁺ (%)	21.8 (8.5 - 44.1)	25.0 (9.3 - 41.7)	24.8 (16.3 - 39.2)	0.160
CD27 ⁺ in total CD19 ⁺ CD20 ⁺ (%)	20.2 (7.7 - 40.0)	19.0 (7.3 - 41.1)	23.0 (15.7 - 42.5)	0.077
Serum IgA (mg/dL)	219 (92 - 608)	234 (93 - 513)	127 (73 - 307)	0.007
Serum IgM (mg/dL)	87 (50 - 207)	164 (38 - 739)	114 (66 - 233)	0.011
Serum IgG (mg/dL)	1,285 (809 - 1,820)	1,670 (939 - 2,390)	1,250 (770 - 1,700)	0.011
Serum IgE (IU/mL)	134 (6 - 2,190)	221 (4 - 2,850)	173 (6 - 2,130)	0.365

Ig: Immunoglobulin. P values were performed with Kruskal-Wallis test.

Table 4: Number of responders for hepatitis B, rubella, tetanus and diphtheria vaccines from HIV-1 infected, pediatric patients with undetectable viral load (UVL) or VL >1,000 RNA copies/mL and controls.

	Number of responders / total		
	UVL	VL > 1,000 copies/mL	Control
Hepatitis B	13/32	2/14	21/25
Rubella	21/31	6/14	25/25
Tetanus	23/23	7/8	9/9
Diphtheria	14/24	5/8	9/9

Table 5: Median (minimum and maximum) of Geometric Mean Titers for hepatitis B, rubella, tetanus and diphtheria from HIV-1 infected, pediatric patients with undetectable viral load (UVL) or VL >1,000 RNA copies/mL and controls.

	Geometric Mean Titers			P value	P value UVL x VL > 1,000	P value UVL x Control	P value VL > 1,000 x Control
	UVL	VL > 1,000 copies/mL	Control				
Anti-HBs (mIU/mL)	21.29 (10.32 - 43.88)	3.92 (1.39 - 11.10)	87.20 (41.87 - 181.59)	< 0.001 †	0.018 ‡	0.018 ‡	< 0.001 ‡
Anti-rubella (IU/mL)	24.31 (13.44 - 43.95)	6.78 (3.32 - 13.86)	41.86 (30.86 - 56.78)	0.002 *	< 0.05 #	> 0.05 #	< 0.05 #
Anti-tetanus (IU/mL)	0.44 (0.25 - 0.79)	0.23 (0.05 - 1.12)	2.37 (0.75 - 7.44)	0.006 †	0.550 ‡	0.018 ‡	0.008 ‡
Anti-diphtheria (IU/mL)	0.18 (0.10 - 0.32)	0.21 (0.05 - 0.85)	0.40 (0.19 - 0.85)	0.314 †	-	-	-

Anti-HBs: antibody anti-hepatitis B virus surface antigen.

† One way ANOVA.

‡ Tukey's test.

* Kruskal-Wallis test.

Nonparametric Multiple Comparison test.

Capítulo II

Does persistent plasma viremia modify cellular immune response to Human Immunodeficiency Virus in vertically infected pediatric patients?

Taís N. MAZZOLA ¹, Jéssica S. BERNACHI ¹, Emanuel B.V. ANJOS ², Ana Leda F. LONGHINI ³, Renata M.B.P. LEMOS ⁴, Josiane F. FERREIRA ¹, Sara T.O. SAAD ³, Irene G.H. LORAND-METZE ³, Sandra C.B. COSTA ², Marcos T.N. da SILVA ⁵, Maria Marluce S. VILELA ^{1*}

¹ Laboratory of Immunology, Center for Investigation in Pediatrics (CIPED), Faculty of Medical Sciences, University of Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brazil

² Laboratory for the Diagnosis of Infectious Diseases by Molecular Biology Techniques and Antigenemia, Faculty of Medical Sciences, University of Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brazil

³ Hematology and Hemotherapy Center (HEMOCENTRO), University of Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brazil

⁴ Pediatrics Immunodeficiency Out-Patients Unit, Clinical Hospital, University of Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brazil

⁵ Laboratory of Translational Research in Child and Adolescent Health, Center for Investigation in Pediatrics (CIPED), Faculty of Medical Sciences, University of Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brazil

Classification: Research article

*** Corresponding author for published article:**

Center for Investigation in Pediatrics (CIPED), Faculty of Medical Sciences, University of Campinas (UNICAMP).

Address: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126, Cidade Universitária, Barão Geraldo, Campinas, SP, Brazil. CEP: 13083-887

E-mail: marluce@fcm.unicamp.br

Journal: PLOS one

Classification: Research article

Abstract

Objective: To evaluate HIV-1 cell-mediated immune response in 35 infected children and adolescents under prolonged combination antiretroviral therapy (cART), with or without HIV-1 plasma viremia. **Design:** Cross-sectional study. **Methods:** Twenty-one HIV-1-infected patients with undetectable viral load (UVL, below 50 RNA copies/mL) and 14 viremic patients (VL >1,000 RNA copies/mL) participated in this study. HIV-1-specific lymphoproliferation was assessed by flow cytometry. IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IFN- α , IFN- γ and TNF- α concentration in culture supernatants were evaluated by Cytometric Bead Array and TGF- β 1 by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. Nonparametric tests were used ($p < 0.05$). **Results:** Viremic patients showed lower HIV-specific lymphocyte proliferation and IL-2 and IFN- α production in comparison to patients with UVL, whose HIV-specific lymphoproliferation, IFN- γ and IL-2 concentration were correlated. IFN- γ concentration but not HIV-specific lymphoproliferation was inversely correlated with HIV-1 plasma VL in cultures from viremic patients. Greater time since the start of successful cART in patients with UVL was associated with higher proliferation, IFN- γ and IL-2 production in cultures with HIV. Moreover, among patients with VL >1,000 copies/mL, the ones who started ART after one year of age showed even lower HIV-specific proliferation. **Conclusions:** The control of HIV-1 viremia and the early therapy administration may benefit the development and maintenance of HIV-specific proliferation and IL-2, IFN- γ and IFN- α -producing cells from HIV-1 infected pediatric patients.

Keywords: HIV; Cellular immunity; Child; Adolescent; Cytokines.

Introduction

Combination antiretroviral therapy (cART) improved the prognosis of HIV-1-infected patients [1-3], but age, T CD4⁺ (CD4) counts and HIV-1 plasma viral load (VL) at the introduction of therapy modify responses to cART [4-6]. In children under ART, immune reconstitution is different from that in adults, involving mainly naïve cells, due probably to more efficient thymopoiesis [3,7,8].

HIV infection impairs lymphoproliferation and cytokine production to mitogens and antigens such as pokeweed mitogen, phytohemagglutinin (PHA), tetanus toxoid and streptokinase; and cART-induced immune recovery varies differently for each stimulus [9-11].

Since birth, HIV-infected infants have HIV-specific T cell activity, although older children show higher frequencies and magnitude of responses [12]. Both CD4 and T CD8⁺ (CD8) cells have been associated with the control of HIV replication. In cART-treated chronic HIV-infected patients, HIV-specific CD8 responses tend to decline, and CD4 responses are infrequently shown or recover slowly [3,13,14].

In most adult patients, cART results in a decrease in plasma VL to below the detection limit of the assays, which is harder to achieve in pediatric populations [4,5,15]. Probably, bitter taste, poor adherence, restricted options of drugs, inadequate drug levels due to pharmacokinetic interactions or suboptimal intake, and drug-resistant viruses may cause virologic failure in children and adolescents, and their impact in HIV-specific responses is not clear [16,17].

At the time of HIV vertical transmission, the immune system is under development and maturation [18]. Moreover, the recent guideline of World Health Organization (WHO)

suggested the early treatment for HIV-infected infants, which has been shown to have an impact on HIV-specific responses [14,19,20]. Therefore, a better knowledge of the HIV-specific cellular response ontogeny in pediatric patients and the impact of cART on mounting these immune responses is required. Thus, the aim of our study was to elucidate *in vitro* HIV cellular immune responses from HIV-1-infected children and adolescents under cART, comparing patients with undetectable VL to viremic patients (VL >1,000 HIV RNA copies/mL). Our results point to an important role of cART-induced viral control in the development of HIV-specific proliferation and cytokine production in vertical HIV infection.

Methods

Study participants

Thirty-five HIV-1 vertically infected children and adolescents were recruited at the Pediatrics Immunodeficiency Outpatients Unit at the University of Campinas Clinical Hospital (UNICAMP, Campinas, Brazil) and at the Infectious Diseases Outpatients Unit in the Center for Orientation and Serologic Support (COAS, Jundiaí, Brazil), from January 2012 to May 2013. Patients with genetic defects, recent diagnosis of tuberculosis, cytomegalovirus, mononucleosis and toxoplasmosis, or syphilis, hepatitis B or C coinfection were not included. Clinical data such as time since ART beginning and nadir CD4 were recovered from medical records.

Patients were separated into two groups according to HIV RNA VL:

- Undetectable VL (UVL, VL <50 RNA copies/mL) for at least one year before blood collection; and
- VL >1,000 RNA copies/mL at the date of blood collection and detectable VL in the previous six months.

The study protocol was approved by the UNICAMP Ethical Committee (protocol number 876/2010) and in accord with Helsinki Declaration. Written informed consent was obtained from each patient's parent or legal guardian.

Peripheral blood immunophenotyping, hemogram and HIV-1 RNA viral load

One mL of peripheral blood was collected with ethylene diaminetetracetic acid to perform a hemogram (XE 5000 blood cell counter, Sysmex Corporation, Japan) and CD45⁺, CD3⁺ (CD3), CD4 and CD8 immunophenotyping (BD FacsCalibur, San Jose, BD Biosciences, USA). The Versant 440 Molecular System for Branched-DNA (Siemens Healthcare Diagnostics inc., USA) was used to quantify plasma HIV-1 RNA, with the lower and upper limits of detection of 50 and 500,000 HIV-1 RNA copies/mL, respectively.

Antigens used in the cell culture assays

Aldrithiol-2-inactivated HIV-1 clade B (MN) was kindly donated by Dr. Jeffrey Lifson (Frederick National Laboratory for Cancer Research, USA) and used at an optimized concentration of 400ng/mL from p24 protein equivalent [21]. Equivalent amount of Microvesicles (Micro) was used as HIV negative control. PHA at 7.5µg/mL (Sigma, USA) was used as a positive control and medium alone was a negative control for PHA.

HIV-specific T cell proliferation

The proliferation assay was modified from the work of Gaines and colleagues [22]. Twenty mL of heparinized peripheral blood were collected for culture assays. Fresh peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated by density gradient centrifugation over Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare, Sweden), diluted to 1×10^6 cells/mL in RPMI 1640 medium (LGC Biotecnologia, Brazil) supplemented with 10% human AB serum (Sigma, USA) and $10 \mu\text{g/mL}$ gentamycin and stimulated for 6 days with HIV, Micro, PHA or medium alone at 37°C with $5\% \text{CO}_2$ in round-bottomed 96-well tissue culture plates (NUNC, Denmark). Samples were incubated with anti-human CD3-PerCP, CD4-FITC and CD8-APC monoclonal antibodies (BD Biosciences, USA) before acquisition of 50,000 events on CD3 gated cells (FACSCalibur flow cytometer, BD Biosciences, USA) and analysis (FACSDiva version 6.2, BD Biosciences, USA). Isotype controls were used to discriminate positive populations. Dead cells were excluded from all analyses. After gating on CD3 cells, forward and side light scatters were used to identify resting and blast lymphocytes, in which CD4 and CD8 subpopulations were analyzed. Proliferation was measured by percentage of CD3 blasts, in which Micro-stimulated proliferation was subtracted from HIV-stimulated cultures, and baseline proliferation was subtracted from PHA-stimulated cultures.

HIV-specific cytokine production

PBMC were diluted to 2×10^6 cells/mL in supplemented RPMI and incubated for an optimized period of 48 hours in round-bottomed tubes with HIV, Micro, PHA or medium alone at 37°C with $5\% \text{CO}_2$. Supernatants were stored at -80°C .

Interleukin-2 (IL-2), IL-4, IL-5, IL-10, tumor necrosis factor- α (TNF- α), interferon- γ (IFN- γ) and IFN- α levels were determined by Cytometric Bead Array (CBA, BD Biosciences, USA) according to the manufacturer's protocol, and analyzed with FCAP Array Software (version 3.0.1., BD Biosciences, USA). The limits of detection were 2.6pg/mL for IL-2 and IL-4, 2.4pg/mL for IL-5, 2.8pg/mL for IL-10 and TNF- α , 7.1pg/mL for IFN- γ , and 1.5pg/mL for IFN- α . Samples below these values were scored as the inferior limit minus 0.1pg/mL.

Transforming growth factor-beta1 (TGF- β 1) concentration was determined by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), according to the manufacturer's protocol (Duo Set, R&D Systems, USA). The limit of detection was 31.2pg/mL.

Statistical considerations

The analyses were performed with SPSS[®] for Windows (version 17.0.0, USA), using Kruskal-Wallis, Mann-Whitney, Wilcoxon, Nonparametric Multiple Comparison and Spearman tests ($p < 0.05$). All reported p values are two-tailed. GraphPad Prism (release 5.0, GraphPad Software, USA) was employed to perform the figures.

Results

Study participants

Table 1 shows clinical and laboratorial characteristics from the 21 patients with UVL and 14 with VL $> 1,000$ RNA copies/mL. One child in viral failure used cART for more than three years and was using only lamivudine (3TC) at time of the study. Three

viremic patients had reduced options of ART because of the age, one had multiresistant HIV-1 genotyping; all the others had poor adherence to ART.

Patients with UVL had a median of 4.2 (1.1–12.4) years of viremic control with median 0 (0 to 2) VL blips since their first UVL. There was no significant difference in relation to CD4 nadir between the two patient groups (Mann-Whitney test, $p=0.590$).

Ten healthy children and adolescents (four male and six female) were included as controls (median: 16.7 years, aged 4.8-18.2). There was no significant difference in age among the three groups (Kruskal Wallis test, $p=0.317$).

The results from hemogram and T cell immunophenotyping are shown in Table 2. Red blood counts were lower in patients with UVL in comparison to controls (Nonparametric Multiple Comparison test, $p<0.05$). Monocyte and CD8 counts were higher in both patient groups than in controls (Nonparametric Multiple Comparison test, $p<0.05$). The CD4/CD8 ratio was lower in viremic patients in comparison to controls and patients with UVL (Nonparametric Multiple Comparison test, $p<0.05$). There was no significant difference in other white cell, platelet, CD3 and CD4 counts among the groups. One patient with detectable VL had CD4 of 7.4% from total CD45⁺ cells (93×10^6 cells/L); all the others had CD4 >13%.

HIV-1-specific T cell proliferation

We measured T lymphoproliferation by flow cytometry (Figure 1) CD3, CD4 and CD8 immunophenotyping was carried out in the cultures of 34 infected patients (Figure 2). Median background CD3 proliferation in cultures without stimulus was 1.71% for patients with UVL, 1.48% for viremic patients and 0.99% for controls, with no differences reported

among groups (Kruskal-Wallis test, $p=0.204$). Controls showed HIV-specific proliferation as low as unstimulated cultures (Wilcoxon test, $p=0.169$).

Higher HIV-specific proliferation was found in patients with UVL in comparison to the viremic group (Mann-Whitney test, $p=0.022$). Proliferative response to HIV was not correlated with age, peripheral CD3, CD8, CD4 counts, CD4 percentage, or with CD4 nadir count (Spearman's correlation test, $p>0.05$). Comparisons between the groups of patients did not show differences in CD4 and CD8 percentages in HIV-stimulated cultures.

There was no difference in PHA-stimulated lymphoproliferation among the three groups (Kruskal-Wallis test, $p=0.076$), and age, VL, CD4 percentage and CD4 count did not influence the proliferative response to PHA (Spearman's correlation test, $p>0.05$). In both groups of patients, HIV- and PHA-stimulated proliferation was not different between clinical (N, A and B versus C) and immunological (1 and 2 versus 3) Centers for Disease Control and Prevention (CDC [23]) classifications (Mann-Whitney test, $p>0.05$).

Analyzing viremic patients, children with later initiation of ART had lower HIV-specific proliferation (median lymphoproliferation from children who started ART before one year of age: 0.42%; after one year of age: -0.05%, Mann-Whitney test, $p=0.046$). There was no correlation between VL and HIV-specific proliferation from the viremic group (Spearman's correlation test, $p=0.616$).

Among patients with UVL, there was no difference in HIV-specific proliferation from patients in relation to early initiation of ART (median lymphoproliferation from children who started ART before one year of age: 1.6%; after one year of age: 0.9%, Mann-Whitney test, $p=0.481$). Interestingly, HIV-specific proliferation showed a positive correlation with the time since the beginning of successful cART (Spearman's $\rho=0.538$,

p=0.012) and a negative correlation with the age at the start of successful cART (Spearman's rho= -0.479, p=0.028).

CD8 blast percentage in HIV-stimulated cultures showed a positive correlation with HIV-specific proliferation and peripheral CD8 counts from patients with UVL (Spearman's rho=0.544, p=0.011; and Spearman's rho=0.481, p=0.027, respectively), pointing to higher lymphoproliferation of CD8 blasts in comparison to CD4, but without reaching significant difference (Wilcoxon test, p=0.099).

HIV-1-specific cytokine production

HIV-specific cytokines in cell culture supernatants were determined by CBA and ELISA (Figure 3). Undetectable or small amounts of IL-2, IL-4 and IL-5 were observed in unstimulated and Micro-stimulated samples.

There was no difference in unstimulated and Micro-induced cytokine secretion between viremic and patients with UVL. In both groups of patients, HIV- and PHA-stimulated cytokine levels were not different between clinical (N, A and B versus C) and immunological (1 and 2 versus 3) CDC classifications from patients (Mann-Whitney test, p>0.05). PHA-induced IL-5 production was higher in patients with UVL in comparison to controls (Nonparametric Multiple Comparison test, p<0.05).

In cultures stimulated with HIV, IL-2 and IFN- α secretion was lower in the group with VL >1,000 RNA copies/mL in comparison to patients with UVL (Mann-Whitney test, p<0.001 and p=0.022, respectively).

In HIV-stimulated cultures from patients with UVL, HIV-specific proliferation correlated with IFN- γ and IL-2 concentration (Spearman's rho=0.657, p=0.008;

Spearman's $\rho=0.505$, $p=0.039$, respectively). IL-2 correlated to IFN- γ and IFN- α levels (Spearman's $\rho=0.836$, $p<0.001$; and Spearman's $\rho=0.539$, $p=0.038$, respectively). TNF- α had an inverse correlation with IFN- α level (Spearman's $\rho= -0.636$, $p=0.011$).

Similarly to HIV-specific proliferation, HIV-stimulated IFN- γ levels from patients with UVL showed a positive correlation with the time since the beginning of successful cART (Spearman's $\rho=0.618$, $p=0.014$) and a negative correlation with the age at the start of successful cART (Spearman's $\rho= -0.521$, $p=0.046$). HIV-specific IL-2 levels correlated with the time since the beginning of successful cART (Spearman's $\rho=0.520$, $p=0.033$).

As we analyzed the cultures with HIV from the viremic group, IL-10 showed a positive correlation with TNF- α concentration and a negative correlation with IFN- α levels (Spearman's $\rho=0.593$, $p=0.025$; Spearman's $\rho= -0.558$, $p=0.038$, respectively). IFN- γ concentration had a strong correlation with IL-2 (Spearman's $\rho=0.818$, $p=0.001$) and a marginal inverse correlation with VL (Spearman's $\rho= -0.555$, $p=0.049$).

There was no difference in cytokine levels from viremic and UVL patients who began ART before or after one year of age (Mann-Whitney test, $p>0.05$ in all cases).

Discussion

The goal of this study was to compare HIV-1 cell-mediated responses in HIV-vertically infected patients with UVL to a group with persistent HIV viremia. All patients were currently asymptomatic, without opportunistic infections. The great majority of our patients (23/35) had CD4 percentages $\geq 25\%$ of total CD45⁺ cells, and there were no

differences on CD4 and CD8 counts between groups. To stimulate PBMC responses, AT-2-inactivated HIV-1 particles were used, which are conformationally intact and invade cells without replication.

We found that patients with UVL had higher HIV-1-specific lymphoproliferation than the viremic group. Similarly, in cART-treated children and adolescents between five and 17 years-old, the frequency and magnitude of the proliferation to p24 were greater in patients on cART with VL <400 copies/mL than patients with VL >1,000 copies/mL [13]. A higher number of cART-treated children with UVL showed lymphoproliferative responses to HIV p55 compared to viremic patients [24]. Untreated children with CD4 <20% and VL >50,000 copies/mL had lower proliferation to HIV-1 p24 antigen than untreated children with CD4 >20% and VL <50,000 copies/ml and children under cART with UVL [25].

In our study with patients from one to 20 years of age, there was no correlation of age or VL with HIV-1-specific proliferation. P24 proliferative activity was absent in children below five years old, regardless of VL [13]. In cART-treated children with UVL, proliferation to at least one of HIV proteins p24, p17, gp120 and gp41 was detected at various time points and was not correlated to age [26]. Among cART-treated children and adolescents between four and 24 years old, lymphoproliferation inversely correlated with VL [27].

We reported that lower age and greater time since the start of successful cART in patients with UVL was associated with higher HIV-specific proliferation. Moreover, viremic patients who started ART after one year of age showed even lower proliferation to

HIV. Weinberg and Pott [27] also pointed to a tendency of the correlation between longer time under cART and HIV-specific proliferation from pediatric patients.

Using CBA and ELISA techniques, we measured IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, TNF- α , IFN- γ , IFN- α and TGF- β 1 concentration in PBMC supernatants after 48 hours of incubation. We did not detect differences in HIV-stimulated IFN- γ concentration in cultures from patients with or without viral suppression, or age-related changes in IFN- γ production. Accordingly, Hainaut and colleagues [25] did not notice a difference between IFN- γ concentration from untreated children with different levels of VL and cART-treated patients. In our work, IFN- γ concentration had a marginal negative correlation with VL. Using *Enzyme-linked Immunosorbent Spot assay* (ELISPOT) and Intracellular Cytokine Staining techniques, there were controversial findings in respect to HIV-specific IFN- γ concentration, with some pediatric studies observing a positive [28,29], negative [17,30] or no correlation with VL [27]. An analysis with more than 100 HIV-infected pediatric patients showed that an inverse quadratic regression described VL and IFN- γ relation [31].

Our results showed that patients with UVL had IFN- γ concentration correlated to HIV-specific proliferation, as shown before [25]. Nevertheless, the frequency of Gag-specific IFN- γ -secreting CD4 cells was low in most cART-treated children despite robust Gag-specific proliferative activity [13].

In our study, HIV-stimulated IL-2 concentration was lower in PBMC cultures from viremic patients, with a positive correlation with IFN- γ production. This pattern was also demonstrated by Correa and colleagues [29], whose work stated that cART-treated children with higher VL had lower frequency of IL-2⁺ CD4 cells when compared to children with lower VL, showing that VL inversely correlated with IL-2⁺ CD4 cell frequency. They also

showed that polyfunctional IL-2⁺IFN- γ ⁺ CD4 cells were more frequent in children with lower VL. In horizontally HIV-infected adolescents, Gag-specific IL-2⁺IFN- γ ⁺ CD4 percentage inversely correlated with VL [28]. IL-2 plays an important role in T cell clonal expansion, effector development and survival [32]. IL-2 secretion has been shown to be reduced in Programmed cell death-1⁺ T cells, which occurs in HIV chronic infection, especially in patients with persistent viremia [33-34].

In patients with UVL, the time since the start of successful cART correlated with IFN- γ and IL-2 levels in cultures with HIV. Similarly, Gag-specific IL-2⁺IFN- γ ⁺ CD4 cells from HIV-infected adolescents correlated with the time since the beginning of cART [28]. In a child who started cART at the first week of life, HIV-specific proliferation and the percentage of IFN- γ ⁺ and IL-2⁺-producing CD4 cells were drastically reduced after VL rebound due to therapy interruption at two years old [19].

AT-2-inactivated HIV-1 is able to stimulate IFN- α secretion from plasmacytoid dendritic cells [35]. In our study, HIV-stimulated IFN- α secretion was higher in the cultures from patients with UVL in comparison to the viremic group, with a positive correlation with IL-2 levels and a negative correlation with TNF- α . In ART-naïve adults, CpG-induced IFN- α production inversely correlated with VL [36]. The addition of IFN- α to PHA-stimulated PBMC increased the IL-2 concentration in culture supernatants from HIV-infected patients, suggesting that IL-2 may be regulated by IFN- α [37].

In our study, TNF- α , IL-4, IL-5 and IL-10 levels in PBMC cultures with HIV-1 were undetectable or low and did not differ between the groups of patients. In the viremic group, IL-10 showed a positive correlation with TNF- α and negative correlation with IFN- α levels. HIV-stimulated TNF- α and IL-10 production were infrequently shown in cART-

naïve infants and children and in viremic adolescents under cART [12,17,38]. However, p24-specific IL-5 and IL-13 production was higher in cART-treated patients with UVL than in untreated children with CD4 <20% and VL >50,000 copies/mL [25].

Although, plasma TGF- β 1 levels correlated with VL in ART-naïve adult patients [39], we failed to describe a difference in HIV-stimulated TGF- β 1 concentration between the patient groups.

After ART, PHA-stimulated proliferation was lower in HIV-infected children when compared to controls, especially in children with continuous lower CD4 counts and higher VL [9,40,41]. In the present study, both groups of patients under long time cART for a period had similar PHA proliferative responses to controls, suggesting that an immune reconstitution occurred.

After cART, HIV-infected children showed similar PHA-induced IFN- γ and TNF- α but decreased IL-5 levels in comparison to controls [1,41]. We found that only PHA-induced IL-5 concentration was higher in cultures from patients with UVL in comparison to controls. Moreover, we did not find an impact of CDC classifications in PHA or HIV responses.

Taken together, our results suggested that the development and maintenance of HIV-specific proliferation, IL-2, IFN- γ and IFN- α -producing cells may be acquired by viral control and early introduction of cART. The earlier diagnosis and cART initiation decreased the virus dissemination and preserved immune cells and functions [14,19]. More studies to clarify the relation between the antigen exposure and the montage of virus-specific T cell response will guide the decision about when to prescribe cART to HIV-1 vertically infected children.

Acknowledgments

We thank all children, adolescents and their families who accepted to participate in this study. We thank Fernanda Cunha, Irene Santos, Marcina Garcia, Dr. Francisco Aoki, MD. Dorival Soares and MD. Eduardo Palandri for the help with clinical and laboratory data. We are also grateful to Dr. Jeffrey Lifson, chief from Retroviral Pathogenesis Section, Frederick National Laboratory for Cancer Research (USA), who gently donated the HIV-1 particles and microvesicles.

Cited references

- [1] Reuben JM, Lee BN, Paul M, Kline MW, Cron SG, et al. (2002) Magnitude of IFN-gamma production in HIV-1-infected children is associated with virus suppression. *J Allergy Clin Immunol* 110: 255-261.
- [2] Funk MB, Buchholz B, Notheis G, Neubert J, Feiterna-Sperling C, et al. (2008) Disease progression in HIV-1 infected children and adolescents - results of a German-Austrian cohort study. *Eur J Med Res* 13: 371-378.
- [3] Weinberg A, Dickover R, Britto P, Hu C, Patterson-Bartlett J, et al. (2008) Continuous improvement in the immune system of HIV-infected children on prolonged antiretroviral therapy. *AIDS* 22: 2267-2277.
- [4] Walker AS, Doerholt K, Sharland M, Gibb DM; Collaborative HIV Paediatric Study (CHIPS) Steering Committee (2004) Response to highly active antiretroviral therapy varies with age: the UK and Ireland Collaborative HIV Paediatric Study. *AIDS* 18: 1915-1924.

- [5] Geretti AM, Smith C, Haberl A, Garcia-Diaz A, Nebbia G, et al. (2008) Determinants of virological failure after successful viral load suppression in first-line highly active antiretroviral therapy. *Antivir Ther* 13: 927-936.
- [6] Cotugno N, Douagi I, Rossi P, Palma P (2012) Suboptimal immune reconstitution in vertically HIV infected children: a view on how HIV replication and timing of HAART initiation can impact on T and B-cell compartment. *Clin Dev Immunol* 2012: 805151.
- [7] Resino S, Seoane E, Pérez A, Ruiz-Mateos E, Leal M, et al. (2006) Different profiles of immune reconstitution in children and adults with HIV-infection after highly active antiretroviral therapy. *BMC Infect Dis* 6: 112.
- [8] Vrisekoop N, van Gent R, de Boer AB, Otto SA, Borleffs JC, et al. (2008) Restoration of the CD4 T cell compartment after long-term highly active antiretroviral therapy without phenotypical signs of accelerated immunological aging. *J Immunol* 181: 1573-1581.
- [9] Resino S, Correa R, Bellón JM, Muñoz-Fernández MA (2003) Preserved immune system in long-term asymptomatic vertically HIV-1 infected children. *Clin Exp Immunol* 132 :105-112.
- [10] Rigaud M, Borkowsky W, Muresan P, Weinberg A, Larussa P, et al. (2008) Impaired immunity to recall antigens and neoantigens in severely immunocompromised children and adolescents during the first year of effective highly active antiretroviral therapy. *J Infect Dis* 198: 1123-1130.
- [11] Alsina L, Noguera-Julian A, Fortuny C (2013) Impaired cellular immune response to tetanus toxoid but not to cytomegalovirus in effectively HAART-treated HIV-infected children. *Vaccine* 31: 2417-2419.

- [12] Thobakgale CF, Ramduth D, Reddy S, Mkhwanazi N, de Pierres C, et al. (2007) Human immunodeficiency virus-specific CD8+ T-cell activity is detectable from birth in the majority of in utero-infected infants. *J Virol* 81: 12775-12784.
- [13] Feeney ME, Draenert R, Roosevelt KA, Pelton SI, McIntosh K, et al. (2003) Reconstitution of virus-specific CD4 proliferative responses in pediatric HIV-1 infection. *J Immunol* 171: 6968-6975.
- [14] Luzuriaga K, McManus M, Catalina M, Mayack S, Sharkey M, et al. (2000) Early therapy of vertical human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection: control of viral replication and absence of persistent HIV-1-specific immune responses. *J Virol* 74: 6984-6991.
- [15] Bunupuradah T, Puthanakit T, Kosalaraksa P, Kerr S, Boonrak P, et al. (2011) Immunologic and virologic failure after first-line NNRTI-based antiretroviral therapy in Thai HIV-infected children. *AIDS Res Ther* 8: 40.
- [16] Foster C, Fidler S (2010) Optimizing Antiretroviral Therapy in Adolescents with Perinatally Acquired HIV-1 Infection. *Expert Rev Anti Infect Ther* 8: 1403-1416.
- [17] Sharp ER, Willberg CB, Kuebler PJ, Abadi J, Fennelly GJ, et al. (2011) Immunodominance of HIV-1 specific CD8+ T-cell responses is related to disease progression rate in vertically infected adolescents. *PLoS One* 6: e21135.
- [18] Jaspan HB, Lawn SD, Safrit JT, Bekker LG (2006) The maturing immune system: implications for development and testing HIV-1 vaccines for children and adolescents. *AIDS* 20: 483–494.

- [19] Viganò A, Trabattoni D, Schneider L, Ottaviani F, Aliffi A, et al. (2006) Failure to eradicate HIV despite fully successful HAART initiated in the first days of life. *J Pediatr* 148: 389-391.
- [20] World Health Organization (2010) Antiretroviral Therapy for HIV Infection in Infants and Children: Towards Universal Access: Recommendations for a Public Health Approach: 2010 Revision. WHO Press, Geneva.
- [21] Rossio JL, Esser MT, Suryanarayana K, Schneider DK, Bess JW Jr, et al. (1998) Inactivation of human immunodeficiency virus type 1 infectivity with preservation of conformational and functional integrity of virion surface proteins. *J Virol* 72: 7992-8001.
- [22] Gaines H, Andersson L, Biberfeld G (1996) A new method for measuring lymphoproliferation at the single-cell level in whole blood cultures by flow cytometry. *J Immunol Methods* 195: 63-72.
- [23] Centers for Disease Control and Prevention (1994) 1994 Revised Classification System for Human Immunodeficiency Virus Infection in Children Less Than 13 Years of Age. *MMWR* 43: 1-10.
- [24] Scott ZA, Beaumier CM, Sharkey M, Stevenson M, Luzuriaga K (2003) HIV-1 replication increases HIV-specific CD4+ T cell frequencies but limits proliferative capacity in chronically infected children. *J Immunol* 170: 5786-5792.
- [25] Hainaut M, Verscheure V, Ducarme M, Schandené L, Levy J, et al. (2011) Cellular immune responses in human immunodeficiency virus (HIV)-1-infected children: is immune restoration by highly active anti-retroviral therapy comparable to non-progression? *Clin Exp Immunol* 165: 77-84.

- [26] Palma P, Romiti ML, Cancrini C, Pensieroso S, Montesano C, et al. (2008) Delayed early antiretroviral treatment is associated with an HIV-specific long-term cellular response in HIV-1 vertically infected infants. *Vaccine* 26: 5196-5201.
- [27] Weinberg A, Pott GB (2003) Immunity to human immunodeficiency virus (HIV) in children with chronic HIV infection receiving highly active antiretroviral therapy. *Clin Diagn Lab Immunol* 10: 821-825.
- [28] Kapogiannis BG, Henderson SL, Nigam P, Sharma S, Chennareddi L, et al. (2006) Defective IL-2 production by HIV-1-specific CD4 and CD8 T cells in an adolescent/young adult cohort. *AIDS Res Hum Retroviruses* 22: 272-282.
- [29] Correa R, Harari A, Vallelian F, Resino S, Munoz-Fernandez MA, et al (2007) Functional patterns of HIV-1-specific CD4 T-cell responses in children are influenced by the extent of virus suppression and exposure. *AIDS* 21: 23-30.
- [30] Montesano C, Anselmi A, Palma P, Bernardi S, Cicconi R, et al. (2010) HIV replication leads to skewed maturation of CD8-positive T-cell responses in infected children. *New Microbiol* 33: 303-309.
- [31] Borkowsky W, Zhan MX, Chen SH, Ilmet T, Kaul A, et al. (2004) Correlation between HIV-Specific CD8 cell production of interferon-gamma and plasma levels of HIV RNA in perinatally infected pediatric populations. *J Infect Dis* 190: 722-726.
- [32] Malek TR (2008) The biology of interleukin-2. *Annu Rev Immunol* 26: 453-479.
- [33] Khaitan A, Unutmaz D (2011) Revisiting Immune Exhaustion during HIV Infection. *Curr HIV/AIDS Rep* 8: 4-11.

- [34] Wei F, Zhong S, Ma Z, Kong H, Medvec A, Ahmed R, et al (2013) Strength of PD-1 signaling differentially affects T-cell effector functions. *Proc Natl Acad Sci USA* 110: E2480-489.
- [35] Simmons RP, Scully EP, Groden EE, Arnold KB, Chang JJ, et al. (2013) HIV-1 infection induces strong production of IP-10 through TLR7/9-dependent pathways. *AIDS* 27: 2505-2517.
- [36] Donhauser N, Pritschet K, Helm M, Harrer T, Schuster P, et al. (2012) Chronic immune activation in HIV-1 infection contributes to reduced interferon alpha production via enhanced CD40:CD40 ligand interaction. *PLoS One* 7: e33925.
- [37] Stylianou E, Aukrust P, Müller F, Nordøy I, Frøland SS (2001) Complex effects of interferon-alpha on the cytokine network in HIV infection - possible contribution to immunosuppression. *Cytokine* 14: 56-62.
- [38] Alfonzo MA, Diaz A, Siciliano L, López MG, Hung A, et al. (2012) Functional state of CD4+ and CD8+ T lymphocytes and their role in the slow progression of HIV infection in pediatric patients. *J Pediatr (Rio J)* 88: 161-168.
- [39] Card CM, Keynan Y, Lajoie J, Bell CP, Dawood M, et al. (2012) HIV controllers are distinguished by chemokine expression profile and HIV-specific T-cell proliferative potential. *J Acquir Immune Defic Syndr* 59: 427-437.
- [40] Resino S, Correa R, Bellón JM, Sánchez-Ramón S, Muñoz-Fernández MA (2002) Characterizing immune reconstitution after long-term highly active antiretroviral therapy in pediatric AIDS. *AIDS Res Hum Retroviruses* 18: 1395-1406.

[41] Resino S, Galán I, Pérez A, León JA, Seoane E, et al. (2004) HIV-infected children with moderate/severe immune-suppression: changes in the immune system after highly active antiretroviral therapy. *Clin Exp Immunol* 137: 570–577.

	UVL	VL >1,000 copies/mL
N	21	14
Gender		
Male	13	9
Female	8	5
Median age in years (minimum - maximum)	13.0 (5.9 - 19.4)	10.8 (1.6 - 20.8)
≤ 2	0	2
2 - 5	0	1
5 - 10	5	4
10 - 21	16	7
Clinical CDC Classification		
N	2	3
A	2	0
B	12	6
C	5	5
Immunological CDC Classification		
1	3	1
2	9	5
3	9	8
CD4		
≥25%	19	4
15% - 24%	2	6
<15%	0	4
Age at the beginning of ART (years)	1.9 (0.1 - 10.0)	1.3 (0.3 - 11.4)
Beggining of ART before one year	10	7
Age at the beggining of successful cART (years)	8.3 (0.1 - 15.4)	NA
Total time of controlled viremia (years)	4.2 (1.1 - 12.4)	NA
Medium CD4 nadir (minimum - maximum, 10⁶ cells/L)	316 (24 - 856)	351 (49 - 1,377)
Antiretroviral therapy		
2 NRTI + 1 NNRTI	10	4
2 NRTI + 1 PI	6	7
2 NRTI + 2 PI	1	1
2 NRTI + 1 NNRTI + 1 PI	1	0
3 NRTI + 1 NNRTI + 1 PI	0	1
2 NRTI + 1 NNRTI + 1 PI + RAL	2	0
2 NRTI + 2 PI + RAL	1	0
Only 3TC	0	1

Table 1: Clinical and laboratory characteristics of HIV-1 infected, pediatric patients with undetectable viral load (UVL) or VL >1,000 RNA copies/mL.

CDC: Centers for Disease Control and Prevention; NA: not applicable; NRTI: Nucleoside/Nucleotide Reverse Transcriptase Inhibitors; NNRTI: Non-Nucleoside Nucleotide Reverse Transcriptase Inhibitors; PI: Protease Inhibitor; RAL: raltegravir; 3TC: lamivudine.

Parameter	UVL	VL >1,000 copies/mL	Control	P value
Leukocytes (10⁹ cells/L)	5.65 (3.5 - 8.44)	5.37 (2.22 - 19.75)	5.05 (4.00 - 7.45)	0.837
Lymphocytes (10⁹ cells/L)	2.40 (1.71 - 5.24)	2.19 (1.00 - 13.88)	2.17 (1.34 - 3.96)	0.547
Monocytes (10⁹ cells/L)	0.53 (0.28 - 0.81)	0.54 (0.38 - 2.62)	0.32 (0.27 - 0.47)	< 0.001
Neutrophils (10⁹ cells/L)	1.94 (0.83 - 4.44)	2.27 (0.82 - 7.35)	2.48 (1.61 - 3.94)	0.439
Eosinophils (10⁹ cells/L)	0.17 (0.05 - 1.01)	0.21 (0.02 - 0.65)	0.14 (0.04 - 0.69)	0.576
Basophils (10⁹ cells/L)	0.03 (0 - 0.05)	0.01 (0 - 0.11)	0.02 (0 - 0.05)	0.314
Erythrocytes (10¹² cells/L)	3.90 (3.29 - 4.93)	4.26 (3.46 - 5.22)	4.61 (3.85 - 5.28)	0.004
Hemoglobin (g/dL)	13.1 (11.3 - 15.9)	13.3 (9.0 - 15.4)	12.9 (11.9 - 16.3)	0.908
Hematocrit (%)	36.9 (32.1 - 46.1)	37.9 (29.5 - 44.7)	38.9 (36.3 - 46.9)	0.412
Platelets (10⁹ cells/L)	273 (60 - 418)	228 (124 - 420)	232 (141 - 305)	0.220
CD3⁺ (10⁶ cells/L)	2,208 (1,235 - 4,297)	1,692 (771 - 8,590)	1,658 (878 - 2,941)	0.295
CD3⁺ CD4⁺ (10⁶ cells/L)	898 (486 - 1982)	491 (93 - 2,161)	847 (431 - 1,261)	0.134
CD3⁺ CD8⁺ (10⁶ cells/L)	1,004 (444 - 2,268)	1,255 (474 - 6,216)	604 (367 - 1,451)	0.004
CD4/CD8 ratio	0.91 (0.48 - 2.03)	0.41 (0.15 - 1.72)	1.27 (0.87 - 1.92)	< 0.001
HIV-1 VL (RNA copies/mL)	<50	5,482 (1,215 - 106,705)	N/A	N/A
HIV-1 VL (log RNA copies/mL)	N/A	3.74 (3.09 - 5.03)	N/A	N/A

Table 2: Median (minimum and maximum) of peripheral blood counts, T lymphocyte immunophenotyping and HIV-1 viral load (VL) from HIV-1 infected, pediatric patients with undetectable VL (UVL) or VL >1,000 RNA copies/mL and controls.

P values were performed with Kruskal-Wallis test; N/A: non-applicable.

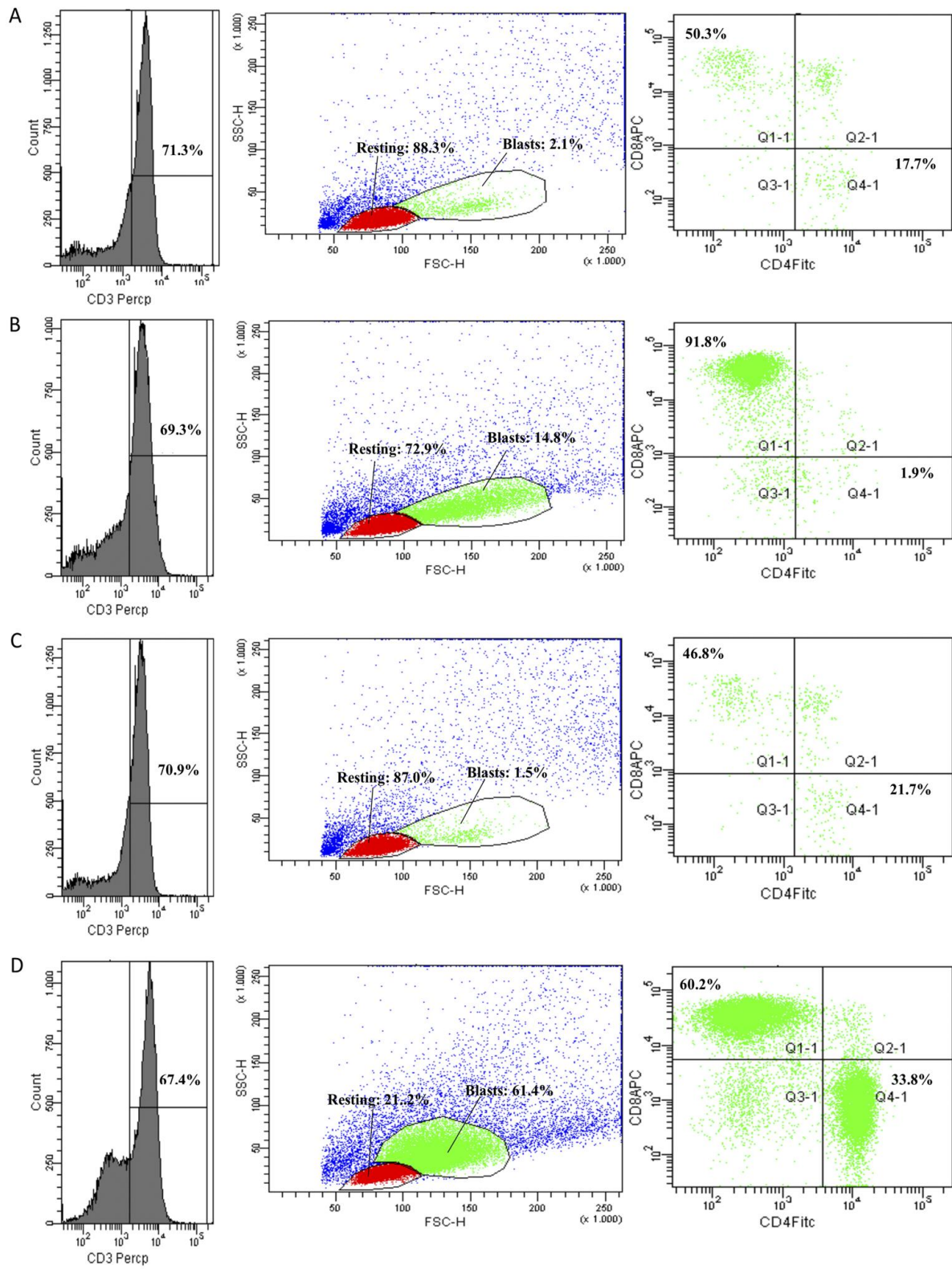
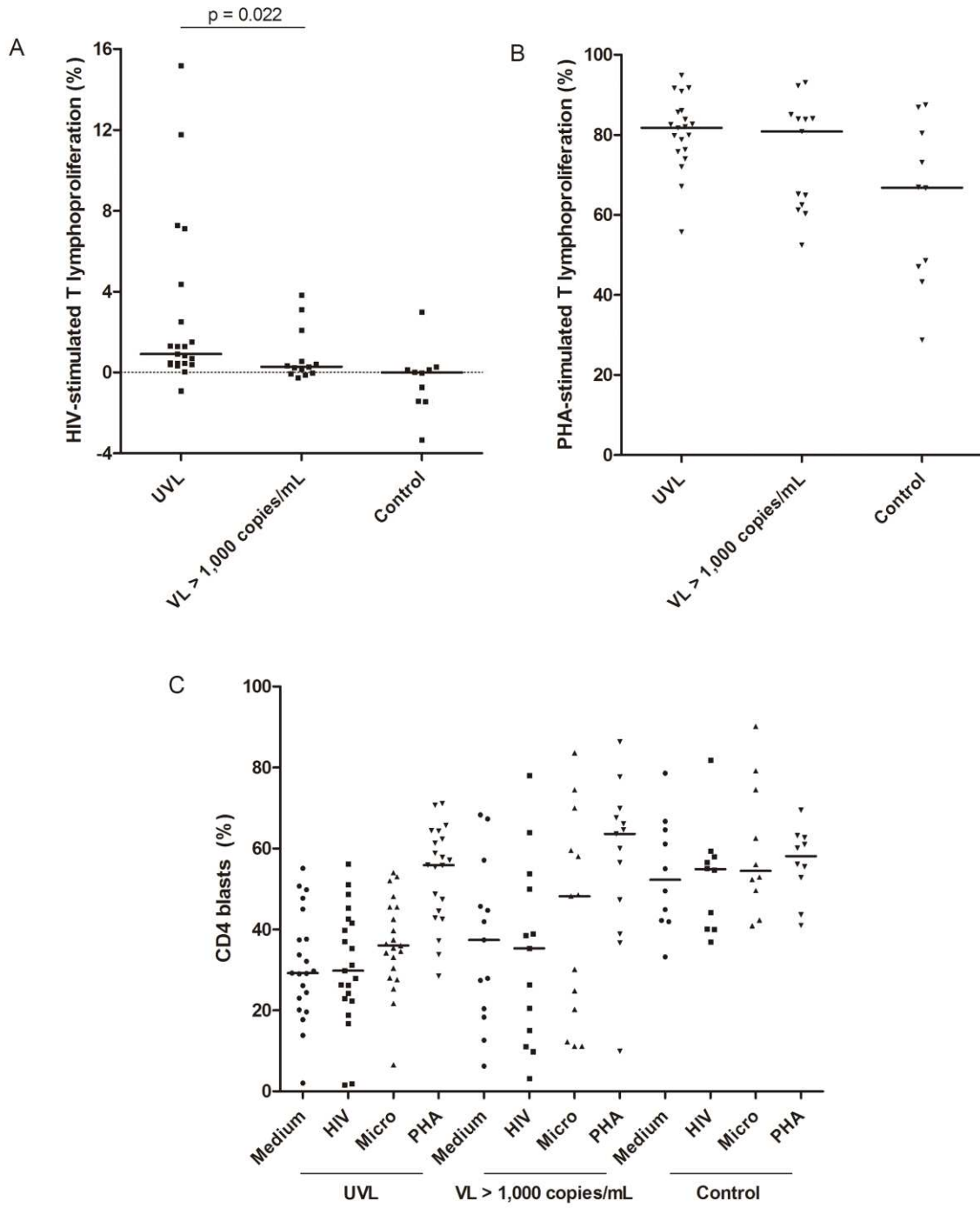


Figure 1: Lymphoproliferation by flow cytometry from a HIV-infected child.

T lymphocyte proliferation and subsets (T CD4 and CD8) were determined by flow cytometry in unstimulated (Medium, A) and HIV-1 (B), Micro (C) and PHA-stimulated (D) PBMC of a HIV-infected child under cART. After gating on CD3⁺ cells, events were analyzed for size and complexity (FS and SS gates), from which resting and blast lymphocytes were identified. T lymphocyte subsets were verified in blast lymphocytes.

Micro: microvesicles; PHA: Phytohemagglutinin; PBMC: Peripheral blood mononuclear cells; cART: combination antiretroviral therapy.



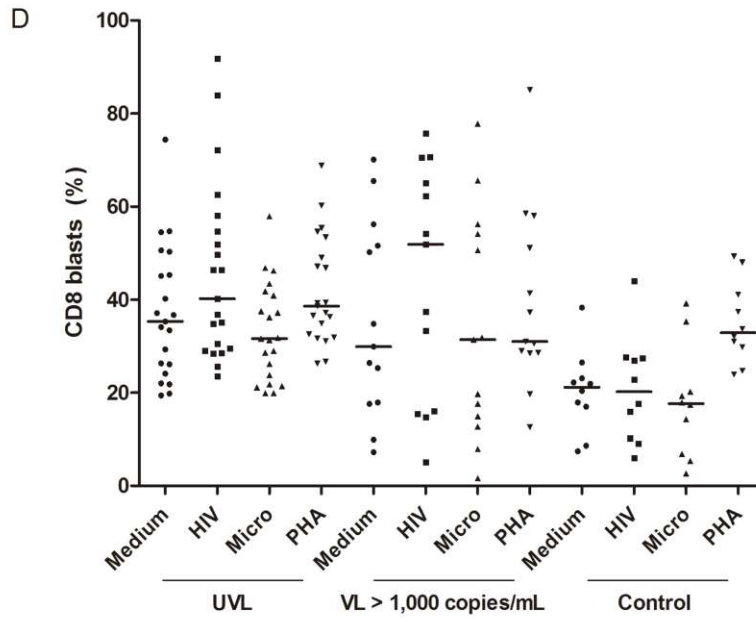
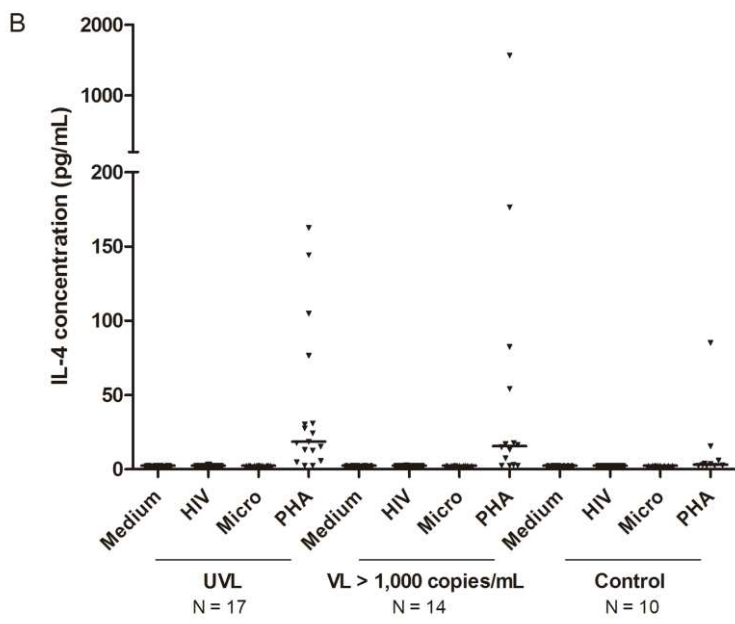
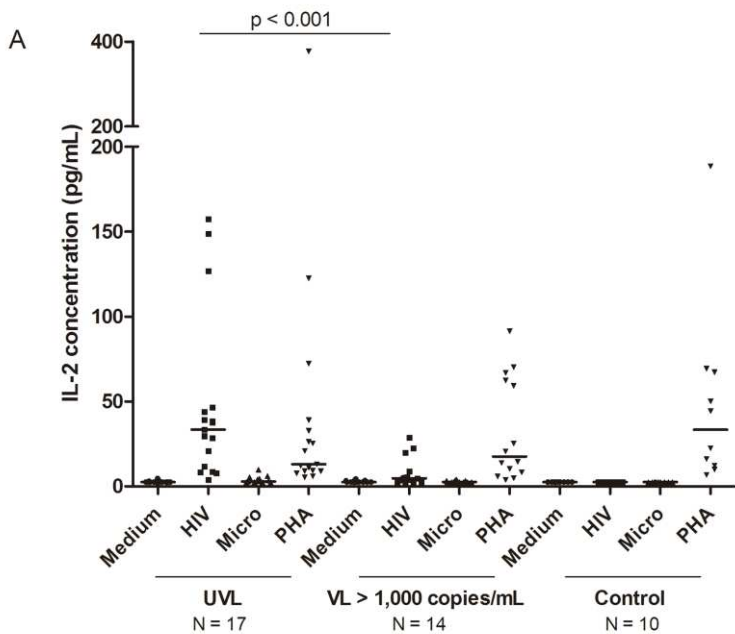
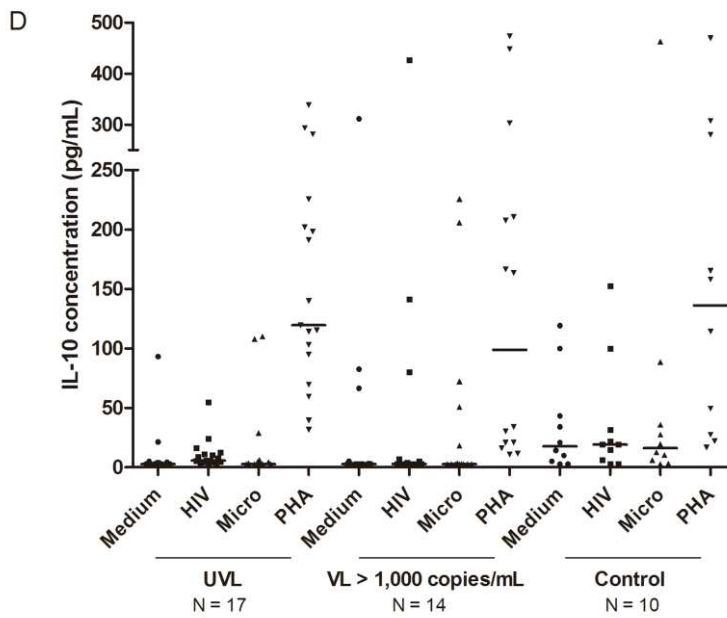
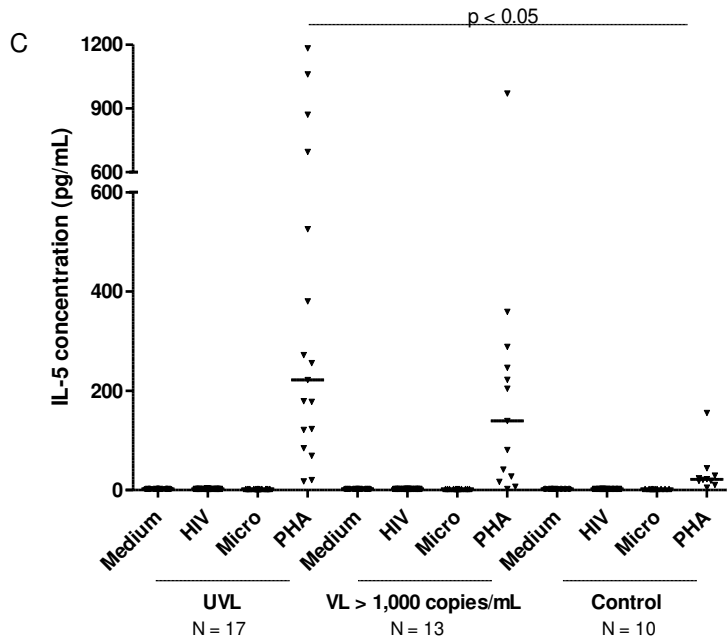


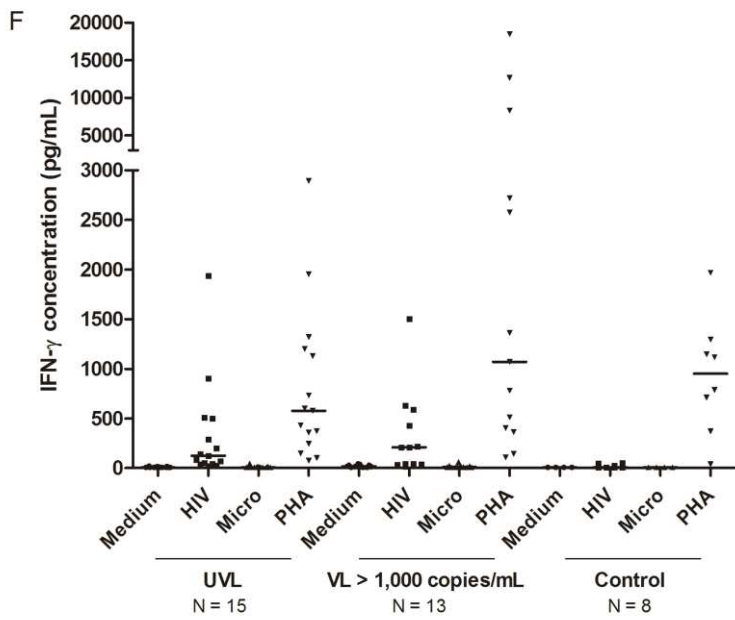
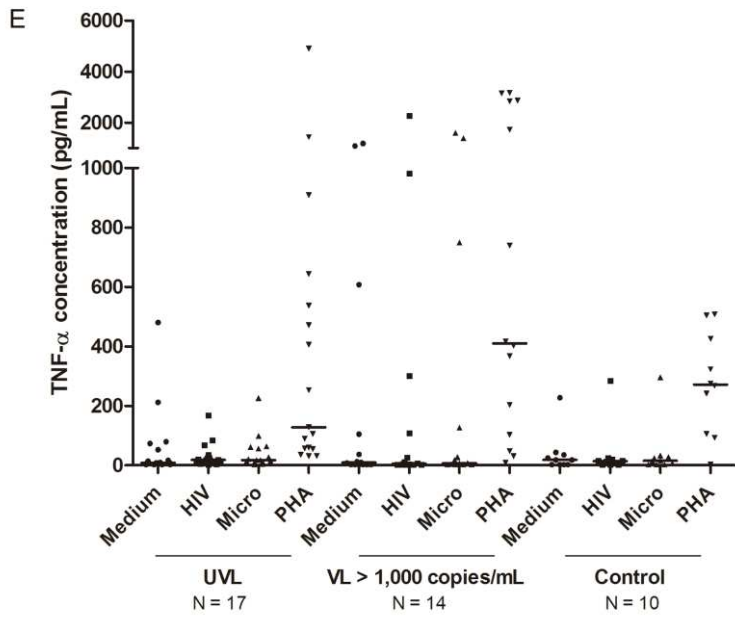
Figure 2: HIV-1 and PHA-stimulated lymphoproliferation from HIV-1-infected pediatric patients and controls.

HIV-1 and PHA-stimulated PBMC lymphoproliferation (A, B) and the percentage of CD4 and CD8 blasts (C, D) in unstimulated cultures (Medium: ●) or stimulated with HIV-1 (■), Micro (▲) and PHA (▼) from HIV-1-infected children and adolescents with UVL or VL >1,000 RNA copies/mL and controls. Medians are indicated by bars.

PHA: Phytohemagglutinin; PBMC: Peripheral blood mononuclear cells; Micro: microvesicles; UVL: undetectable viral load; VL: viral load; p value was performed with Mann-Whitney test.







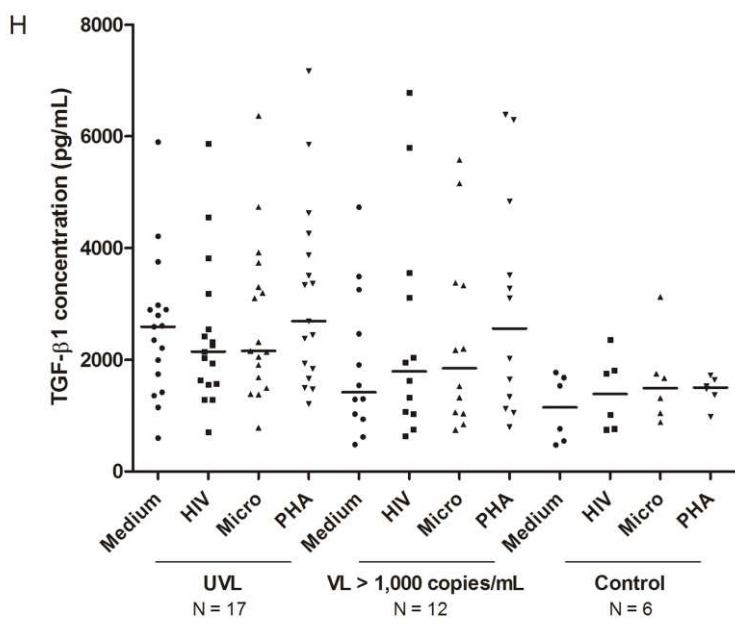
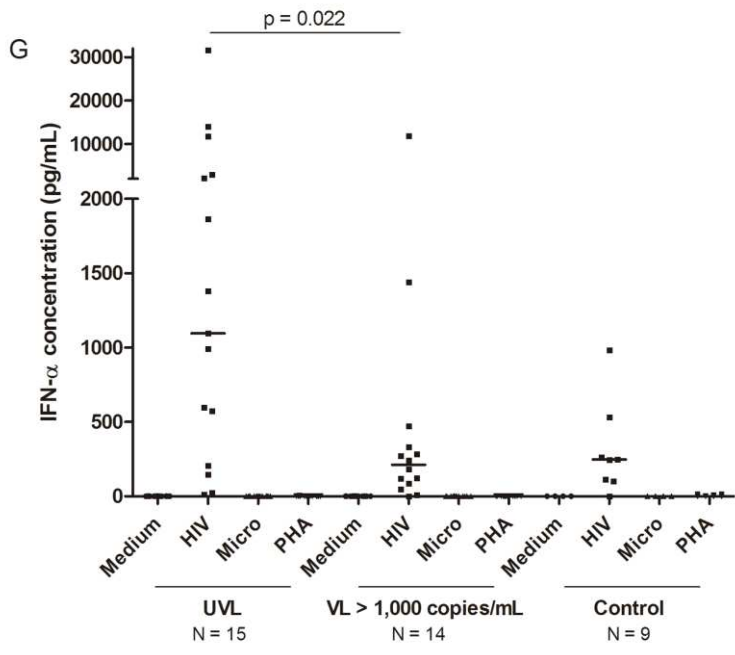


Figure 3: Cytokine production in culture supernatants from HIV-1-infected pediatric patients and controls.

IL-2 (A), IL-4 (B), IL-5 (C), IL-10 (D), TNF- α (E), IFN- γ (F) and IFN- α (G) concentration were determined by CBA and TGF- β 1 (H) by ELISA (in pg/mL) in PBMC cultures from HIV-1-infected children and adolescents with UVL or VL >1,000 RNA copies/mL and controls. PBMC were incubated without stimuli (Medium: ●) or stimulated with HIV-1 (■), Micro (▲) and PHA (▼). Medians are indicated by bars.

PBMC: Peripheral blood mononuclear cells; CBA: Cytometric bead array; ELISA: Enzyme-Linked Immunoassay; UVL: undetectable viral load; VL: viral load; Micro: microvesicles; PHA: Phytohemagglutinin, N: number of samples. P value was performed with Mann-Whitney test (A and G) and Nonparametric Multiple Comparison test (C).



5- DISCUSSÃO

Embora os pacientes de nosso estudo estivessem sob TARVc por longo período, o grupo com viremia ainda apresentava maior concentração de IgM e IgG que os controles e os pacientes com CVI. Além disso, estes exibiam níveis de IgA superiores aos dos controles. A hipergamaglobulinemia persistente na infecção crônica por HIV é atribuída, na literatura, à ativação policlonal de linfócitos B, que ocorre desde a infecção aguda em adultos (Titanji et al. 2005, Levesque et al. 2009). Na infecção por HIV, em especial nos pacientes com replicação viral detectável, possivelmente, ocorre um desvio da diferenciação de células B a plasmócitos de fenótipo terminal, sendo a plasmocitose um achado comum na medula óssea e na periferia (Nagase et al. 2001, Titanji et al. 2005, Moir et al. 2008a, Doria-Rose & Connors 2009, Morais et al. 2010). Além disso, as células B CD21⁻, cuja frequência foi elevada em pacientes virêmicos, apresentam fenótipo similar a plasmócitos, maior secreção de imunoglobulinas e redução da capacidade de hipermutação somática e da proliferação (Moir et al. 2001, Moir et al. 2008a, Sciaranghella et al. 2013).

Outro resultado interessante é a associação da magnitude dos títulos de anti-HBs, anti-difteria e anti-tétano com o tempo desde a última dose e da concentração de anti-HBs com o número de doses vacinais, o que foi encontrado anteriormente para difteria e para hepatite B e coqueluche, respectivamente (Tejiokem et al. 2007, Abzug et al. 2009, Mena et al. 2012). Estes resultados corroboram com o frequente relato da perda de anticorpos específicos a antígenos vacinais ao longo do tempo (Melvin & Mohan 2003, Levin et al. 2006, Rigaud et al. 2008, Aupibul et al. 2010, Lao-araya et al. 2011). Desde a infecção aguda pelo HIV, as células B de memória apresentaram predisposição à apoptose celular (Titanji et al. 2005). Na infecção crônica, a exaustão dos linfócitos B poderia contribuir

para a baixa concentração de anticorpos e perda da resposta protetora (Moir et al. 2008a, Pallikkuth et al. 2011).

A resposta celular específica ao HIV foi estudada pela proliferação e pela produção das citocinas IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α), Interferon- γ (IFN- γ), IFN- α e Fator Transformador de Crescimento- β 1 (TGF- β 1) em cultura de células mononucleadas do sangue periférico (CMSP), estimuladas pelo HIV-1 inativado por aldritol-2 (AT-2), que é capaz de infectar as células, mas não se replica (Rossio et al. 1998). A resposta linfoproliferativa ao HIV envolveu células CD4 e CD8, como descrito por Puissant-Lubrano et al. (2009). Os pacientes com CVI apresentaram maior proliferação de linfócitos T, avaliada por citometria de fluxo, em relação aos virêmicos. Semelhantemente, outros estudos mostraram que crianças e adolescentes com infecção pelo HIV e supressão ou redução da viremia apresentaram maior proliferação frente a antígenos do HIV (Feeney et al. 2003, Scott et al. 2003, Hainaut et al. 2011). Em crianças e adolescentes com infecção pelo HIV sob TARVc, a linfoproliferação foi inversamente correlacionada à CV (Weinberg et al. 2003). Diferentemente, a avaliação da proliferação frente ao antígeno p55 do HIV foi infrequente em crianças infectadas, mesmo nas com supressão da viremia (Scott et al. 2003). No estudo de Alfonzo et al. (2012) com crianças *naive* de TARV, a proliferação não foi detectada após 72 horas de cultura de CMSP, incubadas com peptídeos do envelope do HIV.

Não encontramos diferenças nos dois grupos de pacientes quanto à concentração de IFN- γ por *Cytometric Bead Array* (CBA) no sobrenadante das culturas estimuladas por HIV. A produção desta citocina frente à p24 do HIV em sobrenadante de cultura por *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) também não diferiu no estudo de Hainaut et

al. (2011), que comparou um grupo de crianças sob TARVc *versus* grupos de crianças sem terapia e com diferentes níveis de CV. Dentre os pacientes virêmicos, encontramos uma correlação inversa entre CV e IFN- γ . A grande maioria dos trabalhos estuda a produção de IFN- γ por citometria de fluxo intracelular ou por *Enzyme-linked Immunosorbent Spot Assay* (ELISPOT), havendo resultados controversos quanto à correlação entre esta citocina e a CV. Nos pacientes pediátricos com HIV, foram relatadas associações entre CV e a produção específica de IFN- γ por correlações positivas (Correa et al. 2007, Kapogiannis et al. 2008), negativas (Montesano et al. 2010, Sharp et al. 2011), em forma de uma curva quadrática inversa (Borkowsky et al. 2004) ou, ainda, nenhuma associação entre as duas variáveis (Weinberg et al. 2003). Nos pacientes com supressão da viremia, a resposta linfoproliferativa ao HIV correlacionou-se à concentração de IFN- γ , como foi descrito anteriormente (Hainaut et al. 2011). No entanto, a frequência de CD4 produtoras de IFN- γ + frente ao Gag de HIV foi baixa, apesar da intensa proliferação ao antígeno (Feeney et al. 2003).

Neste estudo, a concentração de IL-2 frente ao estímulo do HIV-1 inativado por AT-2 foi reduzida nas culturas dos pacientes com CV > 1000 cópias/mL em relação aos com CVI, sendo que IL-2 e IFN- γ foram fortemente correlacionadas. Esse padrão de resposta celular também foi descrito por Correa et al. (2007) pela técnica de citometria de fluxo intracelular, que notaram que a frequência de células CD4 produtoras de IL-2 frente a p55 do HIV foi inversamente correlacionada com a CV. Em nosso estudo, em pacientes com supressão sustentada da viremia sob TARVc, a proliferação ao HIV inativado por AT-2 foi diretamente correlacionada aos níveis de IL-2 e IFN- γ . Além disso, Kapogiannis et al. (2006) e Correa et al. (2007) descreveram que as células CD4 IL-2⁺IFN- γ (polifuncionais)

específicas ao HIV estavam mais preservadas em crianças e adolescentes com maior controle de CV. Assim, os resultados deste trabalho, somados à literatura, apontam para um papel fundamental da supressão da viremia na preservação das respostas celulares ao HIV. A citocina IL-2 participa dos processos de expansão clonal de células T, desenvolvimento de células efetoras e sobrevivência (Malek 2008). Sua redução nas culturas dos virêmicos resultou em menor proliferação celular, possivelmente pela inibição de secreção de IL-2, mediada por um mecanismo PD-1-dependente, cuja expressão elevada foi descrita na infecção por HIV, devido à exaustão do compartimento T (Khaitan & Unutmaz 2011, Wei et al. 2013). Na mesma linha de raciocínio, robusta resposta linfoproliferativa e alta frequência de células polifuncionais são relacionadas à contenção da viremia em pacientes com controle virológico espontâneo e as deficiências causadas pela viremia inicial na infecção por HIV nem sempre são recuperadas com TARVc (Arrode et al. 2005, Dyer et al. 2008, Porichis & Kaufmann 2011).

Outro resultado importante foi a redução da concentração de IFN- α frente ao estímulo do HIV-1 inativado por AT-2 nas culturas dos pacientes com CV > 1000 cópias/mL em relação aos com CVI, nos quais a dosagem de IFN- α foi diretamente correlacionada com IL-2 e inversamente com TNF- α . Simmons et al. (2013) mostraram que a partícula empregada em nosso trabalho foi capaz de estimular a intensa produção de IFN- α de células dendríticas plasmocitóides. Como IFN- α parece ser regulado por IL-2 e modulado por CV (Stylianou et al. 2001, Donhauser et al. 2012), a supressão sustentada da viremia provavelmente levou à recuperação desta função nos pacientes com CVI. As concentrações de outras citocinas (TNF- α , IL-4, IL-5, IL-10 e TGF- β 1) não diferiram entre os grupos de pacientes.

Quanto à resposta celular estimulada por fitohemaglutinina (PHA), os pacientes apresentaram proliferação de células T e produção de citocinas, como IFN- γ e TNF- α , equivalentes aos controles, sendo que a concentração de IL-5 foi mais alta em pacientes com CVI que em controles. Estudos da era pré-TARVc relataram redução da proliferação e da produção de citocinas frente à PHA, que foram parcialmente recuperadas com TARVc (Resino et al. 2002a, Reuben et al. 2002, Resino et al. 2003, Resino et al. 2004a). Assim, percebemos que os pacientes aqui descritos, mesmo sem supressão da viremia, passaram por um processo de reconstituição imunológica.

Em nosso trabalho, não encontramos associação entre idade e proliferação ou produção de citocinas frente ao estímulo de HIV. Da mesma forma, um estudo com crianças sob TARVc que suprimiram a viremia mostrou que a proliferação de linfócitos T frente às proteínas p24, p17, gp120 e gp41 não foi correlacionada à CV, sendo detectada em mais de uma ocasião ao longo do tempo (Palma et al. 2008). Por outro lado, Feeney et al. mostram que a proliferação ao antígeno p24 do HIV foi ausente ou reduzida em crianças menores de cinco anos de idade.

As categorias clínicas e imunológicas (CDC 1994) não estiveram associadas com os números de linfócitos B de memória, a resposta humoral às vacinas, a resposta celular ao HIV e à PHA, o que sugere que as antigas classificações instauradas em uma era pré-TARV não refletem mais a situação dos pacientes, como era visto em estudos anteriores (De Milito et al. 2001, Resino et al. 2002a, Lima et al. 2004).

Interessantemente, os maiores valores absolutos de linfócitos B de memória foram observados nos pacientes com CV indetectável (CVI) com menor idade à introdução de TARVc. Além disso, a proliferação e produção de IFN- γ e IL-2 específicas para o HIV se

correlacionaram com a duração da TARVc que promoveu a supressão da viremia nos pacientes com CVI. Ainda, em pacientes virêmicos, maior concentração de anti-HBs e magnitude de proliferação foram associados com menor idade à introdução de TARV. Na literatura, a introdução precoce de TARVc e o seu uso prolongado foram associados com a restauração da frequência de células B de memória, maior frequência de linfócitos CD4 produtoras de IL-2 e IFN- γ específicos ao HIV e melhor resposta humoral para tétano, sarampo e sorotipos de pneumococo (Abzug et al. 2006, Kapogiannis et al. 2006, Viganò et al. 2006, Pensieroso et al 2009). A realização precoce do diagnóstico e da administração de TARVc na infecção vertical ao HIV foram capazes de reduzir a disseminação viral, preservando o sistema imunológico de forma quantitativa e qualitativa (Luzuriaga et al. 2000, Viganò et al. 2006), o que nós confirmamos, neste trabalho, quanto à imunidade adaptativa específica ao HIV, à hepatite B e à rubéola. Estudos longitudinais possibilitarão maior esclarecimento do desenvolvimento da imunidade adaptativa dos pacientes com infecção vertical pelo HIV em uso precoce e prolongado de TARVc.



6- CONCLUSÃO

Após análise dos resultados deste trabalho, pôde-se concluir que:

1. Os pacientes pediátricos com infecção vertical pelo HIV com replicação viral prolongada (apesar do uso de TARVc) apresentaram contagens de linfócitos T CD4⁺, T CD8⁺, B total e B de memória similares às que foi encontrada em pacientes com supressão sustentada da viremia de HIV-1.
2. O sistema B encontrou-se com números absolutos dos linfócitos B total e de memória semelhantes aos dos controles saudáveis, diferentemente do sistema T, que apresentou diferenças quanto ao número absoluto de linfócitos T, T CD4⁺ e T CD8⁺. Contudo, alterações significativas na concentração de imunoglobulinas IgA, IgM e IgG foram observadas nos pacientes pediátricos infectados pelo HIV-1, mesmo sob TARVc prolongada.
3. Na infecção crônica por HIV-1, mesmo após anos de uso de TARVc, houve número reduzido de respondedores para as vacinas de rubéola, hepatite B e difteria em relação ao encontrado em controles saudáveis.
4. O controle sustentado da viremia de HIV-1 esteve associado a maiores títulos de anticorpos anti-hepatite B e anti-rubéola, a um melhor desenvolvimento ou manutenção de resposta proliferativa e produção de citocinas IL-2 e IFN- α frente ao HIV-1, sugerindo diferenças entre os grupos de pacientes quanto à sinalização e à cooperação celular.

5. A TARVc precocemente introduzida esteve associada a maiores valores absolutos de linfócitos B de memória, maiores títulos de anticorpos anti-hepatite B e maior proliferação de linfócitos T e produção de IFN- γ e IL-2 HIV-1 específicos.



7- REFERÊNCIAS

Referências citadas

Abzug MJ, Pelton SI, Song LY, Fenton T, Levin MJ, Nachman SA, et al. Immunogenicity, safety, and predictors of response after a pneumococcal conjugate and pneumococcal polysaccharide vaccine series in human immunodeficiency virus-infected children receiving highly active antiretroviral therapy. *Pediatr Infect Dis J*. 2006 Oct;25(10):920-9.

Abzug MJ, Warshaw M, Rosenblatt HM, Levin MJ, Nachman SA, Pelton SI, et al. Immunogenicity and immunologic memory after hepatitis B virus booster vaccination in HIV-infected children receiving highly active antiretroviral therapy. *J Infect Dis*. 2009 Sep 15;200(6):935-46.

Alarcón JO, Freimanis-Hance L, Krauss M, Reyes MF, Cardoso CA, Mussi-Pinhata MM, et al. Opportunistic and other infections in HIV-infected children in Latin America compared to a similar cohort in the United States. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2012 Mar;28(3):282-8.

Alfano M, Poli G. Role of cytokines and chemokines in the regulation of innate immunity and HIV infection. *Mol Immunol*. 2005 Feb;42(2):161-82.

Alfonzo MA, Diaz A, Siciliano L, López MG, Hung A. (2012) Functional state of CD4+ and CD8+ T lymphocytes and their role in the slow progression of HIV infection in pediatric patients. *J Pediatr (Rio J)* 88: 161-168.

Alsina L, Noguera-Julian A, Fortuny C. Impaired cellular immune response to tetanus toxoid but not to cytomegalovirus in effectively HAART-treated HIV-infected children. *Vaccine* 2013 May 7;31(20):2417-9.

Amaral E, Assis-Gomes F, Milanez H, Cecatti JG, Vilela MM, Pinto e Silva JL. Implementação oportuna de intervenções para reduzir a transmissão vertical do HIV: uma experiência brasileira bem-sucedida. *Rev Panam Salud Publica*. 2007;21(6):357–64.

Ananworanich J, Apornpong T, Kosalaraksa P, Jaimulwong T, Hansudewechakul R, Pancharoen C, et al. Characteristics of lymphocyte subsets in HIV-infected, long-term nonprogressor, and healthy Asian children through 12 years of age. *J Allergy Clin Immunol*. 2010 Dec;126(6):1294-301.

Anselmi A, Vendrame D, Rampon O, Giaquinto C, Zanchetta M, De Rossi A. Immune reconstitution in human immunodeficiency virus type 1-infected children with different virological responses to anti-retroviral therapy. *Clin Exp Immunol*. 2007 Dec;150(3):442-50.

Argüello RJ, Balbaryski J, Barboni G, Candi M, Gaddi E, Laucella S. Altered frequency and phenotype of CD4+ forkhead box protein 3+ T cells and its association with autoantibody production in human immunodeficiency virus-infected paediatric patients. *Clin Exp Immunol*. 2012 May;168(2):224-33.

Arrode G, Finke JS, Zebroski H, Siegal FP, Steinman RM. CD8+ T cells from most HIV-1-infected patients, even when challenged with mature dendritic cells, lack functional recall memory to HIV gag but not other viruses. *Eur J Immunol*. 2005 Jan;35(1):159-70.

Aurpibul L, Puthanakit T, Sirisanthana T, Sirisanthana V. Persistence of measles, mumps, and rubella protective antibodies 3 years after revaccination in HIV-infected children receiving antiretroviral therapy. *Clin Infect Dis*. 2010 May 15;50(10):1415-8.

Aurpibul L, Puthanakit T, Sirisanthana T, Sirisanthana V. Response to measles, mumps, and rubella revaccination in HIV-infected children with immune recovery after highly active antiretroviral therapy. *Clin Infect Dis*. 2007 Sep 1;45(5):637-42.

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

Badolato R, Ghidini C, Facchetti F, Serana F, Sottini A, Chiarini M, et al. Type I interferon-dependent gene MxA in perinatal HIV-infected patients under antiretroviral therapy as marker for therapy failure and blood plasmacytoid dendritic cells depletion. *J Transl Med* 2008;6:49.

Badolato R, Ghidini C, Facchetti F, Serana F, Sottini A, Chiarini M, et al. Type I interferon-dependent gene MxA in perinatal HIV-infected patients under antiretroviral therapy as marker for therapy failure and blood plasmacytoid dendritic cells depletion. *J Transl Med*. 2008 Sep 9;6:49.

Bailey CL, Smith V, Sands M. Hepatitis B vaccine: a seven-year study of adherence to the immunization guidelines and efficacy in HIV-1-positive adults. *Int J Infect Dis*. 2008 Nov;12(6):e77-83.

Bailey J, Blankson JN, Wind-Rotolo M, Siliciano RF. Mechanisms of HIV-1 escape from immune responses and antiretroviral drugs. *Curr Opin Immunol*. 2004 Aug;16(4):470-6.

Ballan WM, Vu BA, Long BR, Loo CP, Michaëlsson J, Barbour JD, et al. Natural killer cells in perinatally HIV-1-infected children exhibit less degranulation compared to

HIV-1-exposed uninfected children and their expression of KIR2DL3, NKG2C, and NKp46 correlates with disease severity. *J Immunol.* 2007 Sep 1;179(5):3362-70.

Bamji M, Thea DM, Weedon J, Krasinski K, Matheson PB, Thomas P, et al. Prospective study of human immunodeficiency virus 1-related disease among 512 infants born to infected women in New York City. *Pediatr Infect Dis J* 1996;15(10):891-8.

Barnhart HX, Caldwell MB, Thomas P, Mascola L, Ortiz I, Hsu HW, et al. Natural history of human immunodeficiency virus disease in perinatally infected children: an analysis from the Pediatric Spectrum of Disease Project. *Pediatrics* 1996;97(5):710-6.

Bekker V, Scherpbier H, Pajkrt D, Jurriaans S, Zaaijer H, Kuijpers TW, et al. Persistent humoral immune defect in highly active antiretroviral therapy-treated children with HIV-1 infection: loss of specific antibodies against attenuated vaccine strains and natural viral infection. *Pediatrics.* 2006 Aug;118(2):e315-22.

Bernasconi NL, Traggiai E, Lanzavecchia A. Maintenance of serological memory by polyclonal activation of human memory B cells. *Science.* 2002 Dec 13;298(5601):2199-202.

Blanche S, Tardieu M., Duliege A, Rouzioux C, Le Deist F, Fukunaga K, et al. Longitudinal study of 94 symptomatic infants with perinatally acquired human immunodeficiency virus infection. Evidence for a bimodal expression of clinical and biological symptoms. *Am J Dis Child* 1990;144(11):1210-5.

Borkowsky W, Rigaud M, Krasinski K, Moore T, Lawrence R & Pollack H, et al. Cell-mediated and humoral immune responses in children infected with human immunodeficiency virus during the first four years of life. *J Pediatr* 1992;120(3):371-5.

Borkowsky W, Zhan MX, Chen SH, Ilmet T, Kaul A, et al. (2004) Correlation between HIV-Specific CD8 cell production of interferon-gamma and plasma levels of HIV RNA in perinatally infected pediatric populations. *J Infect Dis* 190: 722-726.

Borkowsky W, Zhan MX, Chen SH, Ilmet T, Kaul A. (2004) Correlation between HIV-Specific CD8 cell production of interferon-gamma and plasma levels of HIV RNA in perinatally infected pediatric populations. *J Infect Dis* 190: 722-726.

Borrow P, Bhardwaj N. Innate immune responses in primary HIV-1 infection. *Curr Opin HIV AIDS*. 2008 Jan;3(1):36-44.

Brito AM, Castilho EA, Szwarcwald CL. AIDS e infecção pelo HIV no Brasil: uma epidemia multifacetada. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2001 Mar-Apr;34(2):207-17.

Bunupuradah T, Puthanakit T, Kosalaraksa P, Kerr S, Boonrak P, Prasitsuebsai W, et al. Immunologic and virologic failure after first-line NNRTI-based antiretroviral therapy in Thai HIV-infected children. *AIDS Res Ther*. 2011 Oct 26;8:40.

Buseyne F, Scott-Algara D, Bellal N, Burgard M, Rouzioux C, Blanche S, et al. The frequency of HIV-specific interferon- gamma -producing CD8 T cells is associated with both age and level of antigenic stimulation in HIV-1-infected children. *J Infect Dis*. 2005 Nov 15;192(10):1781-6.

Buseyne F, Scott-Algara D, Parrot F, Corre B, Bellal N, Burgard M, et al. Frequencies of ex vivo-activated human immunodeficiency virus type 1-specific gamma-interferon-producing CD8+ T cells in infected children correlate positively with plasma viral load. *J Virol*. 2002 Dec;76(24):12414-22.

Cagigi A, Palma P, Nilsson A, Di Cesare S, Pensieroso S, Kakoulidou M, et al. The impact of active HIV-1 replication on the physiological age-related decline of immature-transitional B-cells in HIV-1 infected children. *AIDS*. 2010 Aug 24;24(13):2075-80.

Cao W, Jamieson BD, Hultin LE, Hultin PM, Detels R. Regulatory T cell expansion and immune activation during untreated HIV type 1 infection are associated with disease progression. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2009 Feb;25(2):183-91.

Carvalho AP, Tonelli E. Avaliação imunológica em 60 crianças com AIDS. *J. pediatr. (Rio J.)*;75(3):172-80, maio-jun. 1999.

Castilho E & Chequer P. A epidemia de AIDS no Brasil. In: Ministério da Saúde. Simpósio Satélite: A epidemia de AIDS no Brasil – situação e tendências. Brasília, 1997. Disponível no site www.aids.gov.br

Centers For Disease Control And Prevention. Classification system for human immunodeficiency virus (HIV) infection in children under 13 years of age. *MMWR* 1987;36:225-35.

Centers For Diseases Control And Prevention. Revised classification system for Human Immunodeficiency Virus infection in children less than 13 years of age. *MMWR* 1994;3:1-10.

Chakraborty R, Morel AS, Sutton JK, Appay V, Ripley RM, Dong T, et al. Correlates of delayed disease progression in HIV-1-infected Kenyan children. *J Immunol*. 2005 Jun 15;174(12):8191-9.

Chakraborty R. HIV-1 infection in children: a clinical and immunologic overview. *Curr HIV Res*. 2005 Jan;3(1):31-41.

Chavan S, Bennuri B, Kharbanda M, Chandrasekaran A, Bakshi S, Pahwa S. Evaluation of T cell receptor gene rearrangement excision circles after antiretroviral therapy in children infected with human immunodeficiency virus. *J Infect Dis.* 2001 May 15;183(10):1445-54.

Ching N, Deville JG, Nielsen KA, Ank B, Wei LS, Sim MS, et al. Cellular and humoral immune responses to a tetanus toxoid booster in perinatally HIV-1-infected children and adolescents receiving highly active antiretroviral therapy (HAART). *Eur J Pediatr.* 2007 Jan;166(1):51-6.

Chong Y, Ikematsu H, Kikuchi K, Yamamoto M, Murata M, Nishimura M, et al. Selective CD27+ (memory) B cell reduction and characteristic B cell alteration in drug-naive and HAART-treated HIV type 1-infected patients. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2004 Feb;20(2):219-26.

Connor EM, Sperling RS, Gelber R, Kiselev P, Scott G, O'Sullivan MJ, et al. Reduction of maternal-infant transmission of human immunodeficiency virus type 1 with zidovudine treatment. Pediatric AIDS Clinical Trials Group Protocol 076 Study Group. *N Engl J Med* 1994;331(18):1173-80.

Correa R, Harari A, Vallelian F, Resino S, Munoz-Fernandez MA, et al (2007) Functional patterns of HIV-1-specific CD4 T-cell responses in children are influenced by the extent of virus suppression and exposure. *AIDS* 21: 23-30.

Costa NM, Albuquerque Md, Lins JB, Alvares-Junior JT, Stefani MM. Delayed-type hypersensitivity skin test responses to PPD and other antigens among BCG-vaccinated HIV-1-infected and healthy children and adolescents. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2011 Oct;44(5):542-5.

Cotugno N, Douagi I, Rossi P, Palma P. Suboptimal immune reconstitution in vertically HIV infected children: a view on how HIV replication and timing of HAART initiation can impact on T and B-cell compartment. *Clin Dev Immunol*. 2012;2012:805151.

Cruz MLS, Freimanis Hance L, Korelitz J, Aguilar A, Byrne J, Serchuck LK, et al. Characteristics of HIV infected adolescents in Latin America: results from the NISDI pediatric study. *J Trop Pediatr*. 2011 Jun;57(3):165-72.

Da Silva MTN, Centeville M, Tani SM, Toro AADC, Rossi C, Vilela MMS, et al. Serum immunoglobulins in children perinatally exposed to human immunodeficiency virus. *J Pediatr (Rio J)*. 2001 May-Jun; 77(3): 209-18.

De Milito A, Mörch C, Sönnnerborg A, Chiodi F. Loss of memory (CD27) B lymphocytes in HIV-1 infection. *AIDS*. 2001 May 25;15(8):957-64.

De Milito A. B lymphocyte dysfunctions in HIV infection. *Curr HIV Res*. 2004 Jan;2(1):11-21.

De Rossi A, Walker AS, Klein N, De Forni D, King D, Gibb DM. Increased thymic output after initiation of antiretroviral therapy in human immunodeficiency virus type 1-infected children in the Paediatric European Network for Treatment of AIDS (PENTA) 5 Trial. *J Infect Dis*. 2002 Aug 1;186(3):312-20.

Departamento de Doenças Sexualmente Transmissíveis, AIDS e Hepatites Virais, Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde 2012. AIDS no Brasil. Brasília, dezembro de 2012. (2012a)

Departamento de Doenças Sexualmente Transmissíveis, AIDS e Hepatites Virais, Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde 2012. Política Brasileira de

enfrentamento da AIDS: resultados, avanços e perspectivas. Brasília, 2012, páginas 1-14. (2012b).

Departamento de Doenças Sexualmente Transmissíveis, AIDS e Hepatites Virais, Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde 2012. Relatório de Progresso da Resposta Brasileira ao HIV/AIDS (2010-2011). Brasil, junho de 2012. (2012c).

Departamento de Doenças Sexualmente Transmissíveis, AIDS e Hepatites Virais, Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde 2010. Recomendações para profilaxia da transmissão vertical do HIV e terapia antirretroviral em gestantes. Brasília, 2010, Série Manuais número 46.

Desai S, Chaparro A, Liu H, Haslett P, Arheart K, Scott G, et al. Impaired CCR7 expression on plasmacytoid dendritic cells of HIV-infected children and adolescents with immunologic and virologic failure. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2007 Aug 15;45(5):501-7.

Donhauser N, Pritschet K, Helm M, Harrer T, Schuster P, et al. (2012) Chronic immune activation in HIV-1 infection contributes to reduced interferon alpha production via enhanced CD40:CD40 ligand interaction. *PLoS One* 7: e33925.

Doria-Rose NA, Connors M. Antibody-secreting B cells in HIV infection. *Curr Opin HIV AIDS*. 2009 Sep;4(5):426-30.

D'Orsogna LJ, Krueger RG, McKinnon EJ, French MA. Circulating memory B-cell subpopulations are affected differently by HIV infection and antiretroviral therapy. *AIDS*. 2007 Aug 20;21(13):1747-52.

Douek DC, Koup RA, McFarland RD, Sullivan JL, Luzuriaga K. Effect of HIV on thymic function before and after antiretroviral therapy in children. *J Infect Dis.* 2000 Apr;181(4):1479-82.

Dyer WB, Zaunders JJ, Yuan FF, Wang B, Learmont JC, Geczy AF, et al. Mechanisms of HIV non-progression; robust and sustained CD4+ T-cell proliferative responses to p24 antigen correlate with control of viraemia and lack of disease progression after long-term transfusion-acquired HIV-1 infection. *Retrovirology* 2008;5:112.

Ernesto AS, Lemos RM, Huehara MI, Morcillo AM, Dos Santos Vilela MM, Silva MT. Usefulness of pharmacy dispensing records in the evaluation of adherence to antiretroviral therapy in Brazilian children and adolescents. *Braz J Infect Dis.* 2012 Jul-Aug;16(4):315-20.

Essajee SM, Kim M, Gonzalez C, Rigaud M, Kaul A, Chandwani S, et al. Immunologic and virologic responses to HAART in severely immunocompromised HIV-1-infected children. *AIDS.* 1999 Dec 24;13(18):2523-32.

Farquhar C, Wamalwa D, Selig S, John-Stewart G, Mabuka J, Majiwa M, et al. Immune responses to measles and tetanus vaccines among Kenyan human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-infected children pre- and post-highly active antiretroviral therapy and revaccination. *Pediatr Infect Dis J.* 2009 Apr;28(4):295-9.

Feeney ME, Draenert R, Roosevelt KA, Pelton SI, McIntosh K, et al. (2003) Reconstitution of virus-specific CD4 proliferative responses in pediatric HIV-1 infection. *J Immunol* 171: 6968-6975.

Feiterna-Sperling C, Weizsaecker K, Bühner C, Casteleyn S, Loui A, Schmitz T, et al. Hematologic effects of maternal antiretroviral therapy and transmission prophylaxis in

HIV-1-exposed uninfected newborn infants. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2007 May 1;45(1):43-51.

Fernandes SJ, Silhessarenko N, Souto FJ. Effects of vertical HIV infection on the persistence of anti-HBs after a schedule of three doses of recombinant hepatitis B vaccine. *Vaccine.* 2008 Feb 20;26(8):1032-7.

Flynn PM, Cunningham CK, Rudy B, Wilson CM, Kapogiannis B, Worrell C, et al. Hepatitis B vaccination in HIV-infected youth: a randomized trial of three regimens. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2011 Apr;56(4):325-32.

Fogli M, Torti C, Malacarne F, Fiorentini S, Albani M, Izzo I, et al. Emergence of exhausted B cells in asymptomatic HIV-1-infected patients naïve for HAART is related to reduced immune surveillance. *Clin Dev Immunol.* 2012;2012:829584.

Foster C, Fidler S. Optimizing Antiretroviral Therapy in Adolescents with Perinatally Acquired HIV-1 Infection. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2010 Dec;8(12):1403-16.

Freguja R, Gianesin K, Mosconi I, Zanchetta M, Carmona F, Rampon O, et al. Regulatory T cells and chronic immune activation in human immunodeficiency virus 1 (HIV-1)-infected children. *Clin Exp Immunol.* 2011 Jun;164(3):373-80.

Funk MB, Buchholz B, Notheis G. Disease progression in HIV-1 infected children and adolescents - results of a German-Austrian cohort study. *Eur J Med Res* 2008; 18;13(8):371-8.

Futterman DC. HIV in adolescents and young adults: half of all new infections in the United States. *Top HIV Med.* 2005 Aug-Sep;13(3):101-5.

Gaines H, Andersson L, Biberfeld G (1996) A new method for measuring lymphoproliferation at the single-cell level in whole blood cultures by flow cytometry. *J Immunol Methods* 195: 63-72.

Gallagher K, Gorre M, Harawa N, Dillon M, Wafer D, Stiehm ER et al. Timing of lymphocyte activation in neonates infected with human immunodeficiency virus. *Clin Diagn Lab Immunol* 1997;4(6):742-7.

Ghosh S, Feyen O, Jebran AF, Huck K, Jetzek-Zader M, Bas M, et al. Memory B cell function in HIV-infected children-decreased memory B cells despite ART. *Pediatr Res.* 2009 Aug;66(2):185-90.a

Gonçales Júnior FL, Pedro RJ, Branchini ML, Ramos MC, da Silva LJ, Andrade LAA, et al. Infecção pelo *Pneumocystis carinii* em indivíduo adulto homossexual com imunodeficiência: a propósito de um caso. *Rev Pau Med* 1983;101(4):160-4.

Groot F, Van Capel TM, Kapsenberg ML, Berkhout B, de Jong EC. Opposing roles of blood myeloid and plasmacytoid dendritic cells in HIV-1 infection of T cells: transmission facilitation versus replication inhibition. *Blood.* 2006 Sep 15;108(6):1957-64.

Guillén S, García San Miguel L, Resino S, Bellón JM, González I, Jiménez de Ory S, et al. Opportunistic infections and organ-specific diseases in HIV-1-infected children: a cohort study (1990-2006). *HIV Med.* 2010 Apr;11(4):245-52.

Hainaut M, Verscheure V, Ducarme M, Schandené L, Levy J, et al. (2011) Cellular immune responses in human immunodeficiency virus (HIV)-1-infected children: is immune restoration by highly active anti-retroviral therapy comparable to non-progression? *Clin Exp Immunol* 165: 77-84.

Hardy G, Worrell S, Hayes P, Barnett CM, Glass D, Pido-Lopez J, et al. Evidence of thymic reconstitution after highly active antiretroviral therapy in HIV-1 infection. *HIV Med.* 2004 Mar;5(2):67-73.

Hawkins D, Blott M, Clayden P, De Ruiter A, Foster G, Gilling-Smith C, et al. on behalf of the BHIVA Guidelines Writing Committee. Guidelines for the management of HIV infection in pregnant women and the prevention of mother-to-child transmission of HIV. *HIV Med* 2005;6(Suppl. 2):107-148.

Hendriksen CF, van der Gun JW, Kreeftenberg JG. Combined estimation of tetanus and diphtheria antitoxin in human sera by the in vitro Toxin-Binding Inhibition (ToBI) test. *J Biol Stand.* 1989 Apr;17(2):191-200.

Huang S, Dunkley-Thompson J, Tang Y, Macklin EA, Steel-Duncan J, Singh-Minott I, et al. Deficiency of HIV-Gag-specific T cells in early childhood correlates with poor viral containment. *J Immunol.* 2008 Dec 1;181(11):8103-11.

Iwajomo OH, Finn A, Moons P, Nkhata R, Sepako E, Ogunniyi AD, et al. Deteriorating pneumococcal-specific B-cell memory in minimally symptomatic African children with HIV infection. *J Infect Dis.* 2011 Aug 15;204(4):534-43.

Jacobsen MC, Thiébaud R, Fisher C, Sefe D, Clapson M, Klein N, Baxendale HE. Pediatric human immunodeficiency virus infection and circulating IgD+ memory B cells. *J Infect Dis.* 2008 Aug 15;198(4):481-5.

Jaspan HB, Lawn SD, Safrit JT, Bekker LG. The maturing immune system: implications for development and testing HIV-1 vaccines for children and adolescents. *AIDS* 2006 Feb 28;20(4):483-94.

Jelicic K, Cimbri R, Nawaz F, Huang DW, Zheng X, Yang J, Lempicki RA, Pascuccio M, Van Ryk D, Schwing C, Hiatt J, Okwara N, Wei D, Roby G, David A, Hwang IY, Kehrl JH, Arthos J, Cicala C, Fauci AS. The HIV-1 envelope protein gp120 impairs B cell proliferation by inducing TGF- β 1 production and FcRL4 expression. *Nat Immunol*. 2013 Oct 27.

Joint United Nations Programme on HIV/AIDS (UNAIDS). Global report: UNAIDS report on the global AIDS epidemic 2012. WHO Library Cataloguing-in Publication Data, 2012.

Joshi VV. Pathology of acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) in children. *Keio J Med* 1996;45(4):306-12.

Kapogiannis BG, Henderson SL, Nigam P, Sharma S, Chennareddi L, et al. (2006) Defective IL-2 production by HIV-1-specific CD4 and CD8 T cells in an adolescent/young adult cohort. *AIDS Res Hum Retroviruses* 22: 272-282.

Khaitan A, Unutmaz D. Revisiting Immune Exhaustion during HIV Infection. *Curr HIV/AIDS Rep*. 2011 Mar; 8(1): 4–11.

Klein MR, Van Baalen CA, Holwerda AM, Kerkhof Garde SR, Bende RJ, Keet IP, et al. 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(4):1365-72.

Kolte L, Ryder LP, Albrecht-Beste E, Jensen FK, Nielsen SD. HIV-infected patients with a large thymus maintain higher CD4 counts in a 5-year follow-up study of patients treated with highly active antiretroviral therapy. *Scand J Immunol* 2009;70(6):608-13.

Kolte L. Thymic function in HIV-infection. *Dan Med J*. 2013 Apr;60(4):B4622.

Kourtis AP. Prevention of perinatal HIV transmission: current status and future developments in anti-retroviral therapy. *Drugs* 2002;62(15):2213-20.

Küppers R. Human memory B cells: memory B cells of a special kind. *Immunol Cell Biol.* 2008 Nov-Dec;86(8):635-6.

Lambert JS, Moye JR J, Plaeger SF, Stiehm ER, Bethel J, Mofenson LM, et al. Association of selected markers of lymphocyte activation and differentiation with perinatal Human Immunodeficiency Virus transmission and infant infection. *Clin Diagn Lab Immunol* 2005;12(5):622-31.

Lao-araya M, Puthanakit T, Aulpibul L, Sirisanthana T, Sirisanthana V. Antibody response to hepatitis B re-vaccination in HIV-infected children with immune recovery on highly active antiretroviral therapy. *Vaccine.* 2007 Jul 20;25(29):5324-9.

Lao-araya M, Puthanakit T, Aulpibul L, Taecharoenkul S, Sirisanthana T, Sirisanthana V. Prevalence of protective level of hepatitis B antibody 3 years after revaccination in HIV-infected children on antiretroviral therapy. *Vaccine.* 2011 May 23;29(23):3977-81.

Lee JC, Boechat MI, Belzer M, Church JA, De Ville J, Nielsen K, et al. Thymic volume, T-cell populations, and parameters of thymopoiesis in adolescent and adult survivors of HIV infection acquired in infancy. *AIDS.* 2006 Mar 21;20(5):667-74.

Levesque MC, Moody MA, Hwang KK, Marshall DJ, Whitesides JF, Amos JD, Gurley TC, Allgood S, Haynes BB, Vandergrift NA, Plonk S, Parker DC, Cohen MS, Tomaras GD, Goepfert PA, Shaw GM, Schmitz JE, Eron JJ, Shaheen NJ, Hicks CB, Liao HX, Markowitz M, Kelsoe G, Margolis DM, Haynes BF. Polyclonal B cell differentiation

and loss of gastrointestinal tract germinal centers in the earliest stages of HIV-1 infection. PLoS Med. 2009 Jul 7;6(7):e1000107.

Levin MJ, Gershon AA, Weinberg A, Blanchard S, Nowak B, Palumbo P, et al. Immunization of HIV-infected children with varicella vaccine. J Pediatr. 2001 Aug;139(2):305-10.

Levin MJ, Gershon AA, Weinberg A, Song LY, Fentin T, Nowak B Pediatric AIDS Clinical Trials Group 265 Team. Administration of live varicella vaccine to HIV-infected children with current or past significant depression of CD4+ T cells. J Infect Dis. 2006 Jul 15;194(2):247-55.

Li D, Xu XN. NKT cells in HIV-1 infection. Cell Res. 2008 Aug;18(8):817-22.

Lima M, De Menezes Succi RC, Nunes Dos Santos AM, Weckx LY, De Moraes-Pinto MI. Rubella immunization in human immunodeficiency virus type 1-infected children: cause for concern in vaccination strategies. Pediatr Infect Dis J. 2004 Jul;23(7):604-7.

Lodha R, Upadhyay A, Kapoor V, Kabra SK. Clinical profile and natural history of children with HIV infection. Indian J Pediatr. 2006 Mar;73(3):201-4.

Luzuriaga K, McManus M, Catalina M, Mayack S, Sharkey M. (2000) Early therapy of vertical human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection: control of viral replication and absence of persistent HIV-1-specific immune responses. J Virol 74: 6984-6991.

Zanchetta M, Anselmi A, Vendrame D, et al. Early therapy in HIV-1-infected children: effect on HIV-1 dynamics and HIV-1-specific immune response. Antiviral Therapy, vol. 13, no. 1, pp. 47–55, 2008

Malaspina A, Moir S, Kottlil S, Hallahan CW, Ehler LA, Liu S, et al. Deleterious effect of HIV-1 plasma viremia on B cell costimulatory function. *J Immunol.* 2003 Jun 15;170(12):5965-72.

Malek TR (2008) The biology of interleukin-2. *Annu Rev Immunol* 26: 453-479.

Marcovistz R, Matos DC, Georgini RA, Sakauchi D. Potency control of diphtheria component in adsorbed vaccines by in vitro neutralization tests. *Biologicals.* 2002 Jun;30(2):105-12.

Marón G, Gaur AH, Flynn PM. Antiretroviral therapy in HIV-infected infants and children. *Pediatr Infect Dis J.* 2010 Apr;29(4):360-3.

Masur H, Michelis MA, Greene JB, Onorato I, Stouwe RA, Holzman RS, et al. An outbreak of community acquired *Pneumocystis carinii* pneumonia: initial manifestation of cellular immune dysfunction. *N Engl J Med* 1985;305(24):1431-8.

Mc Gowan JP, Shah SS. Prevention of perinatal HIV transmission during pregnancy. *J. Antimicrob. Chemother.* 2000;46 (5): 657-668.

Mehta N, Cunningham CK, Flynn P, Pepe J, Obaro S, Kapogiannis BG, et al. Impaired generation of hepatitis B virus-specific memory B cells in HIV infected individuals following vaccination. *Vaccine.* 2010 May 7;28(21):3672-8.

Melvin AJ, Mohan KM. Response to immunization with measles, tetanus, and Haemophilus influenzae type b vaccines in children who have human immunodeficiency virus type 1 infection and are treated with highly active antiretroviral therapy. *Pediatrics.* 2003 Jun;111(6 Pt 1):e641-4.

Mena G, Llupià A, García-Basteiro AL, Díez C, León A, García F, et al. Assessing the immunological response to hepatitis B vaccination in HIV-infected patients in clinical practice. *Vaccine*. 2012 May 21;30(24):3703-9.

Micheloud D, Álvaro-Meca A, Jensen J, Díaz A, Resino S. Trend of pneumonia incidence among children infected with HIV in the era of highly active antiretroviral therapy. *Pediatr Infect Dis J*. 2012 Jun;31(6):599-601

Miller MA, Rathore MH. Immunization in special populations. *Adv Pediatr*. 2012;59(1):95-136.

Ministério da Saúde, Brasil. Boletim epidemiológico DST - AIDS. Brasília, 2005. Disponível no site: www.aids.gov.br

Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico AIDS DST. Brasília, Ano IX nº1, junho de 2012.

Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Ministério da Saúde. Portaria nº44, 23 de outubro de 2012.

Ministério da Saúde. Guia de Tratamento: Recomendações para Terapia Antirretroviral em crianças e adolescentes infectados pelo HIV. Brasília, 2009, Série Manuais número 85.

Moir S, Buckner CM, Ho J, Wang W, Chen J, Waldner AJ, et al. B cells in early and chronic HIV infection: evidence for preservation of immune function associated with early initiation of antiretroviral therapy. *Blood*. 2010 Dec 16;116(25):5571-9.

Moir S, Ho J, Malaspina A, Wang W, DiPoto AC, O'Shea MA, et al. Evidence for HIV-associated B cell exhaustion in a dysfunctional memory B cell compartment in HIV-infected viremic individuals. *J Exp Med*. 2008 Aug 4;205(8):1797-805. (2008a)

Moir S, Malaspina A, Ho J, Wang W, Dipoto AC, O'Shea MA, et al. Normalization of B cell counts and subpopulations after antiretroviral therapy in chronic HIV disease. *J Infect Dis.* 2008 Feb 15;197(4):572-9. (2008b)

Moir S, Ogwaro KM, Malaspina A, Vasquez J, Donoghue ET, Hallahan CW, et al. Perturbations in B cell responsiveness to CD4+ T cell help in HIV-infected individuals. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 May 13;100(10):6057-62.

Montesano C, Anselmi A, Palma P, Bernardi S, Cicconi R, et al. (2010) HIV replication leads to skewed maturation of CD8-positive T-cell responses in infected children. *New Microbiol* 33: 303-309.

Montoya CJ, Toro MF, Aguirre C, Bustamante A, Hernandez M, Arango LP, et al. Abnormal humoral immune response to influenza vaccination in pediatric type-1 human immunodeficiency virus infected patients receiving highly active antiretroviral therapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2007 Jun;102(4):501-8.

Morais JC, Machado M, Biasoli I, Barroso PF, Milito C, Spector N. Changing patterns of AIDS: impact on the indications and diagnostic yield of bone marrow biopsies. *Braz J Infect Dis.* 2010 Jul-Aug;14(4):419-21.

Munier ML & Kelleher AD. Acutely dysregulated, chronically disabled by the enemy within: T-cell responses to HIV-1 infection. *Immunol Cell Biol* 2007;85(1):6-15.

Musoke PM & Miro FA. Prevention of HIV mother to child transmission: a review. *AIDS Rev* 2000;2:263-74.

Mutwa PR, Boer KR, Rusine JB, Muganga N, Tuyishimire D, Reiss P, et al. Hepatitis B virus prevalence and vaccine response in HIV-infected children and adolescents on

combination antiretroviral therapy in Kigali, Rwanda. *Pediatr Infect Dis J*. 2013 Mar;32(3):246-51.

Myers C, Posfay-Barbe KM, Aebi C, Cheseaux JJ, Kind C, Rudin C, et al. Pediatric Infectious Disease Group of Switzerland (PIGS); Swiss Mother and Child HIV Cohort Study (MoCHIV). Determinants of vaccine immunity in the cohort of human immunodeficiency virus-infected children living in Switzerland. *Pediatr Infect Dis J*. 2009 Nov;28(11):996-1001.

Nagase H, Agematsu K, Kitano K, Takamoto M, Okubo Y, Komiyama A, Sugane K. Mechanism of hypergammaglobulinemia by HIV infection: circulating memory B-cell reduction with plasmacytosis. *Clin Immunol*. 2001 Aug;100(2):250-9.

Navarro J, Resino S, Bellón JM, Abad ML, Gurbindo D, Fernández-Cruz E, et al. Association of CD8+ T lymphocyte subsets with the most commonly used markers to monitor HIV type 1 infection in children treated with highly active antiretroviral therapy. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2001 Apr 10;17(6):525-32.

Norris PJ & Rosenberg ES. Cellular immune response to human immunodeficiency virus. *AIDS* 2001;15 Suppl 2:S16-21.

Obaro SK, Pugatch D, Luzuriaga K. Immunogenicity and efficacy of childhood vaccines in HIV-1-infected children. *Lancet Infect Dis* 2004;4:510-18.

Ometto L, De Forni D, Patiri F, Trouplin V, Mammano F, Giacomet V, et al. Immune reconstitution in HIV-1-infected children on antiretroviral therapy: role of thymic output and viral fitness. *AIDS*. 2002 Apr 12;16(6):839-49.

Pahwa R, McCloskey TW, Aroniadis OC, Strbo N, Krishnan S, Pahwa S. CD8+ T cells in HIV disease exhibit cytokine receptor perturbation and poor T cell receptor

activation but are responsive to gamma-chain cytokine-driven proliferation. *J Infect Dis.* 2006 Mar 15;193(6):879-87.

Pallikkuth S, Pilakka Kanthikeel S, Silva SY, Fischl M, Pahwa R, Pahwa S. Upregulation of IL-21 receptor on B cells and IL-21 secretion distinguishes novel 2009 H1N1 vaccine responders from nonresponders among HIV-infected persons on combination antiretroviral therapy. *J Immunol.* 2011 Jun 1;186(11):6173-81.

Palma P, Romiti ML, Cancrini C, Pensieroso S, Montesano C, et al. (2008) Delayed early antiretroviral treatment is associated with an HIV-specific long-term cellular response in HIV-1 vertically infected infants. *Vaccine* 26: 5196-5201.

Patel A, Trivedi SS, Chudasama RK, Patel PK. Effect of antiretroviral therapy on clinical and immunologic disease progression in HIV positive children: One-year follow-up study. *J Family Community Med.* 2012 Sep;19(3):178-83.

Paul ME, Shearer WT, Kozinetz CA, Lewis DE. Comparison of CD8(+) T-cell subsets in HIV-infected rapid progressor children versus non--rapid progressor children. *J Allergy Clin Immunol.* 2001 Aug;108(2):258-64.

Pensieroso S, Cagigi A, Palma P, Nilsson A, Capponi C, Freda E, et al. Timing of HAART defines the integrity of memory B cells and the longevity of humoral responses in HIV-1 vertically-infected children. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009 May 12;106(19):7939-44.

Pessoa SD, Miyamoto M, Ono E, Gouvêa AF, de Moraes-Pinto MI, Succi RC. Persistence of vaccine immunity against hepatitis B virus and response to revaccination in vertically HIV-infected adolescents on HAART. *Vaccine.* 2010 Feb 10;28(6):1606-12.

Peterman TA, Drotman DP, Curran JW. Epidemiology of the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). *Epidemiol Rev* 1985;7:1-21.

Pippi F, Bracciale L, Stolzuoli L, Giaccherini R, Montomoli E, Gentile C, et al. Serological response to hepatitis B virus vaccine in HIV-infected children in Tanzania. *HIV Med.* 2008 Aug;9(7):519-25.

Pittis MG, Prada F, Mangano A, Pérez L, Sternik G, Redondo J, et al. Monocyte phagolysosomal fusion in children born to human immunodeficiency virus-infected mothers. *Pediatr Infect Dis J.* 1997 Jan;16(1):24-8.

Plaeger-Marshall S, Isacescu V, O'rourke S, Bertolli J, Bryson YJ & Stiehm ER. T cell activation in pediatric AIDS pathogenesis: three-color immunophenotyping. *Clin Immunol Immunopathol* 1994;71(1):19-26.

Poles MA, Barsoum S, Yu W, Yu J, Sun P, Daly J, et al. Human immunodeficiency virus type 1 induces persistent changes in mucosal and blood gammadelta T cells despite suppressive therapy. *J Virol.* 2003 Oct;77(19):10456-67.

Pollack H, Zhan MX, Ilmet-Moore T, Ajuang-Simbiri K, Krasinski K, Borkowsky W. Ontogeny of anti-human immunodeficiency virus (HIV) antibody production in HIV-1-infected infants. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993 Mar 15;90(6):2340-4.

Porichis F, Kaufmann DE. HIV-specific CD4 T cells and immune control of viral replication. *Curr Opin HIV AIDS.* 2011 May;6(3):174-80.

Potsch DV, Camacho LA, Tuboi S, Villar LM, Miguel JC, Ginuino C, Silva EF, Mendonça RM, Moreira RB, Barroso PF. Vaccination against hepatitis B with 4-double doses increases response rates and antibodies titers in HIV-infected adults. *Vaccine.* 2012 Sep 7;30(41):5973-7.

Puissant-Lubrano B, Combadière B, Duffy D, Wincker N, Frachette MJ, Ait-Mohand H, et al. Influence of antigen exposure on the loss of long-term memory to childhood vaccines in HIV-infected patients. *Vaccine*. 2009 Jun 2;27(27):3576-83.

Qiao X, He B, Chiu A, Knowles DM, Chadburn A, Cerutti A. Human immunodeficiency virus 1 Nef suppresses CD40-dependent immunoglobulin class switching in bystander B cells. *Nat Immunol*. 2006 Mar;7(3):302-10.

Rainwater-Lovett K, Moss WJ. Immunologic basis for revaccination of HIV-infected children receiving HAART. *Future Virol*. 2011 Jan 1;6(1):59-71.

Ramos AN, Matida LH, Hearst N, Heukelbach J. AIDS in Brazilian children: history, surveillance, antiretroviral therapy, and epidemiologic transition, 1984-2008. *AIDS Patient Care STDS*. 2011 Apr;25(4):245-55.

Rath BA, von Kleist M, Castillo ME, Kolevic L, Caballero P, Soto-Castellares G, et al. Antiviral resistance and correlates of virologic failure in the first cohort of HIV-infected children gaining access to structured antiretroviral therapy in Lima, Peru: a cross-sectional analysis. *BMC Infect Dis*. 2013 Jan 2;13:1.

Resino S, Abad ML, Bellón JM, Gurbindo D, León JA, Muñoz-Fernández MA. Variación del perfil inmunológico en función de la progresión de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana en niños tratados con terapia antirretroviral. *Med Clin (Barc)*. 2002b Mar 2;118(7):241-6.

Resino S, Bellón JM, Gurbindo MD, Muñoz-Fernández MA. CD38 expression in CD8+ T cells predicts virological failure in HIV type 1-infected children receiving antiretroviral therapy. *Clin Infect Dis*. 2004b Feb 1;38(3):412-7.

Resino S, Correa R, Bellón JM, Muñoz-Fernández MA (2003) Preserved immune system in long-term asymptomatic vertically HIV-1 infected children. *Clin Exp Immunol* 132 :105-112.

Resino S, Correa R, Bellón JM, Sánchez-Ramón S, Muñoz-Fernández MA (2002a) Characterizing immune reconstitution after long-term highly active antiretroviral therapy in pediatric AIDS. *AIDS Res Hum Retroviruses* 18: 1395-1406.

Resino S, Galán I, Pérez A, León JA, Seoane E. (2004a) HIV-infected children with moderate/severe immune-suppression: changes in the immune system after highly active antiretroviral therapy. *Clin Exp Immunol* 137: 570–577.

Resino S, Resino R, Maria Bellón J, Micheloud D, Gutiérrez MD, de José MI, et al. Spanish Group of Pediatric HIV Infection. Clinical outcomes improve with highly active antiretroviral therapy in vertically HIV type-1-infected children. *Clin Infect Dis*. 2006a Jul 15;43(2):243-52.

Resino S, Seoane E, Pérez A, Ruiz-Mateos E, Leal M. (2006b) Different profiles of immune reconstitution in children and adults with HIV-infection after highly active antiretroviral therapy. *BMC Infect Dis* 6: 112.

Reuben JM, Lee BN, Paul M, Kline MW, Cron SG, et al. (2002) Magnitude of IFN-gamma production in HIV-1-infected children is associated with virus suppression. *J Allergy Clin Immunol* 110: 255-261.

Rey D, Krantz V, Partisani M, Schmitt MP, Meyer P, Libbrecht E, et al. Increasing the number of hepatitis B vaccine injections augments anti-HBs response rate in HIV-infected patients. Effects on HIV-1 viral load. *Vaccine*. 2000 Jan 18;18(13):1161-5.

Rigaud M, Borkowsky W, Muresan P. Impaired immunity to recall antigens and neoantigens in severely immunocompromised children and adolescents during the first year of effective highly active antiretroviral therapy. *J Infect Dis* 2008; Oct 15;198(8):1123-30.

Robinson JL, Lee BE. Prevention of perinatal transmission of HIV infection. *CMAJ* 2000;163(7):831-2.

Rosenberg ES, Billingsley JM, Caliendo AM, Boswell SL, Sax PE, Kalams SA, et al. Vigorous HIV-1-specific CD4⁺ T cell responses associated with control of viremia. *Science* 1997;278(5342):1447-50.

Rosenblatt HM, Song LY, Nachman SA, Stanley KE, Krogstad PA, Johnson GM, et al. Tetanus immunity after diphtheria, tetanus toxoids, and acellular pertussis vaccination in children with clinically stable HIV infection. *J Allergy Clin Immunol.* 2005 Sep;116(3):698-703.

Rossio JL, Esser MT, Suryanarayana K, Schneider DK, Bess JW Jr, et al. (1998) Inactivation of human immunodeficiency virus type 1 infectivity with preservation of conformational and functional integrity of virion surface proteins. *J Virol* 72: 7992-8001.

Ruffin N, Thang PH, Rethi B, Nilsson A, Chiodi F. The impact of inflammation and immune activation on B cell differentiation during HIV-1 infection. *Front Immunol.* 2012 Jan 5;2:90.

Saitoh A, Singh KK, Sandall S, Powell CA, Fenton T, Fletcher CV, et al. Association of CD4⁺ T-lymphocyte counts and new thymic emigrants in HIV-infected children during successful highly active antiretroviral therapy. *J Allergy Clin Immunol.* 2006 Apr;117(4):909-15.

Sandberg JK, Fast NM, Jordan KA, Furlan SN, Barbour JD, Fennelly G, et al. HIV-specific CD8+ T cell function in children with vertically acquired HIV-1 infection is critically influenced by age and the state of the CD4+ T cell compartment. *J Immunol.* 2003 Apr 15;170(8):4403-10.

Sandberg JK, Fast NM, Palacios EH, Fennelly G, Dobroszycki J, Palumbo P, et al. Selective loss of innate CD4(+) V alpha 24 natural killer T cells in human immunodeficiency virus infection. *J Virol.* 2002 Aug;76(15):7528-34.

Sassé T, Wu J, Zhou L, Saksena NK. Monocytes and their Role in Human Immunodeficiency Virus Pathogenesis. *Am J Infect Dis.* 2012;8(2):92-105.

Schiavi MSR, Scrigni A, García Arrigoni P, Bologna R, Barboni G, Redondo J, et al. Tratamiento antirretroviral de gran actividad en niños VIH positivos. Evolución de la enfermedad relacionada con parámetros clínicos, inmunológicos y virológicos al comienzo del tratamiento. *Arch Argent Pediatr.* 2009 Jun;107(3):212-20.

Schuelter-Trevisol F, Kuehlkamp VM, Biudes MF, Galato D. Mother-to-child transmission of HIV in Brazil: universal access to free antiretroviral therapy. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2012 Jul 1;60(3):e103-4.

Sciaranghella G, Tong N, Mahan AE, Suscovich TJ, Alter G. Decoupling activation and exhaustion of B cells in spontaneous controllers of HIV infection. *AIDS.* 2013 Jan 14;27(2):175-80.

Scott C, Grover D, Nelson M. Is there a role for etravirine in patients with Nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor resistance? *AIDS.* 2008 May 11;22(8):989-90.

Scott P, Moss WJ, Gilani Z, Low N. Measles vaccination in HIV-infected children: systematic review and meta-analysis of safety and immunogenicity. *J Infect Dis.* 2011 Jul;204 Suppl 1:S164-78.

Scott ZA, Beaumier CM, Sharkey M, Stevenson M, Luzuriaga K (2003) HIV-1 replication increases HIV-specific CD4+ T cell frequencies but limits proliferative capacity in chronically infected children. *J Immunol* 170: 5786-5792.

Scott ZA, Chadwick EG, Gibson LL, Catalina MD, McManus MM, Yogev R, et al. Infrequent detection of HIV-1-specific, but not cytomegalovirus-specific, CD8(+) T cell responses in young HIV-1-infected infants. *J Immunol.* 2001 Dec 15;167(12):7134-40.

Sharp ER, Willberg CB, Kuebler PJ, Abadi J, Fennelly GJ, et al. (2011) Immunodominance of HIV-1 specific CD8+ T-cell responses is related to disease progression rate in vertically infected adolescents. *PLoS One* 6: e21135.

Shearer WT, Quinn TC, LaRussa P, Lew JF, Mofenson L, Almy S, et al. Viral load and disease progression in infants infected with human immunodeficiency virus type 1. Women and Infants Transmission Study Group. *N Engl J Med.* 1997 May 8;336(19):1337-42.

Simmons RP, Scully EP, Groden EE, Arnold KB, Chang JJ, et al. (2013) HIV-1 infection induces strong production of IP-10 through TLR7/9-dependent pathways. *AIDS* 27: 2505-2517.

Siriaksorn S, Puthanakit T, Sirisanthana T, Sirisanthana V. Prevalence of protective antibody against hepatitis B virus in HIV-infected children with immune recovery after highly active antiretroviral therapy. *Vaccine.* 2006 Apr 12;24(16):3095-9.

Sonobe MH, Trezena AG, Guilhen FB, Takano VL, Fratelli F, Sakauchi D, et al. Determination of low tetanus or diphtheria antitoxin titers in sera by a toxin neutralization assay and a modified toxin-binding inhibition test. *Braz J Med Biol Res.* 2007 Jan;40(1):69-76.

Souza Matos DC, Marcovistz R, Cabello PH, Georgini RA, Sakauchi D, da Silva LL, et al. Immunogenicity test of tetanus component in adsorbed vaccines by toxin binding inhibition test. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2002 Sep;97(6):909-13.

Sperling RS, Shapiro DE, Coombs RW, Todd JA, Herman SA, Mcsherry GD, et al. Maternal viral load, zidovudine treatment, and the risk of transmission of human immunodeficiency virus type 1 from mother to infant. *Pediatric AIDS Clinical Trials Group Protocol 076 Study Group. N Engl J Med* 1996;335(22):1621-9.

Spiegel HM, Chandwani R, Sheehy ME, Dobroszycki J, Fennelly G, Wiznia A, et al. The impact of early initiation of highly active antiretroviral therapy on the human immunodeficiency virus type 1-specific CD8 T cell response in children. *J Infect Dis.* 2000 Jul;182(1):88-95.

Spiegel HM, DeFalcon E, Ogg GS, Larsson M, Beadle TJ, Tao P, et al. Changes in frequency of HIV-1-specific cytotoxic T cell precursors and circulating effectors after combination antiretroviral therapy in children. *J Infect Dis.* 1999 Aug;180(2):359-68.

Ssewanyana I, Baker CA, Ruel T, Bousheri S, Kanya M, Dorsey G, et al. The Distribution and Immune Profile of T Cell Subsets in HIV-Infected Children from Uganda. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2009 Jan;25(1):65-71.

Stylianou E, Aukrust P, Müller F, Nordøy I, Frøland SS (2001) Complex effects of interferon-alpha on the cytokine network in HIV infection - possible contribution to immunosuppression. *Cytokine* 14: 56-62.

Succi RCM, Grupo de Estudos da Sociedade Brasileira de Pediatria para Avaliar a Transmissão Materno Infantil do HIV. Mother-to-child transmission of HIV in Brazil during the years 2000 and 2001: results of a multi-centric study. *Cad Saúde Pública* 2007;23(Sup 3):S379-89.

Sutcliffe CG, Moss WJ. Do children infected with HIV receiving HAART need to be revaccinated? *Lancet Infect Dis.* 2010 Sep;10(9):630-42.

Tardei G, Duiculescu D, Capo C, Diaconu CC, Mutiu A, Mege JL, et al. Phagocytic function of monocytes in children with human immunodeficiency virus type 1 infection. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2000 Mar;7(2):296-7.

Tejiokem MC, Gouandjika I, Béniguel L, Zanga MC, Tene G, Gody JC, et al. HIV-infected children living in Central Africa have low persistence of antibodies to vaccines used in the Expanded Program on Immunization. *PLoS One.* 2007 Dec 5;2(12):e1260.

Tess BH, Rodrigues LC, Newell ML, Dunn DT & Lago TD. Breastfeeding, genetic, obstetric and other risk factors associated with mother-to-child transmission of HIV-1 in Sao Paulo State, Brazil. São Paulo Collaborative Study for Vertical Transmission of HIV-1. *AIDS* 1998;12(5):513-20.

Than S, Hu R, Oyaizu N, Romano J, Wang X, Sheikh S, et al. Cytokine pattern in relation to disease progression in human immunodeficiency virus-infected children. *J Infect Dis.* 1997 Jan;175(1):47-56.

The United Nations Children's Fund (UNICEF), World Health Organization (WHO), Joint United Nations Programme on HIV/AIDS (UNAIDS). Promovendo a Utilização Racional de Medicamentos e a Administração Correta de Casos nos Serviços Básicos de Saúde. A Prescrição, 1998.

Thobakgale CF, Ramduth D, Reddy S, Mkhwanazi N, de Pierres C. (2007) Human immunodeficiency virus-specific CD8+ T-cell activity is detectable from birth in the majority of in utero-infected infants. *J Virol* 81: 12775-12784.

Thobakgale CF, Streeck H, Mkhwanazi N, Mncube Z, Maphumulo L, Chonco F, et al. Short communication: CD8(+) T cell polyfunctionality profiles in progressive and nonprogressive pediatric HIV type 1 infection. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2011 Sep;27(9):1005-12.

Titanji K, Chiodi F, Bellocco R, Schepis D, Osorio L, Tassandin C, Tambussi G, Grutzmeier S, Lopalco L, De Milito A. Primary HIV-1 infection sets the stage for important B lymphocyte dysfunctions. *AIDS*. 2005 Nov 18;19(17):1947-55.

Titanji K, De Milito A, Cagigi A, Thorstensson R, Grützmeier S, Atlas A, et al. Loss of memory B cells impairs maintenance of long-term serologic memory during HIV-1 infection. *Blood*. 2006 Sep 1;108(5):1580-7.

Turkova A, Webb RH, Lyall H. When to start, what to start and other treatment controversies in pediatric HIV infection. *Paediatr Drugs*. 2012 Dec 1;14(6):361-76.

Usuga X, Montoya CJ, Landay AL, Rugeles MT. Characterization of quantitative and functional innate immune parameters in HIV-1-infected Colombian children receiving stable highly active antiretroviral therapy. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2008 Dec 1;49(4):348-57.

Van Rossum AMC, Scherpbier HJ, Van Lochem EG, Pakker NG, Sliker WA, et al. Therapeutic immune reconstitution in HIV-1-infected children is independent of their age and pretreatment immune status. *AIDS* 2001;15:2267–75.

Vermelho LL, Silva LP, Costa AJL. Coordenação Nacional de DST - AIDS. Ministério da Saúde, Brasil. Epidemiologia da Transmissão Vertical do HIV no Brasil. 1999. Disponível no site: www.saude.gov.br

Viganò A, Trabattoni D, Schneider L, Ottaviani F, Aliffi A. (2006) Failure to eradicate HIV despite fully successful HAART initiated in the first days of life. *J Pediatr* 148: 389-391.

Vrisekoop N, van Gent R, de Boer AB, Otto SA, Borleffs JC. (2008) Restoration of the CD4 T cell compartment after long-term highly active antiretroviral therapy without phenotypical signs of accelerated immunological aging. *J Immunol* 181: 1573-1581.

Walker AS, Doerholt K, Sharland M, Gibb DM; Collaborative HIV Paediatric Study (CHIPS) Steering Committee (2004) Response to highly active antiretroviral therapy varies with age: the UK and Ireland Collaborative HIV Paediatric Study. *AIDS* 18: 1915-1924.

Wasik TJ, Wierzbicki A, Whiteman VE, Trinchieri G, Lischner HW, Kozbor D. Association between HIV-specific T helper responses and CTL activities in pediatric AIDS. *Eur J Immunol*. 2000 Jan;30(1):117-27.

Watanaveeradej V, Samakoses R, Kerdpanich A, Aree C, Nitayabhan S, Viputtikul K, et al. Antibody response to hepatitis B vaccine in infants of HIV-positive mothers. *Int J Infect Dis* 2002;6:240-1.

Wei F, Zhong S, Ma Z, Kong H, Medvec A, Ahmed R, et al. Strength of PD-1 signaling differentially affects T-cell effector functions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Jul 2;110(27):E2480-9.

Weinberg A, Dickover R, Britto P, Hu C, Patterson-Bartlett J, et al. (2008) Continuous improvement in the immune system of HIV-infected children on prolonged antiretroviral therapy. *AIDS* 22: 2267-2277.

Weinberg A, Huang S, Fenton T, Patterson-Bartlett J, Gona P, Read JS, Dankner WM, Nachman S; IMPAACT P1008 Team. Virologic and immunologic correlates with the magnitude of antibody responses to the hepatitis A vaccine in HIV-infected children on highly active antiretroviral treatment. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2009 Sep 1;52(1):17-24.

Weinberg A, Pott GB (2003) Immunity to human immunodeficiency virus (HIV) in children with chronic HIV infection receiving highly active antiretroviral therapy. *Clin Diagn Lab Immunol* 10: 821-825.

World Health Organization (WHO). HIV/AIDS Fact sheet number 360. Updated June 2013.

World Health Organization. Diphtheria vaccine: WHO position paper. *Wkly Epidemiol Rec* 2006 Jan;81(3):24-32. (2006b)

World Health Organization. Hepatitis B vaccines: WHO position paper. *Wkly Epidemiol Rec* 2009 Oct;84(40):405-419.

World Health Organization. Rubella vaccines: WHO position paper. *Wkly Epidemiol Rec* 2011 Jul;86(29):301-316.

World Health Organization. Tetanus vaccine: WHO position paper. *Wkly Epidemiol Rec* 2006 May;81(20):198-208. (2006a)

Zaccarelli-Filho CA, Ono E, Machado DM, Brunialti M, Succi RC, Salomão R, et al. HIV-1-infected children on HAART: immunologic features of three different levels of viral suppression. *Cytometry B Clin Cytom.* 2007 Jan 15;72(1):14-21.

Zhang Z, Jiang Y, Zhang M, Shi W, Liu J, Han X, et al. Relationship of frequency of CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells with disease progression in antiretroviral-naive HIV-1 infected Chinese. *Jpn J Infect Dis.* 2008 Sep;61(5):391-2.

Zhang Z, Zhao QX, Fu JL, Yao JX, He Y, Jin L, et al. Characteristics of HIV-1-specific CD8 T-cell responses and their role in loss of viremia in children chronically infected with HIV-1 undergoing highly active antiretroviral therapy. *Chin Med J (Engl).* 2006 Dec 5;119(23):1949-57.



8- ANEXOS E APÊNDICES

CEP, 29/08/08.
(Grupo III)

PARECER CEP: Nº 638/2008 (Este nº deve ser citado nas correspondências referente a este projeto)
CAAE: 0513.0.146.000-08

I - IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “**INFLUÊNCIA DA EXPOSIÇÃO E INFEÇÃO PELO VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA NA INTERAÇÃO ENTRE CELULAS DENDRÍTICAS E LINFÓCITOS T⁺**”.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Taís Nitsch Mazzola

INSTITUIÇÃO: Centro de Investigação em Pediatria / FCM / UNICAMP

APRESENTAÇÃO AO CEP: 11/08/2008

APRESENTAR RELATÓRIO EM: 26/08/09 (O formulário encontra-se no *site* acima)

II - OBJETIVOS

Analisar a influência e exposição vertical ao HIV na interação entre a resposta inata e celular para o HIV em pacientes pediátricos.

III - SUMÁRIO

É um estudo transversal, em filhos de mulheres infectadas com HIV, recrutados no Ambulatório de Imunodeficiência Secundária na Pediatria do Hospital das Clínicas da UNICAMP. Participarão lactentes expostos verticalmente ao HIV, infectados ou não, e crianças com até 10 anos de idade sem status de infecção. Lactentes e crianças de mães soronegativas para HIV, serão recrutados como controles no Ambulatório de Pediatria e Unidades Básicas de Saúde de Campinas.*Os critérios de inclusão e exclusão estão claros. Para a pesquisa será necessária a coleta de 20 ml de sangue das crianças.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

A pesquisa tem objetivos claros e deve contribuir de modo decisivo para o conhecimento da infecção pelo HIV e a influência desta patologia no desenvolvimento do sistema imunológico em crianças expostas e sem infecção. O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido é claro e adequado, é pesquisa com financiamento pelo CNPq.

Quanto á exposição de risco aos sujeitos, o fato de coletar 20 ml de sangue em crianças com idade e peso pequenos pode representar dificuldades técnicas da própria coleta de sangue, expondo as crianças á dor e também pode aumentar o risco de anemia, uma vez que um recém-nascido tem 80 ml de sangue por quilo de peso. Para um bebê de 3 kg, tem 240 ml de sangue e 24 ml é quase 10% de sua volemia.

Deste modo poderia ser definida uma faixa etária para esta coleta de sangue, em que as crianças fossem maiores, com mais peso (portanto com mais sangue) para diminuir a risco de anemia, e também para facilitar a coleta dos 20 ml de sangue.

A pesquisadora não definiu tamanho da amostra

V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96 e suas complementares, manifesta-se por aguardar o atendimento às questões acima para emissão do seu parecer final.

SITUAÇÃO: projeto com pendências

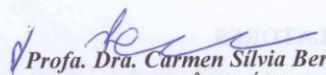
- ✓ *** As pendências deverão ser respondidas preferencialmente no prazo de 10 dias, a partir da data de envio pelo CEP/FCM.**
- ✓ **A resposta deve ser encaminhada pelo Protocolo da FCM em envelope fechado e acompanhado por fora do Formulário de Encaminhamento de Outros Documentos, disponível no site do CEP.**
- ✓ **Projetos de Grupo II e III deverão vir em 01 via e de Grupo I em 02 vias.**

* Quando após **60 dias** de ter recebido um parecer pendente, o pesquisador não se manifestar quanto aos quesitos apresentados pelo CEP em seu parecer o projeto será considerado retirado e posteriormente havendo interesse, deverá ser apresentado novo protocolo e reiniciado o processo de registro (Res. CNS 196/96).

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

VI - DATA DA REUNIÃO

VIII Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 26 de agosto de 2008.


Prof. Dra. Carmen Sílvia Bertuzzo
PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP



CEP, 18/09/08.
(Grupo III)

PARECER CEP: Nº 638/2008 (Este nº deve ser citado nas correspondências referente a este projeto)
CAAE: 0513.0.146.000-08

I - IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “INFLUÊNCIA DA EXPOSIÇÃO E INFECÇÃO PELO VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA NA INTERAÇÃO ENTRE CELULAS DENDRÍTICAS E LINFÓCITOS T”.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Tais Nitsch Mazzola

INSTITUIÇÃO: Centro de Investigação em Pediatria / FCM / UNICAMP

APRESENTAÇÃO AO CEP: 11/08/2008

APRESENTAR RELATÓRIO EM: 26/08/09 (O formulário encontra-se no *site* acima)

II - OBJETIVOS

Analisar a influência e exposição vertical ao HIV na interação entre a resposta inata e celular para o HIV em pacientes pediátricos.

III - SUMÁRIO

É um estudo transversal, em filhos de mulheres infectadas com HIV, recrutados no Ambulatório de Imunodeficiência Secundária na Pediatria do Hospital das Clínicas da UNICAMP. Participarão lactentes expostos verticalmente ao HIV, infectados ou não, e crianças com até 10 anos de idade sem status de infecção. Lactentes e crianças de mães soronegativas para HIV, serão recrutados como controles no Ambulatório de Pediatria e Unidades Básicas de Saúde de Campinas. Os critérios de inclusão e exclusão estão claros. Para a pesquisa será necessária a coleta de 20 ml de sangue das crianças.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

Após respostas às pendências, o projeto encontra-se adequadamente redigido e de acordo com a Resolução CNS/MS 196/96 e suas complementares, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa, bem como ter aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa supracitada.



O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

VII - DATA DA REUNIÃO

Homologação VIII Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 26 de agosto de 2008.

Profa. Dra. Carmen Sílvia Bertuzzo
PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP



UNICAMP

CEP, 06/10/10
(Grupo III)

PARECER CEP: N° 876/2010 (Este n° deve ser citado nas correspondências referente a este projeto).
CAAE: 0679.0.146.000-10

I - IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: "INFECÇÃO CRÔNICA PELO HIV EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES: RESPOSTA INATA E ADAPTATIVA A PARTÍCULAS INATIVADAS DE HIV".
PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Maria Marluce dos Santos Vilela
INSTITUIÇÃO: CIPED/FCM/UNICAMP
APRESENTAÇÃO AO CEP: 13/09/2010

II - OBJETIVOS

Analisar a influência da infecção viral vertical pelo HIV na imunidade inata e adaptativa em pacientes pediátricos, utilizando partículas inativadas do HIV-1.

III - SUMÁRIO

Estudo transversal numa coorte de 150 crianças e adolescentes, com idade entre 5 a 18 anos, infectados pelo HIV, em tratamento no Ambulatório de Imunodeficiência Secundária da Pediatria do HC/UNICAMP; 30 pacientes serão convidados a participar do estudo, sendo 15 com carga viral de HIV-1 indetectável (controlados) e 15 com carga viral maior que 1000 cópias de RNA de HIV-1/mL (não controlados). De todos serão colhidos 100 mL de sangue periférico para realização de fenotipagens específicas, ensaios e culturas previstas no estudo.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

Projeto muito bem formulado, com objetivos claros, critérios de inclusão/exclusão bem definidos. O orçamento é alto, no entanto será solicitada verba à FAPESP.

Pendência: O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido deve ser reescrito atendendo ao disposto da Resolução CNS/MS 196/96 e as orientações do CEP/UNICAMP, disponível na *home Page* (<http://www.fcm.unicamp.br/fcm/pesquisa/comite-de-etica-em-pesquisa/instrucoes>).

V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96 e suas complementares, manifesta-se por aguardar o atendimento às questões acima para emissão do seu parecer final.

SITUAÇÃO: projeto com pendências

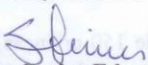
- ✓ *** As pendências deverão ser respondidas preferencialmente no prazo de 10 dias, a partir da data de envio pelo CEP/FCM.**
- ✓ **A resposta deve ser encaminhada pelo Protocolo da FCM em envelope fechado e acompanhado por fora do Formulário de Encaminhamento de Outros Documentos, disponível no *site* do CEP.**
- ✓ **Projetos de Grupo II e III deverão vir em 01 via e de Grupo I em 02 vias.**

* Quando após **60 dias** de ter recebido um parecer pendente, o pesquisador não se manifestar quanto aos quesitos apresentados pelo CEP em seu parecer o projeto será considerado retirado e posteriormente havendo interesse, deverá ser apresentado novo protocolo e reiniciado o processo de registro (Res.-CNS 196/96).

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

VI - DATA DA REUNIÃO

IX Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 28 de setembro de 2010.


Prof. Dr. Carlos Eduardo Steiner
PRESIDENTE do COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM/UNICAMP

CEP, 13/12/10
(Grupo III)

PARECER CEP: Nº 876/2010 (Este nº deve ser citado nas correspondências referente a este projeto).
CAAE: 0679.0.146.000-10

I - IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: "INFECÇÃO CRÔNICA PELO HIV EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES: RESPOSTA INATA E ADAPTATIVA A PARTÍCULAS INATIVADAS DE HIV".
PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Maria Marluce dos Santos Vilela
INSTITUIÇÃO: CIPED/FCM/UNICAMP
APRESENTAÇÃO AO CEP: 13/09/2010

II - OBJETIVOS

Analisar a influência da infecção viral vertical pelo HIV na imunidade inata e adaptativa em pacientes pediátricos, utilizando partículas inativadas do HIV-1.

III - SUMÁRIO

Estudo transversal numa coorte de 150 crianças e adolescentes, com idade entre 5 a 18 anos, infectados pelo HIV, em tratamento no Ambulatório de Imunodeficiência Secundária da Pediatria do HC/UNICAMP; 30 pacientes serão convidados a participar do estudo, sendo 15 com carga viral de HIV-1 indetectável (controlados) e 15 com carga viral maior que 1000 cópias de RNA de HIV-1/mL (não controlados). De todos serão colhidos 100 mL de sangue periférico para realização de fenotipagens específicas, ensaios e culturas previstas no estudo.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido de linguagem inacessível para os pacientes do Hospital das Clínicas/UNICAMP, com termos técnicos que não devem ser utilizados, além do fato que deve constar o que pode ocorrer uma coleta de sangue.

V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96 e suas complementares, manifesta-se por aguardar o atendimento às questões acima para emissão do seu parecer final.

SITUAÇÃO: projeto com pendências

✓ *** As pendências deverão ser respondidas preferencialmente no prazo de 10 dias, a partir da data de envio pelo CEP/FCM.**



- ✓ A resposta deve ser encaminhada pelo Protocolo da FCM em envelope fechado e acompanhado por fora do Formulário de Encaminhamento de Outros Documentos, disponível no *site* do CEP.
- ✓ Projetos de Grupo II e III deverão vir em 01 via e de Grupo I em 02 vias.

* Quando após 60 dias de ter recebido um parecer pendente, o pesquisador não se manifestar quanto aos quesitos apresentados pelo CEP em seu parecer o projeto será considerado retirado e posteriormente havendo interesse, deverá ser apresentado novo protocolo e reiniciado o processo de registro (Res. CNS 196/96).

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

VI - DATA DA REUNIÃO

IX Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 28 de setembro de 2010.

Carmen
Profa. Dra. Carmen Silvia Bertuzzo
VICE-PRESIDENTE do COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP



CEP, 14/02/11
(Grupo III)

PARECER CEP: Nº 876/2010 (Este nº deve ser citado nas correspondências referente a este projeto).
CAAE: 0679.0.146.000-10

I - IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: "INFECÇÃO CRÔNICA PELO HIV EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES: RESPOSTA INATA E ADAPTATIVA A PARTÍCULAS INATIVADAS DE HIV".
PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Maria Marluce dos Santos Vilela
INSTITUIÇÃO: CIPED/FCM/UNICAMP
APRESENTAÇÃO AO CEP: 13/09/2010
APRESENTAR RELATÓRIO EM: 14/02/12 (O formulário encontra-se no *site* acima).

II - OBJETIVOS

Analisar a influência da infecção viral vertical pelo HIV na imunidade inata e adaptativa em pacientes pediátricos, utilizando partículas inativadas do HIV-1.

III - SUMÁRIO

Estudo transversal numa coorte de 150 crianças e adolescentes, com idade entre 5 a 18 anos, infectados pelo HIV, em tratamento no Ambulatório de Imunodeficiência Secundária da Pediatria do HC/UNICAMP; 30 pacientes serão convidados a participar do estudo, sendo 15 com carga viral de HIV-1 indetectável (controlados) e 15 com carga viral maior que 1000 cópias de RNA de HIV-1/mL (não controlados). De todos serão colhidos 25 µL de sangue periférico para realização de fenotipagens específicas, ensaios e culturas previstas no estudo.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

Após respostas às pendências, o projeto encontra-se adequadamente redigido e de acordo com a Resolução CNS/MS 196/96 e suas complementares, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa, bem como ter aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa supracitada.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.



VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

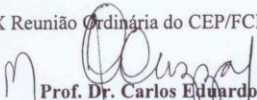
O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

VII- DATA DA REUNIÃO

Homologado na IX Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 28 de setembro de 2010.


Prof. Dr. Carlos Eduardo Steiner
PRESIDENTE do COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM/UNICAMP



CEP, 26/07/11.
(PARECER CEP: N° 876/2010)

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

www.fcm.unicamp.br/fcm/pesquisa

PARECER

I - IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: "INFECÇÃO CRÔNICA PELO HIV EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES: RESPOSTA INATA E ADAPTATIVA A PARTÍCULAS INATIVADAS DE HIV".

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Maria Marluce dos Santos Vilela.

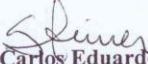
II - PARECER DO CEP.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP tomou ciência e aprovou a coleta de 15mL de sangue de controles saudáveis; a coleta, no máxima, 25 mL de crianças infectadas pelo HIV; o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para Crianças e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para Adolescentes, referente ao protocolo de pesquisa supracitado.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

III - DATA DA REUNIÃO.

Homologado na VII Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 26 de julho de 2011.


Prof. Dr. Carlos Eduardo Steiner
PRESIDENTE do COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP
Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126
Caixa Postal 6111
13083-887 Campinas - SP

FONE (019) 3521-8936
FAX (019) 3521-7187
cep@fcm.unicamp.br

Página 1 de 1



Centro de Investigação em Pediatria – CIPED
Faculdade de Ciências Médicas – FCM
Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP

Cidade Universitária Zeferino Vaz, Barão Geraldo, Campinas, SP
CEP 13083-970
Telefone: 19 3521-8989
www.unicamp.br

Campinas, 16 de abril de 2012.

Ao Ambulatório de Moléstias Infeciosas de Jundiaí:

Vimos por meio desta convidar o Ambulatório de Moléstias Infeciosas de Jundiaí, SP, para a participação no projeto intitulado “Infecção crônica pelo HIV em crianças e adolescentes: resposta inata e adaptativa a partículas inativadas de HIV”, por meio da inclusão de pacientes de seu centro de atendimento. O projeto está sob minha coordenação, sob financiamento da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e já foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Atenciosamente,

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "M. Vilela", written over a horizontal line.

Profª. Dra. Maria Marluce dos Santos Vilela

Professora Titular do Departamento de Pediatria

Coordenadora do Centro de Investigação em Pediatria (CIPED)

Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP

GITES, 17 de abril de 2012


Com. Nº 07/2012

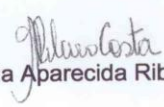
À Secretária Municipal de Saúde
Dra Tânia Regina Gasparini Botelho Pupo

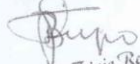
Referente: Participação do AMI no projeto de pesquisa: "Infecção crônica pelo HIV em crianças e adolescentes: resposta inata e adaptativa a partículas inativadas de HIV" da disciplina de Imunologia da UNICAMP

Informamos que se houver interesse do Ambulatório de Referência (AMI) não encontramos objeção a realização da mesma.

GITES / SMS


Enfº Leonard Sardinha Cabral


Dra Maria Aparecida Ribeiro da Costa

De acordo


Tânia Regina Gasparini Botelho Pupo
SECRETÁRIA MUNICIPAL DE SAÚDE
Av. Liberdade, s/nº - Jd. Botânico - Paço Municipal - 2º Andar - Ala Norte
Fones: (11) 4589-8799 / 4589-8879 - Fax: 4589-8855
e-mails: lcabral@jundiai.sp.gov.br, marcosta@jundiai.sp.gov.br

Jundiaí, 15 de maio de 2012

Ofício nº. 25/2012

À

Secretária Municipal de Saúde
Dr^a. Tânia Regina Gasparini Botelho Pupo


CC: Dr^a Maria Marluce dos Santos Vilela.


Referência: Trabalho de pesquisa da Universidade de Campinas.


A equipe de pediatria do Ambulatório de Moléstias Infecciosas entende a importância do projeto de pesquisa: "Infecção crônica pelo HIV em crianças e adolescentes resposta inata e adaptativa a partículas inativadas de HIV" e, aceita o convite da pesquisadora responsável Prof^a Dr^a Maria Marluce dos Santos Vilela participando do projeto por meio da inclusão de pacientes.

Estando cientes do projeto de pesquisa, bem como das condições que a secretaria de saúde de Jundiaí disponibiliza no momento, responsabilizando – se pelas orientações que se fizerem necessárias para os pacientes e seus responsáveis.

Atenciosamente,


Margarida M. Ferraz de Campos
Médica-Gerente do Amb. de M.I.


Eduardo Palandri
Médico Pediatra


Dorival Soares
Médico Pediatra

AMBULATÓRIO DE MOLÉSTIAS INFECTOCONTAGIOSAS
Rua Conde de Monsanto nº. 480 – Vianelo / Cep: 13.207-060 - Jundiaí – SP
Telefax: (11) 4586-8311 / Email: ami.sms@jundiai.sp.gov.br
CNPJ: 45.780.103/0001-50 – Inscrição Estadual: Isenta

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (para crianças infectadas por HIV)

Declaro, por livre e espontânea vontade, que permito a participação de _____, com registro hospitalar de nº _____ que se encontra sob responsabilidade de _____, com idade de _____ anos, com o RG de nº _____, residente na Rua _____,

cujo grau de parentesco é _____, na pesquisa intitulada “Infecção crônica pelo HIV em crianças e adolescentes: resposta inata e adaptativa a partículas inativadas de HIV”, promovida pelo Centro de Investigação em Pediatria, da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) da Unicamp, sob coordenação da Prof^a Dr^a Maria Marluce dos Santos Vilela. Esta pesquisa tem o objetivo de investigar como o organismo das crianças e dos adolescentes infectados pelo vírus da AIDS realiza as defesas contra esse vírus. Como o organismo da criança e do adolescente está em processo de desenvolvimento, é importante avaliar qualquer fraqueza nessa resposta de defesa que possa piorar a evolução da AIDS.

Atesto que recebi esclarecimentos quanto aos propósitos e procedimentos que serão realizados, tais como:

- a) entrevista para complementar a situação clínica atual do paciente;
- b) coleta de sangue de veia com seringa descartável pela enfermeira para realizar exames que medem a capacidade de defesa contra o vírus da AIDS.

Quanto aos riscos da coleta de sangue, recebi a informação de que ela causa dor pela picada da agulha e ansiedade. A coleta será realizada por profissional preparado e com agulha e seringa descartáveis somente em pacientes que não têm problemas de sangramentos. Dessa maneira, a coleta de sangue não traz riscos para o paciente.

Compreendo que minha participação é voluntária e que posso sair a qualquer momento do estudo, sem prejudicar ou influenciar os resultados. Autorizo a liberação dos dados obtidos aos pesquisadores, aos membros da comissão de ética e à comissão científica da FAPESP, assim como a publicação em revistas científicas especializadas e apresentação em congressos e jornadas científicas.

Não existem danos imediatos ou futuros previsíveis decorrentes da pesquisa, e, portanto a mesma não inclui a possibilidade de indenização. Estou ciente de que não receberei remuneração em troca da minha participação na pesquisa e que todas as informações não serão identificadas por nome, para garantir o absoluto sigilo. O pesquisador me garantiu que receberei esclarecimento a qualquer dúvida em relação aos assuntos relacionados à pesquisa, seja antes, durante ou após a realização da pesquisa. Fui informado de que receberei uma cópia deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

De acordo,

Responsável pelo Participante: _____

Prof^a Dr^a Maria Marluce dos Santos Vilela (telefone 19 3521-8963): _____

Campinas, ____ de _____ de _____.

Secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa:

Rua Tessália Vieira de Camargo, 126. Caixa Postal 6111, CEP 13083-887, Campinas, SP.

Telefone: 19-3521-8936

Fax: 19-3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (para adolescentes infectados por HIV)

Declaro, por livre e espontânea vontade, que eu, _____, com registro hospitalar de nº _____, sob responsabilidade de _____, com idade de _____ anos, com o RG de nº _____, residente na Rua _____,

cujo grau de parentesco comigo é _____, desejo participar da pesquisa intitulada “Infecção crônica pelo HIV em crianças e adolescentes: resposta inata e adaptativa a partículas inativadas de HIV”, promovida pelo Centro de Investigação em Pediatria, da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) da Unicamp, sob coordenação da Prof^a Dr^a Maria Marluce dos Santos Vilela. Esta pesquisa tem o objetivo de investigar como o organismo das crianças e dos adolescentes infectados pelo vírus da AIDS realiza as defesas contra esse vírus. Como o organismo da criança e do adolescente está em processo de desenvolvimento, é importante avaliar qualquer fraqueza nessa resposta de defesa que possa piorar a evolução da AIDS.

Atesto que recebi esclarecimentos quanto aos propósitos e procedimentos que serão realizados, tais como:

- a) entrevista para complementar a situação clínica atual do paciente;
- b) coleta de sangue de veia com seringa descartável pela enfermeira para realizar exames que medem a capacidade de defesa contra o vírus da AIDS.

Quanto aos riscos da coleta de sangue, recebi a informação de que ela causa dor pela picada da agulha e ansiedade. A coleta será realizada por profissional preparado e com agulha e seringa descartáveis somente em pacientes que não têm problemas de sangramentos. Dessa maneira, a coleta de sangue não traz riscos para o paciente.

Compreendo que minha participação é voluntária e que posso sair a qualquer momento do estudo, sem prejudicar ou influenciar os resultados. Autorizo a liberação dos dados obtidos aos pesquisadores, aos membros da comissão de ética e à comissão científica da FAPESP, assim como a publicação em revistas científicas especializadas e apresentação em congressos e jornadas científicas.

Não existem danos imediatos ou futuros previsíveis decorrentes da pesquisa, e, portanto a mesma não inclui a possibilidade de indenização. Estou ciente de que não receberei remuneração em troca da minha participação na pesquisa e que todas as informações não serão identificadas por nome, para garantir o absoluto sigilo. O pesquisador me garantiu que receberei esclarecimento a qualquer dúvida em relação aos assuntos relacionados à pesquisa, seja antes, durante ou após a realização da pesquisa. Fui informado de que receberei uma cópia deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

De acordo,

Responsável pelo Participante: _____

Participante: _____

Prof^a Dr^a Maria Marluce dos Santos Vilela (telefone 19 3521-8963): _____

Campinas, ____ de _____ de _____.

Secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa:

Rua Tessália Vieira de Camargo, 126. Caixa Postal 6111, CEP 13083-887, Campinas, SP.

Telefone: 19-3521-8936

Fax: 19-3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (para crianças saudáveis)

Declaro, por livre e espontânea vontade, que permito a participação de _____, com registro hospitalar de nº _____ que se encontra sob responsabilidade de _____, com idade de _____ anos, com o RG de nº _____, residente na Rua _____,

cujo grau de parentesco é _____, na pesquisa intitulada “Infecção crônica pelo HIV em crianças e adolescentes: resposta inata e adaptativa a partículas inativadas de HIV”, promovida pelo Centro de Investigação em Pediatria, da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) da Unicamp, sob coordenação da Prof^ª Dr^a Maria Marluce dos Santos Vilela. Esta pesquisa tem o objetivo de investigar como o organismo das crianças e dos adolescentes infectados pelo vírus da AIDS realiza as defesas contra esse vírus. Como o organismo da criança e do adolescente está em processo de desenvolvimento, é importante avaliar qualquer fraqueza nessa resposta de defesa que possa piorar a evolução da AIDS. Para isso, precisamos comparar sua defesa a de crianças saudáveis.

Atesto que recebi esclarecimentos quanto aos propósitos e procedimentos que serão realizados, tais como:

- a) entrevista para complementar a situação clínica atual do paciente;
- b) coleta de sangue de veia com seringa descartável pela enfermeira para realizar exames que medem a capacidade de defesa contra o vírus da AIDS.

Quanto aos riscos da coleta de sangue, recebi a informação de que ela causa dor pela picada da agulha e ansiedade. A coleta será realizada por profissional preparado e com agulha e seringa descartáveis somente em pacientes que não têm problemas de sangramentos. Dessa maneira, a coleta de sangue não traz riscos para o paciente.

Compreendo que minha participação é voluntária e que posso sair a qualquer momento do estudo, sem prejudicar ou influenciar os resultados. Autorizo a liberação dos dados obtidos aos pesquisadores, aos membros da comissão de ética e à comissão científica da FAPESP, assim como a publicação em revistas científicas especializadas e apresentação em congressos e jornadas científicas.

Não existem danos imediatos ou futuros previsíveis decorrentes da pesquisa, e, portanto a mesma não inclui a possibilidade de indenização. Estou ciente de que não receberei remuneração em troca da minha participação na pesquisa e que todas as informações não serão identificadas por nome, para garantir o absoluto sigilo. O pesquisador me garantiu que receberei esclarecimento a qualquer dúvida em relação aos assuntos relacionados à pesquisa, seja antes, durante ou após a realização da pesquisa. Fui informado de que receberei uma cópia deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

De acordo,

Responsável pelo Participante: _____

Prof^ª Dr^a Maria Marluce dos Santos Vilela (telefone 19 3521-8963): _____

Campinas, _____ de _____ de _____.

Secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa:

Rua Tessália Vieira de Camargo, 126. Caixa Postal 6111, CEP 13083-887, Campinas, SP.

Telefone: 19-3521-8936

Fax: 19-3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (para adolescentes saudáveis)

Declaro, por livre e espontânea vontade, que eu, _____, com registro hospitalar de no _____, sob responsabilidade de _____, com idade de _____ anos, com o RG de no _____, residente na Rua _____,

cujo grau de parentesco comigo é _____, desejo participar da pesquisa intitulada ““Infecção crônica pelo HIV em crianças e adolescentes: resposta inata e adaptativa a partículas inativadas de HIV”, promovida pelo Centro de Investigação em Pediatria, da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) da Unicamp, sob coordenação da Prof^a Dra Maria Marluce dos Santos Vilela. Esta pesquisa tem o objetivo de investigar como o organismo das crianças e dos adolescentes infectados pelo vírus da AIDS realiza as defesas contra esse vírus. Como o organismo da criança e do adolescente está em processo de desenvolvimento, é importante avaliar qualquer fraqueza nessa resposta de defesa que possa piorar a evolução da AIDS. Para isso, precisamos comparar sua defesa a de adolescentes saudáveis.

Atesto que recebi esclarecimentos quanto aos propósitos e procedimentos que serão realizados, tais como:

- a) entrevista para complementar a situação clínica atual do paciente;
- b) coleta de sangue de veia com seringa descartável pela enfermeira para realizar exames que medem a capacidade de defesa contra o vírus da AIDS.

Quanto aos riscos da coleta de sangue, recebi a informação de que ela causa dor pela picada da agulha e ansiedade. A coleta será realizada por profissional preparado e com agulha e seringa descartáveis somente em pacientes que não têm problemas de sangramentos. Dessa maneira, a coleta de sangue não traz riscos para o paciente.

Compreendo que minha participação é voluntária e que posso sair a qualquer momento do estudo, sem prejudicar ou influenciar os resultados. Autorizo a liberação dos dados obtidos aos pesquisadores, aos membros da comissão de ética e à comissão científica da FAPESP, assim como a publicação em revistas científicas especializadas e apresentação em congressos e jornadas científicas.

Não existem danos imediatos ou futuros previsíveis decorrentes da pesquisa, e, portanto a mesma não inclui a possibilidade de indenização. Estou ciente de que não receberei remuneração em troca da minha participação na pesquisa e que todas as informações não serão identificadas por nome, para garantir o absoluto sigilo. O pesquisador me garantiu que receberei esclarecimento a qualquer dúvida em relação aos assuntos relacionados à pesquisa, seja antes, durante ou após a realização da pesquisa. Fui informado de que receberei uma cópia deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

De acordo,

Responsável pelo Participante: _____

Participante: _____

Prof^a Dr^a Maria Marluce dos Santos Vilela (telefone 19 3521-8963): _____

Campinas, ____ de _____ de _____.

Secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa:

Rua Tessália Vieira de Camargo, 126. Caixa Postal 6111, CEP 13083-887, Campinas, SP.

Telefone: 19-3521-8936, Fax: 19-3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br

Atividades profissionais e acadêmicas durante o período do doutoramento

Experiência profissional

- De 12 de março de 2007 a 19 de junho de 2008: bióloga do Laboratório de Imunologia da Reprodução Barini & Souza Lima, em Campinas, SP.
- De 7 de julho de 2008 a abril de 2010: bióloga (contrato temporário) do Laboratório de Imunologia do Centro de Investigação em Pediatria (CIPED), na Faculdade de Ciências Médicas (FCM), na Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), em Campinas, SP.
- Desde 2 de agosto de 2010 até atualmente: bióloga (contrato CLT) do Laboratório de Imunologia do Centro de Investigação em Pediatria (CIPED), na Faculdade de Ciências Médicas (FCM), na Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), em Campinas, SP.

Atividades de Ensino

- Monitoria na 7ª edição do projeto Ciência e Artes nas Férias (9 de janeiro a 6 de fevereiro de 2009), que envolveu o estágio de alunos do Ensino Médio no Laboratório de Imunologia do Centro de Investigação em Pediatria da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, em Campinas, SP.
- Monitoria na 9ª edição do projeto Ciência e Artes nas Férias (7 de janeiro a 4 de fevereiro de 2011), que envolveu o estágio de alunos do Ensino Médio no Laboratório de Imunologia do Centro de Investigação em Pediatria da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, em Campinas, SP.

Participação em eventos científicos e cursos

- 2008, 2º Semana de Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas, de 5 a 8 de maio, em Campinas, SP.
- 2009, 3º Semana de Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas, de 11 a 14 de maio, em Campinas, SP.
- 2009, VIII Simpósio Brasileiro de Pesquisa em HIV/AIDS, de 28 de junho a 01 de julho, no Rio de Janeiro, RJ.
- 2010, Curso “Conceitos Fundamentais em Pesquisa Clínica”, administrado por Profa. Dra. Greyce Lousana, pela Invitare – Academia Brasileira de Ensino e Pesquisa em Saúde, durante o mês de abril, na UNICAMP, em Campinas, SP.
- 2011, New Enterprise-OCTAVE Workshop for Latin American Young and Early Career Investigators: Statistical Methods in HIV Vaccine Trial Design and Evaluation, de 17 a 18 de março, em São Paulo, SP.
- 2011, 5ª Semana da Pesquisa, de 9 a 12 de maio, na UNICAMP, Campinas, SP.
- 2011, 10º Fórum da Academia Brasileira de Pediatria “As Transformações da Família e da Sociedade e seu Impacto na Infância e Juventude”, de 21 e 22 de outubro, na UNICAMP, Campinas, SP.
- 2012, VII Curso Avançado de Patogênese do HIV, de 29 de março a 04 de abril, na Faculdade de Medicina da USP, São Paulo, SP.
- 2013, 15th International Congress of Immunology, de 22 a 27 de agosto, em Milão, Itália.

Apresentação de trabalhos em congressos

- **Mazzola TN**, Moreno YMF, Da Silva MTN, Lima SCBS, Zorzeto TQ, Morcillo AM, Passeto AS & Vilela MMS. *Impaired BCG cellular immune response in HIV-exposed uninfected infants*, apresentado sob a forma de pôster na 2º Semana de Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, de 5 a 8 de maio de 2008, em Campinas, SP.

- **Mazzola TN**, Abramczuk BM, Moreno YMF, Blotta MH, Da Silva MTN & Vilela MMS. *Imunidade humoral para a vacina de hepatite B em crianças com exposição vertical ao HIV*, apresentado sob a forma de pôster na 3º Semana de Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, de 11 a 14 de maio de 2009, em Campinas, SP.

- **Mazzola TN**, Abramczuk BM, Moreno YMF, Blotta MH, Da Silva MTN & Vilela MMS. *Humoral immune response to hepatitis B vaccination among children with HIV vertical exposure*, apresentado sob a forma de pôster no VIII Simpósio Brasileiro de Pesquisa em HIV/AIDS, de 28 de junho a 01 de julho em 2009, no Rio de Janeiro, RJ.

- Bernardi DM, Ribeiro AF, **Mazzola TN**, Cielo FMBL, Da Silva MTN, Vilela MMS & Sgarbieri VC. *Estrés oxidativo en pacientes con Fibrosis Quística, una posibilidad de modulación por la dieta*, apresentado sob a forma de pôster no II Congreso FESNAD, de 3 a 5 de março de 2010, em Barcelona, Espanha.

- Bernardi DM, Ribeiro AF, Hortencio TDR, **Mazzola TN**, Vilela MMS & Sgarbieri VC. *Estrés oxidativo en pacientes con Fibrosis Quística, una posibilidad de modulación por la dieta*, apresentado sob a forma de pôster no II Congreso FESNAD, de 3 a 5 de março de 2010, em Barcelona, Espanha.

- Abramczuk BM, **Mazzola TN**, Moreno YMF, Zorzetto TQ, Quintilo W, Wolf OS, Blotta MH, Morcillo AM & Vilela MMS. *Impaired vaccine humoral response among HIV-exposed uninfected infants*, apresentado sob a forma de pôster na 4^o Semana de Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, de 17 a 21 de maio de 2010, em Campinas, SP.

- Caldas JPS, Marba STM, Vilela MM, Vinagre L, Braghini C, **Mazzola T**. *Production of reactive oxygen intermediaries by cord polymorphonuclear cells and intraventricular hemorrhage: is there an association?* Pôster apresentado em Pediatric Academic Societies and Asian Society for Pediatric Research, de 30 de abril a 3 de maio de 2011, em Denver, EUA.

- **Mazzola TN**, da Silva MTN, Oya V, Abramczuk BM, Ramalho VD, Ziegler FF, Bernardi DM, Moreno YMF, Souza Lima SCB & Vilela MMS. *Resposta celular à vacina BCG de indivíduos saudáveis vacinados ao nascer*. Pôster apresentado na 5^a Semana da Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, de 9 a 12 de maio de 2011, em Campinas, SP.

- Ramalho VD, Escanhoela CEA, Abramczuk BM, **Mazzola TN**, Buzolin M, Riccetto AGL, da Silva MTN & Vilela MMS. *Hepatocarcinoma in adolescent with X-Linked Agamaglobulinemia*. Pôster apresentado no III Simpósio Internacional de Imunodeficiências Primárias – SYDEP, de 19 a 22 de outubro de 2011, no Centro de Convenções Rebouças, São Paulo, SP.

- Abramczuk BM, Ramalho VD, **Mazzola TN**, Buzolin M, Riccetto AGL, da Silva MTN & Vilela MMS. *Thrombocytopenia and lymphoproliferative syndrome in a patient with ALPS: response to sequential treatment with mycophenolate mofetil and sirolimus*. Pôster

apresentado no III Simpósio Internacional de Imunodeficiências Primárias – SYDEP, de 19 a 22 de outubro de 2011, no Centro de Convenções Rebouças, São Paulo, SP.

- Ramalho VD, Teocchi MA, Abramczuk BM, **Mazzola TN**, Vilela MMS. *Expression of Bruton's tyrosine kinase gene and endoplasmic reticulum stress markers in X-linked agamaglobulinemia*. Pôster apresentado no 15th International Congress of Immunology, de 22 a 27 de agosto de 2013, em Milão, Itália.

- Oya V, Davanço T, Coy CSR, Da Silva MTN, **Mazzola TN**, Morcillo AM, Pinto EC, Vilela MMS. *BCG-specific lymphocyte proliferation and cytokine in patients with Crohn's disease under anti-TNF- α and azathioprine therapy*. Pôster apresentado no 15th International Congress of Immunology, de 22 a 27 de agosto de 2013, em Milão, Itália.

- **Mazzola TN**, Bernachi JS, Anjos EBV, Longhini ALF, Lemos R, Saad STO, Costa SCB, Da Silva MTN, Vilela MMS. *Viral load impact in HIV cellular immune response from children and adolescents*. Pôster apresentado no 15th International Congress of Immunology, de 22 a 27 de agosto de 2013, em Milão, Itália.

- Ramalho VD, Teocchi MA, Abramczuk BM, **Mazzola TN**, Vilela MMS. *Expression of Bruton's tyrosine kinase gene and endoplasmic reticulum stress markers in X-linked agamaglobulinemia*. Pôster apresentado no IV Simpósio Internacional de Imunodeficiências Primárias – SYDEP, de 7 a 9 de novembro de 2013, em Recife, Pernambuco.

Publicações de artigos científicos

- Zorzeto TQ, Higashi HG, da Silva MT, Carniel E de F, Dias WO, Ramalho VD, **Mazzola TN**, Lima SC, Morcillo AM, Stephano MA, Antonio MA, Zanolli Mde L, Raw I & Vilela

MM. Immunogenicity of a whole-cell pertussis vaccine with low lipopolysaccharide content in infants. *Clin Vaccine Immunol* 2009, 16(4):544-50.

- **Mazzola TN**, da Silva MT, Abramczuk BM, Moreno YM, Lima SC, Zorzeto TQ, Passeto AS & Vilela MM. Impaired *Bacillus Calmette-Guérin* cellular immune response in HIV-exposed, uninfected infants. *AIDS* 2011, 25(17):2079-87.

- Abramczuk BM, **Mazzola TN**, Moreno YM, Zorzeto TQ, Quintilio W, Wolf PS, Blotta MH, Morcillo AM, da Silva MT & Vilela MM. Impaired humoral response to vaccines among HIV-exposed uninfected infants. *Clin Vaccine Immunol* 2011, 18(9):1406-9.

- Caldas JP, Vilela MM, Braghini CA, **Mazzola T**, Marba STM. Antenatal maternal corticosteroid administration and markers of oxidative stress and inflammation in umbilical cord blood from very low birth weight preterm newborn infants. *J Pediatr (Rio J)* 2012;88(1):61-6.

- Gazini CC, Reimão R, Rossini S, Centeville M, **Mazzola T**, Vilela MMS & da Silva MTN. Quality of sleep and quality of life in adolescents infected with Human Immunodeficiency Virus. *Arq Neuropsiquiatr.* 2012;70(6):422-7.

- Bernardi DM, Ribeiro AF, **Mazzola TN**, Vilela MM, Sgarbieri VC. The impact of cystic fibrosis on the immunologic profile of pediatric patients. *J Pediatr (Rio J)* 2013;89(1):40-7.

Artigo submetido à consideração:

- **Mazzola TN**, Bernachi JS, Anjos EBV, Longhini ALF, Lemos RMBP, Ferreira JF, Saad STO, Lorand-Metze IGH, Costa SCB, Da Silva MTN, Vilela MMS. Does persistent plasma viremia modify cellular immune response to Human Immunodeficiency Virus in vertically infected pediatric patients? Submetido a PLOS One sob o número: PONE-D-13-47025.

Participação em bancas

- Examinadora da Banca de Apresentação de Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação em Ciências Biológicas da aluna Michele Cintra Vicentini, sob o título de “Avaliação da proliferação de linfócitos T em lactentes expostos ao HIV”, da Pontifícia Universidade Católica de Campinas, em 17 de novembro de 2009, Campinas, SP.
- Examinadora da Banca de Apresentação de Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação em Ciências Biológicas de Jéssica Santana Bernachi, sob o título de “Avaliação de células dendríticas e linfócitos T em crianças e adolescentes infectados pelo HIV”, PUCCAMP, 17 de novembro de 2011, Campinas, SP.
- Examinadora da Banca de Apresentação de Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação em Ciências Biológicas de Nívia Andréia Miranda, sob o título de “Tuberculose pulmonar causada pelo *Mycobacterium tuberculosis*”, PUCCAMP, 17 de novembro de 2011, Campinas, SP.

