

TESE DE DOUTORADO



UFG

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL
E SAÚDE PÚBLICA**

KEILA CORREIA DE ALCÂNTARA

**EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DO HIV-1, RESISTÊNCIA
AOS ANTIRRETROVIRAIS EM GESTANTES
E TRANSMISSÃO VERTICAL NO ESTADO DE GOIÁS**

**Goiânia
2011**

KEILA CORREIA DE ALCÂNTARA

**EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DO HIV-1, RESISTÊNCIA
AOS ANTIRRETROVIRAIS EM GESTANTES
E TRANSMISSÃO VERTICAL NO ESTADO DE GOIÁS**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás para obtenção do Título de Doutor em Medicina Tropical e Saúde Pública.

Orientadora: Mariane Martins de Araújo Stefani

**Goiânia
2011**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
GPT/BC/UFG**

A347e Alcântara, Keila Correia de
Epidemiologia molecular do HIV-1, resistência aos
antirretrovirais em gestantes e transmissão vertical no Estado de
Goiás [manuscrito] / Keila Correia de Alcântara. - 2011.
217 f. : il.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Mariane Martins de Araújo Stefani.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Goiás, Instituto
de Patologia e Medicina Tropical, 2011.
Bibliografia.

1. HIV-1 2. Transmissão vertical 3. Resistência 4. Diversidade
genética – Goiás (Estado). I. Título.

CDU:616.98(817.3)

A lei de ouro do comportamento é a tolerância mútua, já que nunca pensaremos todos da mesma maneira, já que nunca veremos senão uma parte da verdade e sob ângulos diversos.

Mahatma Gandhi

Dedico esta Tese para todas as mulheres-mães portadoras do HIV e seus filhos que, apesar das dores e angústias contribuíram para a ciência e para minha formação acadêmica.

AGRADECIMENTOS

Minha eterna gratidão a **DEUS** por colocar em minha vida pessoas importantes que me ajudaram nestes três anos de caminhada (outras por muito mais tempo!). **SUAS** ações se mostraram e se mostram através delas, para as quais tentarei expressar um pouquinho de minha gratidão.

Ao meu **Pai (Antonio Correia de Paula)** e minha **mãe (Maria Abadia de Alcântara Correia)**, obrigada pelo apoio em qualquer que fosse o caminho escolhido por mim. Obrigada mãe, por cuidar tão bem dos meus filhos quando eu não estava por perto. Obrigada, pai por dedicar tanto aos netos e virar o “vôtorista” quando não podíamos levar ou buscar na escola, dentista...

Cláudio Silvério, meu marido! Um verdadeiro companheiro! Obrigada por ter compreendido minhas ausências, meus momentos de frustração, cansaço ou desânimo. Estou aqui há um tempão e não encontro palavras para lhe agradecer, apenas duas não se calam: **AMO VOCÊ!**

Preciso agradecer à maior preciosidade de minha vida: meus filhos **Erick Alcântara Silvério** (7 anos) e **Bianca Alcântara Silvério** (4 anos). Obrigada meus amores, por alegrarem profundamente minha vida com seus sorrisos, abraços, beijos, histórias e cantigas novas aprendidas na escola. Não esquecerei a pergunta: “Quando é que você vai parar de estudar e terminar de escrever este ‘livro’?” Parar de estudar, nunca. Este “livro” eu acabei, rsss!

Profa. Mariane Martins de Araújo Stefani, minha orientadora e amiga! Agradeço por não ter desistido de mim, por acreditar e depositar seu voto de confiança em meu trabalho. Obrigada por me integrar à equipe e com isso, permitir que contribuísse com a história do HIV-1 no Centro-Oeste brasileiro. Levarei seus ensinamentos por toda minha vida acadêmica! Minha eterna gratidão!

Janaina Bacellar Acioli Lins, sua participação nesta pesquisa foi essencial. Obrigada, por participar da elaboração do projeto inicial, auxiliar no recrutamento das pacientes e na execução dos ensaios laboratoriais.

Agradeço a **Mônica Nogueira da Guarda Reis**, minha colega de laboratório, competente e responsável, pelo longo tempo destinado ao sequenciamento genético das amostras de nosso grupo de estudo.

Ludimila Paula Vaz Cardoso, minha gratidão por compartilhar comigo seu conhecimento em biologia molecular do HIV, por ler pacientemente minha tese e contribuir com preciosas sugestões no exame de qualificação, nos artigos que escrevemos e na tese final.

Aos colegas do laboratório de Imunologia da Aids e Hanseníase do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPATSP/UFPA), **Rodrigo Scalliante**, **Regiane Morillas**, **Yanna Andressa Ramos de Lima**, **Emerith Mayra Hungria Pinto**, **Dr. Maurício Barcelos**, **Bruna Coelho Carvalho** e **Aliny**, eu só tenho a agradecer pelas trocas de informações científicas e pelos momentos de descontração nada científicos, rsss!

José Neto (Zezinho) e **Kariny**, secretários da pós-graduação, eu os tenho como amigos! Obrigada pela presteza em atender minhas solicitações quando necessitava e pelas gostosas risadas que demos juntos nos intervalos para um café!

Aos **professores pesquisadores do departamento de Imunologia do IPTSP** obrigada pelo compromisso com o ensino, a pesquisa e a formação de seus discípulos.

A todos os outros **funcionários do IPTSP** que direta ou indiretamente tornaram possível a condução do meu trabalho.

Obrigada meu amigo **Sérgio Henrique Nascente Costa**, da Faculdade de Farmácia, por escutar minhas lamúrias, por entender minha correria e, principalmente, por compartilhar comigo sua experiência de vida, de sala de aula e de laboratório. Você tem contribuído muito para meu crescimento desde o início de nossa jornada na Faculdade de Farmácia/UFG. Minha eterna gratidão a esse anjo que Deus colocou na minha vida profissional!

Muito obrigada meu grande amigo e “chefe”, coordenador do curso de Biomedicina da Universidade Paulista/UNIP, **Miltom Camplesi**, por compartilhar as angústias do doutorado vivenciadas por quem trabalha fora, tem família e estuda ao mesmo tempo e, principalmente, por permitir que eu “abandonasse” algumas (maioria) das minhas aulas de seu curso para me dedicar ao doutorado.

A direção da Faculdade de Farmácia da UFG na figura da Prof^a **Eula Maria de Melo Barcelos Costa** pela compreensão de minhas ausências sempre justificadas pelo árduo trabalho do doutorado.

Obrigada a diretora do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital de Doenças Tropicais Dr^a. **Ana Cristina** pela concessão do espaço físico para as coletas e por permitir que sua equipe técnica ajudasse na etapa de recrutamento.

A equipe do laboratório de Análises Clínicas do Hospital de Doenças Tropicais, em especial **Nilson, Carlos, Ilmar e Andréia** por todas as coletas de sangue realizadas durante o recrutamento dos pacientes.

A equipe da farmácia do Hospital de Doenças Tropicais **Simone, Cristiano** e, novamente, **Janaína Bacellar** pelo apoio na etapa de recrutamento das pacientes.

Agradeço às pediatras do HDT, **Dra. Leticia C. Aires e Dra. Maly de Albuquerque**, por apoiar e divulgar o projeto. Uma parceira que deu certo em prol das crianças expostas ao HIV durante a gestação.

Obrigada a **Dra. Ana Lúcia Minuzzi** do Instituto de Diagnóstico e Prevenção/APAE/Goiânia por auxiliar na abordagem das gestantes, por contribuir com informações necessárias para a análise dos resultados aqui apresentados.

Prof. **Dr. José Carlos Couto Fernandez**, grande estudioso da resistência aos antirretrovirais no Brasil. Obrigada por dedicar seu tempo na leitura paciente de minha tese e valiosas contribuições.

Prof. **Dr^a. Angélica Espinosa Barbosa Miranda**, obrigada pela presteza em atender nosso pedido para participação na banca de defesa e contribuir para o aprimoramento de minha tese.

Obrigada, prof^a **Dr^a Silvia Helena Rabelo dos Santos**, pesquisadora do IPTSP/UFG e prof^a da Faculdade de Farmácia pelas sugestões no exame de qualificação e na defesa final.

A prof^a **Dr^a Sheila Araújo Teles** obrigada pela sua visão crítica na ótica da saúde do binômio mãe-filho no Estado de Goiás e conseqüente contribuição no exame de qualificação.

Obrigada, prof. **Dr. João Alves de Araújo Filho**, pesquisador do IPTSP/UFG, pelos apontamentos importantes necessários para melhoria da qualidade de minha tese.

SUMÁRIO

EPÍGRAFE	III
DEDICATÓRIA	IV
AGRADECIMENTOS	V
SUMÁRIO	VII
LISTA DE TABELAS, FIGURAS, QUADROS E ANEXOS	X
LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS	XII
APRESENTAÇÃO	XVI
ESTRUTURA DA TESE	XX
RESUMO	XXI
ABSTRACT	XXII
1. REVISÃO DA LITERATURA	23
1.1. Origem da síndrome da imunodeficiência adquirida	23
1.2. Epidemiologia da infecção pelo HIV-1	24
1.3. Vírus da Imunodeficiência Humana Tipo I: Estrutura e ciclo replicativo	26
1.4. A diversidade genética do HIV-1	31
1.5. Curso clínico da infecção pelo HIV-1.	33
1.6. Imunopatogênese do HIV-1	36
1.6.1. Imunidade inata	36
1.6.2. Mecanismos antivirais intracelulares-“imunidade intrínseca”	41
1.6.3. Resposta imune celular	43
1.6.4. Resposta imune humoral	46
1.6.5. Influência do antígeno leucocitário humano (HLA) na infecção e imunopatogênese do HIV-1	48
1.7. As estratégias terapêuticas no combate a aids	49
1.7.1. Os inibidores da transcriptase reversa	50
1.7.2. Os inibidores da protease	52
1.7.3. Inibidor da integrase	53
1.7.4. Inibidores de entrada	54

1.8. Adesão à terapia antirretroviral e as mutações de resistência	55
1.8.1. Mutações de resistência aos antirretrovirais	56
1.8.2. Detecção das mutações de resistência aos antirretrovirais	58
1.9. A transmissão materno-infantil do HIV-1	59
1.9.1. Gestação e a infecção pelo HIV-1	59
1.9.2. Adolescentes gestantes e a infecção pelo HIV-1	60
1.9.3. Profilaxia da transmissão materno-infantil do HIV-1	61
1.9.4. Terapia antirretroviral na gestação	62
1.9.5. Mutações de resistência na gestação e a transmissão materno-infantil do HIV-1	63
1.9.6. Momentos de transmissão materno-infantil do HIV-1 e fatores de risco relacionados	65
1.9.7. Crianças expostas ao HIV-1 durante a gestação: diagnóstico e acompanhamento	68
2. JUSTIFICATIVA	70
3. OBJETIVOS	72
3.1. Objetivo geral	72
3.2. Objetivos específicos	72
4. MATERIAL E MÉTODOS	
4.1 População e área de estudo	73
4.2 Ensaio Laboratoriais	
4.2.1 Ensaio sorológico – ELISA (<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>)	75
4.2.2 Quantificação dos Linfócitos T CD3 ⁺ , T CD4 ⁺ e T CD8 ⁺	76
4.2.3 Quantificação da viremia plasmática	77
4.2.3.1 Extração e precipitação do RNA viral	77
4.2.3.2 Transcrição reversa do RNA viral	78
4.2.3.3 Amplificação do RNA proviral	78
4.2.3.4 Hibridização e detecção do DNA viral	78
4.2.3.5 Quantificação do RNA viral	79
4.3 Genotipagem do HIV-1	79
4.3.1 Extração do DNA genômico	79
4.3.2 Extração do RNA viral	80
4.3.3 Síntese do DNA complementar: transcrição reversa do RNA (RT-PCR)	80

4.3.4 Amplificação do gene <i>pol</i> do HIV-1 através da reação de <i>nested</i> -PCR	80
4.3.5 Eletroforese em gel de agarose a 1%	81
4.3.6 Purificação dos produtos amplificados do gene <i>pol</i> obtidos por <i>nested</i> -PCR	81
4.3.7 Sequenciamento automatizado do gene <i>pol</i>	82
4.3.8 Análise dos cromatogramas	83
4.3.9 Análise genética	83
4.4 Subtipagem genética do HIV-1 – Análise da Mobilidade dos Heteroduplex (HMA)	84
4.4.1 Extração e purificação do DNA genômico	85
4.4.2 Quantificação do DNA genômico	85
4.4.3 Amplificação do DNA proviral	86
4.4.4 Hibridização e análise da mobilidade eletroforética dos híbridos	88
4.4.4.1 Preparação do gel de poliacrilamida	89
4.4.4.2 Identificação dos híbridos	90
4.5 Análise estatística	90
5. ARTIGO1: Seroreversion in children born to HIV positive and AIDS mothers from central west Brazil	92
6. MANUSCRITO 2: HIV-1 mother-to-child transmission and drug resistance among pregnant women with high access to diagnosis and prophylactic measures	111
7. MANUSCRITO 3: HIV-1 subtype C phylogeography among pregnant women from Goiás state, central western Brazil	131
8. DISCUSSÃO	151
9. CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES	161
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	162

TABELAS, FIGURAS E ANEXOS

FIGURAS

Figura 1	Estrutura do HIV-1	26
Figura 2	Organização genômica do HIV-1	28
Figura 3	Ciclo replicativo do HIV-1	30
Figura 4	Infecção pelo HIV-1: carga viral e dinâmica das células T CD4 ⁺ .	34
Figura 5	APOBEC e Vif envolvidas com a infectividade do HIV-1	42
Figura 6	Estrutura tridimensional da transcriptase reversa	51
Figura 7	Mecanismo de ação dos inibidores da transcriptase reversa	52
Figura 8	Mecanismo de ação dos inibidores de Protease	53
Figura 9	Mecanismo de ação do inibidor da Integrase, Raltegravir	54
Figura 10	Mecanismo de ação dos inibidores de entrada	55

ARTIGO 1

Figure 1	Box Blot distributions of maternal viral loads	108
-----------------	--	-----

MANUSCRITO 3

Figure 1	a) Prevalence of HIV-1 subtypes PR/RT among pregnant women from Goiás State/central western Brazil (n=131); b) Schematic drawing showing breakpoint map (according to HXB2 reference) of mosaics viruses found in the study. (n=20).	147
Figure 2	Figure 2: Molecular mapping of HIV-1 subtype C among pregnant women within interior cities from Goiás State and the main roads of national integration in Brazil (red lines).	148
Figure 3	Figure 3: Temporal distribution of HIV-1 subtypes among infected pregnant women from Goiás State (n=131).	149
Figure 4	ML tree of the <i>pol</i> (PR/RT) gene of HIV-1 subtype C sequences circulating in Brazil. The color of a branch represents the geographic region from where the subtype C strain originated, according to the legend given in the figure. Brackets indicate the monophyletic clade formed by subtype C sequences sampled from Brazil, and the position of subtype C sequences of African origin. Boxes highlight the three sub-clusters composed by two or more subtype C sequences from Goiás. The aLTR support values are indicated only at key nodes. Horizontal branch	150

lengths are drawn to scale with the bar at the bottom indicating 0.05 nucleotide substitutions per site. The tree was rooted using HIV-1 subtype A and B reference sequences.

TABELAS

Tabela 1	Drogas antirretrovirais aprovadas pelo <i>Food and drug administration</i> e pela Agência de vigilância Sanitária (ANVISA) no Brasil.	50
-----------------	---	----

ARTIGO 1

Table 1	Summary of main characteristics of 41 HIV-1 infected mothers and exposed infants from Central-Brazil	107
Table 2	Main Characteristics from pairs of HIV-positive or AIDS mothers and infants: seroreverted up 12 months (n=10), lost to follow up (n=8), neonatal death (n=1) and vertical transmission (n=1)	109
Table 3	Main characteristics of 21 pairs of HIV-positive or AIDS mothers and infants who seroreverted between 13 and 24 months of life	110

MANUSCRITO 2

Table 1	Main epidemiological, clinical and MTCT prophylaxis characteristics among newly diagnosed mothers for HIV-1 infection and mothers diagnosed before index pregnancy.	128
Table 2	Amino acid substitutions in the PR and RT resistance-related codons of mothers with secondary resistance to antiretroviral drugs.	129
Table 3	Main characteristics of HIV-1 infected mothers/exposed infants (n=149) and of three cases of HIV-1 MTCT.	130

MANUSCRITO 3

Table 1	Main social-demographic and clinical characteristics of pregnant women from Goiás State central western, Brazil (n=172).	146
----------------	--	-----

ANEXOS

ANEXO I	Critérios clínicos para definição dos casos de aids.	202
ANEXO II	Carta de concessão do financiamento do projeto de pesquisa	204
ANEXO III	Modelo de fcha adotada para coleta de dados das pacientes incluídas no estudo	205
ANEXO IV	Parecer do comitê de ética para condução da pesquisa	211
ANEXO V	Modelo dos TCLE adotados para maiores e menores de idade	212

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

μl	Microlitro
3TC	Lamivudina
A	Adenosina
ABC	Abacavir
AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida, do inglês, <i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i>
APV	Amprenavir
ARV	Antirretroviral
ATV	Atazanavir
AZT	Zidovudina
bP	Pares de base, do inglês, <i>base pair</i>
cDNA	DNA complementar
CPR	Ferramenta de calibração da população com resistência
CRF	Forma recombinante circulante
d4T	Estavudina
dATP	desoxiAdenina trifosfatada
dCTP	desoxiCitosina trifosfatada
ddC	Zalcitabina
DDI	Didanosina
dGTP	desoxiGuanina trifosfatada
DLV	Delavirdina
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos trifosfatados
DRV	Darunavir
DST	Doenças sexualmente transmissíveis
DTT	Agente redutor ditiotreitól
dTTP	desoxiTimina trifosfatada

EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EFV	Efavirenz
ELISA	do inglês, <i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
ETV	Etravirina
FDA	do inglês, <i>Food and Drug Administration</i>
FPV	Fosamprenavir
FTC	Emtricitabina
<i>g</i>	Força centrífuga relativa a gravidade
H ₂ O	Água
HAART	Terapia ARV altamente ativa
HIV	Vírus da imunodeficiência humana, do inglês <i>Human Immunodeficiency Virus</i>
HIV-1	Vírus da imunodeficiência humana tipo 1
HIV-2	Vírus da imunodeficiência humana tipo 2
HMA	Análise da mobilidade de heteroduplex, do inglês <i>Heteroduplex Mobility Assay</i>
HR	Região hepta repetida da gp41
IAS-USA	Sociedade internacional de Aids dos Estados Unidos da América
IDP/APAE	Instituto de Diagnóstico e Prevenção/Associação de pais e amigos dos excepcionais
IDV	Indinavir
IE	Inibidores de entrada
IL	Interleucinas
IN	Integrase
IP	Inibidores da protease
kb	Kilobases
kD	Kilodaltons
L	Litro
LPV	Lopinavir
LTRs	Repetições terminais longas
M	Metionina
mA:	Miliampére

MgCl ₂	Cloreto de magnésio
min	Minutos
mM	Milimolar
mm ³	Milímetro cúbico
MTCT	Transmissão materno-infantil, do inglês <i>mother-to-child transmission</i>
nested-PCR	Reação em cadeia da polimerase em duas etapas
NFV	Nelfinavir
ng/μl	nanograma/microlitro
nM	Nanomolar
Nm	Nanômetros
NNRTI	Inibidores da transcriptase reversa não análogos a nucleosídeos, do inglês, <i>Non-Nucleoside Analogs Reverse Transcriptase Inhibitors</i>
NRTI	Inibidores da transcriptase reversa análogos a nucleosídeos e nucleotídeos, do inglês, <i>Nucleotide and Nucleoside Analogs Reverse Transcriptase Inhibitors</i>
NVP	Nevirapina
p/μl	picomolar/microlitro
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PICs	Complexos de pré-integração
PPG	Programa de Proteção à Gestante
PR	Protease
qsp	Quantidade suficiente para
RNA	Ácido ribonucléico
RNA _m	RNA mensageiro
rpm	Rotações por minuto
RT	Transcriptase reversa, do inglês, <i>reverse transcriptase</i>
RT-PCR	Transcrição reversa por reação em cadeia da polimerase
RTV	Ritonavir
SIV _{cpz}	Vírus da imunodeficiência símian do chimpanzé

SQV	Saquinavir
T-20	Enfurvitida
TAE	Tris-acetato-edta
TBE	Tris-borato-edta
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TARV	Terapia antirretroviral
TDF	Tenofovir
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine
TMI	Transmissão materno-infantil
TNF	Fator de necrose tumoral
TPV	Tipranavir
U/ μ l	Unidades/microlitro
UDI	Usuários de drogas injetáveis
URF	Forma recombinante única
V	Valina

APRESENTAÇÃO

Em 1995, iniciei o curso de Ciências Biológicas – Modalidade Médica (Biomedicina) na Universidade Católica de Goiás (UCG), atualmente Pontifícia Universidade Católica (PUC). Ainda no 3º período do curso (1996) tive oportunidade de iniciar um estágio em laboratório de análises clínicas localizado no Hospital Infantil de Campinas - Goiânia. Mal sabia eu que aquela aprendizagem técnica para coleta de sangue arterial daqueles tenros e frágeis bebês e a experiência com a saúde materno-infantil não seriam por acaso. Daqui a pouco conto o motivo. No entanto, sentia que faltava algo. A rotina de um laboratório por si só não preenchia minha ânsia pelo conhecimento.

Então, em 1996, tive oportunidade de iniciar minha carreira docente. Comecei a dar aulas de inglês para crianças e adultos e biologia para o segundo grau. A sala de aula me encantou. Gostei da prazerosa sensação de ensinar! Fui monitora da disciplina de Histologia e Embriologia. Foi quando descobri o quanto eu aprendia ao ensinar! Em 1997, enveredei pela pesquisa. Durante a iniciação científica, estudei a prevalência de câncer de mama entre as mulheres que viviam em Goiânia antes e após a tragédia do Cesio137 sob orientação da Dra. Vera Saddi, da qual me orgulho muito. Naquele momento, a pesquisa mostrou-me os desafios, as tristezas, os obstáculos, mas principalmente, o prazer e a alegria maior em poder contribuir com a ciência aplicada e com a saúde pública. Não posso deixar de mencionar que apresentei o trabalho da equipe em eventos científicos e na Primeira Semana Científica da Biomedicina em 1998 da Universidade Católica de Goiás tive a honra de receber a premiação como melhor tema livre na categoria apresentação oral do evento.

Em 1998, fui convidada para trabalhar em um grande laboratório de análises clínicas da cidade. Função: flebotomista. Isso mesmo, flebotomista – aquele que suga o sangue. Após alguns meses, pensei: “O que eu estou fazendo aqui? Não vou passar 4 anos estudando para ficar na função técnica”. Sem desmerecer a tão valiosa função, onde se começa todo e qualquer exame laboratorial, mas não era o que eu almejava. Em agosto de 1999 concluí o curso de graduação. Já estava empregada em outro laboratório de análises clínicas onde estagiei e lá permaneci após diplomada por longos 3 meses. Algo falava mais alto e não desisti do meu sonho de estudar e ser professora na graduação.

Foi então, que em outubro de 1999, procurei pela professora Mariane Stefani e disse que gostaria de trabalhar com HIV. Tive a honra de ser acolhida e poder participar do grupo de pesquisa que na época era composto por ela, pelos mestrandos Maria Ordália Ferro, Gisner Alves Sousa Pereira e João Teixeira Neto. Imediatamente, deixei o emprego do laboratório e iniciei a parte prática da pesquisa cujo tema era transmissão vertical do HIV-1. Para executar o projeto era necessário ter a experiência com a saúde materno-infantil, coletar sangue das tenras e frágeis crianças. Viram? Não foi por acaso aquele meu primeiro estágio no Hospital Infantil! Ingressei oficialmente no programa de pós-graduação em Medicina Tropical- área de concentração Imunologia um ano mais tarde. Durante três anos acompanhei mães HIV/aids e filhos expostos ao HIV-1 durante a gestação, parto e aleitamento materno. Tive a honra de conhecer grandes pesquisadores no IV Simpaids realizado na Costa do Sauípe – BA quando apresentei oralmente os resultados parciais de minha dissertação. Nosso trabalho também pôde ser compartilhado com a comunidade científica local na II Amostra de Trabalhos de Trabalhos Científicos do Hospital Materno Infantil, concorreu com inúmeros outros trabalhos e recebeu a premiação de primeiro lugar. Durante os três anos de mestrado ganhei experiência acadêmica, técnica, científica e, principalmente, experiência de vida! Terminei o mestrado em primeiro de abril de 2003. A partir daquela ocasião mergulhei na sala de aula.

Em 2001, antes de terminar o mestrado, fui contratada pela UCG para ministrar a disciplina de Imunologia. Como tremi ao dar as primeiras aulas em uma universidade! Isso é bom, sinal de responsabilidade! Foi uma experiência gratificante. Trabalhei por 5 anos em outra universidade particular de Goiânia e 5 anos na Universidade Estadual de Goiás, em Anápolis, localizada a 45 km da capital. Tive oportunidade de desenvolver projetos de pesquisa, mesmo sem nenhum financiamento, incentivei vários alunos a pesquisarem, orientei alunos de iniciação científica com bolsa. De algumas destas orientações surgiram publicações (1. Barbosa, L.S., Dutra, JP, ALCÂNTARA, K. C. Rinite alérgica e Asma entre os acadêmicos da Universidade Estadual de Goiás (UEG)-Unidade de Ciências Exatas e Tecnológicas: Prevalência e influência do ambiente domiciliar. *Revista Racine (São Paulo)*, v.107, p.50 - 54, 2009. 2. Almeida, K.C., Lindolfo, L.C., ALCÂNTARA, K. C. Sífilis em gestantes atendidas em uma unidade de saúde pública de Anápolis, Goiás, Brasil. *Revista Brasileira de Análises Clínicas.* , v.41, p.181 - 184, 2009. 3. Gonçalves KI, Sousa EM, Modesto LS, Fonseca AF, ALCÂNTARA, K. C. Soroprevalência de HIV-1/2 entre doadores de sangue de Goiânia-Goiás. *Revista Brasileira de Análises Clínicas.* , v.38, p.263 - 266, 2006). São trabalhos dos quais me orgulho, pois foram os primeiros frutos “caminhando com as próprias pernas”. Até hoje tenho o prazer de receber notícias de ex-alunos que agradecem

pelo incentivo e convidam para defesa de mestrado e até mesmo de doutorado em universidades conceituadas do país. Foi um período de experiência profissional necessário para o meu crescimento intelectual e espiritual. Eu necessitava daquela experiência para amadurecer!

Além da carreira profissional, não posso deixar de mencionar que entre 2003 e 2008 fiz “doutorado em fraldas e mamadeiras”. Constituí minha linda família. Casei-me em 2001, ainda durante o mestrado. Meu filho Erick nasceu no fim de 2003 e minha filhota Bianca em 2007. Não há experiência semelhante a da maternidade! Não há amor maior no mundo! Escreveria um livro dessa parte de minha história, mas agora não é hora.

Enfim, em 2008 resolvi que era hora de voltar às pesquisas, não havia como continuar na docência sem me qualificar. Eu estava “emburrecendo”. Foi quando voltei a frequentar os corredores do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública e novamente, a prof. Mariane tinha um grande projeto em HIV-1 envolvendo a saúde materno-infantil. Pensei comigo: “a hora é agora, o barquinho está passando e é nele que vou velejar!”

Eu encarei o doutorado de uma forma muito mais madura. Via tudo com olhos de uma experiência que desejei ter quando estava no mestrado. Mas a vida é assim: fica melhor a cada dia que passa. Consegui ser esposa, mãe, aluna e professora. Cuidei da família, cursei todos os créditos do doutorado e não deixei a sala de aula durante o doutoramento. Passei no concurso público para professora efetiva na Faculdade de Farmácia da UFG, área: hematologia. Como e por quê? Primeiramente, acho que foi pelo excelente professor que tive na graduação (Dr. Luis Murilo); também por ter na família um caso raro de doença hematológica que me levou a ler e estudar sobre o tema, até que em 2004 surgiu a oportunidade de ministrar as primeiras aulas de hematologia e nunca mais parei de ler e estudar o assunto.

Durante esses três anos de doutorado, terminamos o artigo referente às análises das amostras colhidas na época do mestrado e o qual apresento aqui como nosso primeiro artigo publicado no doutorado. Em São Paulo, fiz o V Curso Avançado da Patogênese do HIV na USP. Tive o prazer de apresentar nossos resultados em vários eventos científicos. No VII Seminário de Patologia Tropical e Saúde Pública do IPTSP/UFG recebi menção honrosa com a apresentação dos resultados parciais (*HIV-1 Vertical transmission and Drug Resistance mutations*. Revista de Patologia tropical e Saúde Pública. UFG, 2009. v.38. p.09 - 09). No IX Simpósio realizado em Salvador/BA, do total de 120 trabalhos inscritos o trabalho intitulado *HIV-1 Molecular Epidemiology among Adult and Adolescent Pregnant Women Infected with HIV-1 from Central Western Brazil*, foi escolhido para apresentação oral em mesa redonda.

No congresso de DST/Aids em Curitiba e no XVIII International AIDS Conference (IAS), em Viena, Áustria, também tivemos a honra de ter o trabalho selecionado para apresentação oral.

Portanto, é com sentimento de prazer, orgulho e dever cumprido com muito suor, responsabilidade, noites em claro e abdicação de fins de semana com a família que deixo em minha tese de doutorado parte da história da epidemiologia molecular do HIV-1 entre as gestantes infectadas e crianças expostas ao vírus no Estado de Goiás.

Nada foi por acaso! Nada é por acaso. “Deus não joga dado”!

Estrutura da Tese

Esta tese de doutorado está sendo apresentada no formato de “tese de doutorado modalidade artigos científicos” de acordo com a Norma CPGMTSP No 04/2009 (<http://www.ufg.br/this2/uploads/files/58/Norma-CPGMTSP04.pdf>) do Programa de Pós Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás

Esta tese contém os seguintes itens:

- ✓ Uma revisão da literatura sobre o tema;
- ✓ Justificativa;
- ✓ Objetivos;
- ✓ Material e métodos;
- ✓ Artigo 1: publicado na *Transactions of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* (qualis A2);
- ✓ Dois manuscritos de artigos científicos submetidos a periódicos indexados;
- ✓ Discussão geral sobre os resultados encontrados durante o desenvolvimento da tese;
- ✓ Conclusões/Recomendações;
- ✓ Anexos: critérios para definição de caso de aids estabelecidos pelo CDC; cópia da aprovação dos projetos pelos Comitês de Ética; modelos do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), cópia da ficha utilizada para coleta de dados e cópia da carta de concessão de financiamento do projeto de pesquisa.

RESUMO

Introdução: O avanço da epidemia de aids em mulheres jovens e a transmissão materno-infantil do HIV-1 (TMI) representam importantes temas de saúde pública. Neste contexto, a assistência pré-natal representa uma oportunidade única para o diagnóstico da infecção pelo HIV-1 e implementação precoce de medidas profiláticas para TMI. **Objetivos:** Estudar as características imunológicas, virais, clínicas, epidemiológicas e identificar fatores associados à transmissão materno-infantil do HIV-1 entre gestantes infectadas pelo HIV-1/filhos recrutados no estado de Goiás. **Material e métodos:** Coorte 1: 41 pares mães HIV/aids-filhos (abril/2000-agosto/2001) recrutados e acompanhados prospectivamente em dois centros de referência regionais (Hospital Materno Infantil/HMI/SUS; Hospital Dr. Auar Auad/HAA/HDT/SUS). Coorte 2: 172 mães HIV/aids-149 filhos recrutados no Instituto de Diagnóstico e Prevenção/IDP/APAE e acompanhados prospectivamente no HAA/HDT/SUS. Foram avaliados viremia plasmática materna, contagem de células T CD4⁺, subtipos de HIV-1 nas regiões *env/gag* pelo ensaio da mobilidade de heteroduplex (HMA) para coorte 1 e sequenciamento gene *pol* (protease e transcriptase reversa-PR/RT) para identificar mutações de resistência aos antirretrovirais e subtipos do HIV-1 e análise filogeográfica das seqüências do subtipo C da coorte 2. As crianças filhas de mães HIV/aids foram submetidas a testes para quantificação do RNA HIV-1 plasmático e das células T CD4⁺. Nas crianças não infectadas a sororreversão foi acompanhada sequencialmente por ELISA para IgG anti HIV-1/2. **Resultados:** As pacientes da coorte 1 e 2 apresentaram características sócio-demográficas e clínicas semelhantes. A mediana de idade foi 26 anos (variação 15-41 anos), a maioria tinha baixa escolaridade e foi diagnosticada durante a gestação (90%). Mais de 80% recebeu profilaxia ARV para TMI. Na coorte 1 foi observado um caso de TMI associado a curta exposição à profilaxia e longo trabalho parto. Entre crianças expostas/não-infectadas a sororreversão foi mais rápida entre os nascidos de mães sintomáticas. A coorte 2 representou 80% do total de gestantes HIV-1⁺ do Estado de Goiás no período. A introdução precoce da profilaxia e viremia indetectável predominaram nas pacientes com diagnóstico anterior à gestação ($p < 0.05$). Uma paciente virgem de tratamento apresentou resistência transmitida; 10 pacientes apresentaram resistência secundária: 6 sob profilaxia, 4 sob HAART. Entre os casos de TMI (3/149; 2,01%) observamos diagnóstico tardio, parto vaginal, amamentação e ausência do AZT oral e mutações de resistência não foram detectadas. Resultados do HMA (coorte 1) e do sequenciamento automatizado (coorte 2) em gestantes de Goiás mostraram a circulação dos subtipos B, F1 e recombinantes, principalmente BF1 nas regiões *env/gag* e *pol* do HIV-1. O subtipo C só foi detectado na coorte 2 e juntamente com os recombinantes BC representaram em torno de 20% dos isolados. HIV-1 subtipo C, originado do sul do país, foi detectado em gestantes de municípios do interior de Goiás por onde passam importantes vias de ligação sul-norte (BR153), sul-nordeste (BR020) e sul-centro-oeste/Mato Grosso (BR070/BR364). Análises filogenética/filogeográfica do subtipo C mostraram um clado monofilético formado por sequências de Goiás e da região Sul e de São Paulo e evidências de múltiplas introduções em Goiás. **Conclusão:** Nossos resultados indicam que o programa pré-natal de alta cobertura em Goiás representa uma importante oportunidade para diagnóstico e prevenção precoce de transmissão vertical do HIV-1. Entretanto os 3 casos de TMI observamos diagnóstico tardio e perda de oportunidade para a profilaxia completa da transmissão vertical do HIV-1. Múltiplas introduções e a disseminação do subtipo C por contato heterossexual no interior indicam a necessidade de monitoramento da diversidade genética e do impacto da disseminação do subtipo C no interior do Brasil.

Palavras-chave: HIV-1; transmissão materno-infantil; resistência; diversidade genética.

ABSTRACT

Introduction: The spread of the aids epidemic among young women and HIV-1 mother-to-child transmission (MTCT) represent important public health issues. In this context, prenatal care represents a unique opportunity for the early diagnosis of young women and for the implementation of full preventive strategies to HIV-1MTCT. **Objectives:** To study immunological, virological, clinical and epidemiological characteristics and to identify factors associated with HIV-1MTCT among HIV-1 pregnant women/infants recruited in Goias State. **Material and methods:** Cohort 1: 41 pregnant HIV/AIDS: infant pairs (April/2000-August/2001) were recruited and prospectively followed up at two regional reference centers-Mother-Infant Hospital (HMI/SUS) and Hospital Dr. Anuar Auad (HAA/HDT/SUS). Cohort 2: 172 HIV/AIDS pregnant women and 149 exposed children were recruited at the Institute of diagnosis and prevention (IDP/APAE) and prospectively followed up at HAA/HDT/SUS. The following tests were performed: maternal viral load, CD4⁺ T cell counts, HIV-1*env/gag* subtypes by heteroduplex mobility assay/HMA (cohort 1) and *pol* (protease and reverse transcriptase-PR/RT) sequencing for resistance profile, subtypes identification and phylogeography analysis for subtype C (cohort 2). Infants born to HIV-1/aids mothers were evaluated by plasma viral RNA and CD4⁺ T cell counts. Seroreversion of exposed- uninfected children was followed by sequential ELISA tests for IgG anti HIV-1. **Results:** Patients from cohorts 1 and 2 presented similar social-demographic and clinical profiles. The median age was 26 years; 15-41 years), lower educational level predominated and most were diagnosed during pregnancy (90%). Over 80% received ARV prophylaxis. One case of MTCT was observed in cohort 1 which was associated with short prophylaxis and long labor period. Exposed-uninfected infants born to symptomatic mothers seroreverted earlier. Cohort 2 included 80% of all HIV-1 infected pregnant women from Goias state in that period. The early prophylaxis and undetectable viral load predominated among previously diagnosed patients ($p < 0.05$). One ARV naive patient presented transmitted drug resistance; 10 ARV experienced patients presented secondary drug resistance: 6 under MTCT prophylaxis, 4 under HAART. MTCT was observed in 3/149 (2.01%) cases and late diagnosis, vaginal delivery, breastfeeding and lack of oral ZDV were observed. Among MTCT cases resistance mutations were not detected. HMA *env/gag* (cohort 1) and *pol* sequencing (cohort 2) results showed mostly subtype B followed by subtypes F1, C and recombinants, mainly BF1. HIV-1 subtype C was identified only among pregnant women from cohort 2 which together with recombinants BC represented around 20% of the isolates. Subtype C and BC recombinants were isolated in interior municipalities of Goias state located close to the main highways that connect south/southern to north (BR153), northeast (BR020) and South/west (BR369/BR070). Phylogenetic/ phylogeographic analysis showed a subtype C clado, clusters (aLTR ≥ 0.85) with sequences from Southern states and from Sao Paulo and evidences of multiple introductions. **Conclusion:** Our results indicate the importance of prenatal care for the early diagnosis/prevention of HIV-1 vertical transmission. However late diagnosis and missed opportunities to fully prevent transmission were associated with vertical transmission. Multiple introductions and the dissemination of HIV-1 subtype C by heterosexual contact in interior cities highlight the importance of monitoring the genetic diversity and the impact of subtype C dissemination in the interior of Brazil.

Key-words: HIV-1; mother-to-child transmission; resistance; genetic diversity.

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 ORIGEM DA SÍNDROME DA IMUNODEFICIÊNCIA ADQUIRIDA

A síndrome da imunodeficiência adquirida (aids), foi identificada primeiramente em 1981 nos Estados Unidos da América após relatos de imunodeficiência em homossexuais jovens do sexo masculino (Gottlieb et al. 1981). Posteriormente, quadro clínico semelhante foi descrito em pacientes hemofílicos que haviam recebido hemoderivados previamente purificados e filtrados em filtros bacteriológicos. Como os filtros bacteriológicos não impediam a passagem de vírus, o fato chamou atenção para que o possível agente etiológico da aids pudesse ser um vírus (Montagnier 2010).

Em 1983, um grupo de pesquisadores do Instituto Pasteur isolou um novo retrovírus citopático para linfócitos, que ficou conhecido como LAV (*Lymphadenopathy-Associated virus*) (Barre-Sinoussi et al. 1983). Em 1984, o grupo de pesquisa liderado por Robert Gallo nos EUA descreveu um vírus isolado de linfonodos de pacientes com aids que recebeu o nome de HTLV III (vírus T-linfotrópicos humanos tipo III), pois apresentava diferenças significativas quando comparado com os vírus já descritos HTLV-I (vírus T-linfotrópicos humanos tipo I) e HTLV-II (vírus T-linfotrópicos humanos tipo II) (Gallo et al. 1984). Neste mesmo ano, foi isolado um retrovírus a partir de pacientes doentes de aids de diferentes grupos de risco, que recebeu a denominação de ARV (*AIDS-Associated Retrovirus*) (Levy et al. 1984).

Em 1985, análises das sequências de nucleotídeos dos vírus HTLV-III, LAV e ARV isolados de diversos pacientes com aids demonstraram que os mesmos eram muito semelhantes e pertenciam à mesma família de retrovírus. Em 1986, o *International Committee on Taxonomy Viruses* (ICTV) renomeou estes agentes como *Human Immunodeficiency Virus* (HIV) (Coffin et al. 1986). Desta forma, o agente causador da aids foi isolado e descrito como um lentivírus da família *Retroviridae* e ficou conhecido como Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) (Barre-Sinoussi et al. 1983; Levy et al. 1984; Popovic et al. 1984).

Em 1984, foram relatados vários casos de imunodeficiência na África central entre pacientes sem histórico de comportamento de risco (Clumeck et al. 1984; Piot et al. 1984;

Van de et al. 1984). Mais tarde, em 1990, nesta mesma região, o vírus da imunodeficiência símia (SIV) foi isolado no macaco *Cercocebus atys* e um lentivírus muito semelhante ao HIV-1 foi identificado em chimpanzés (Huet et al. 1990). Hoje, a origem do HIV-1 é atribuída ao Vírus da Imunodeficiência Símia (SIVcpz) encontrado em chimpanzés da espécie *Pan troglodytes troglodytes* (Gao et al. 1999). Mais recentemente, outro SIV (SIVgor) com muitas propriedades biológicas necessárias para a infecção em humanos foi descoberto em gorilas selvagens (*Gorilla gorilla gorilla*) (Van et al. 2006; Takehisa et al. 2009).

A evidência mais antiga de infecção pelo HIV-1 em seres humanos data de 1959 em um homem que faleceu devido infecção por *Pneumocistis jiroveci* (Williams et al. 1983). Este estudo indica que o HIV-1 atravessou a barreira das espécies e começou a se disseminar entre humanos anteriormente a esta data. Estudos baseados em taxa de evolução pelo relógio molecular, estimaram que por volta do ano de 1908 o SIVcpz atravessou a barreira das espécies, infectou o ser humano múltiplas vezes e se diversificou (Bailes et al. 2003).

1.2 EPIDEMIOLOGIA DA INFECÇÃO PELO HIV-1

Atualmente, estima-se que 33,3 milhões de pessoas vivem com HIV-1 em todo mundo e quase dois milhões de indivíduos morrem em decorrência da aids todos os anos. A África Sub-Saariana é a região global mais atingida com 22,5 milhões de pessoas infectadas e contabiliza mais de um milhão de mortes relacionadas à aids anualmente (UNAIDS/WHO 2010).

Na América Latina, a epidemia de aids se mantém estável com uma prevalência estimada de 0,6% (0,5 - 0,6%) e o número de pessoas vivendo com HIV-1 foi estimado em 1,4 milhões (1,8 a 2,2 milhões) em 2009 (UNAIDS/WHO 2010). A América Latina é a região que lidera as atividades de prevenção do HIV-1 pelo sistema de saúde pública. Em particular, o Brasil é conhecido pelo programa do Ministério da Saúde (MS), considerado exemplar na prevenção e controle do HIV-1 que tem contribuído para estabilizar e controlar a epidemia no país (Okie 2006).

Desde o início da epidemia de aids no Brasil em 1980 até 30 de junho de 2010, 592.914 casos foram notificados ao Ministério da Saúde. A dimensão continental do Brasil implica em uma distribuição heterogênea do número de casos notificados por região do país. As regiões Sudeste e Sul são mais populosas e abrigam mais de 77% dos casos notificados

(459.748 casos). As regiões Norte e Nordeste representam 17,2% dos casos e a região Centro-Oeste, 5,7%. O Estado de Goiás contribui com 35% dos casos de aids notificados na região Centro-Oeste (Brasil 2010a).

Inicialmente a epidemia da aids era restrita a determinados “grupos de risco”, como o de homens que fazem sexo com homens e o de usuários de drogas injetáveis. Hoje, globalmente a aids acomete homens, mulheres e crianças, ou seja, qualquer indivíduo é vulnerável à infecção pelo HIV-1/aids caso não sejam tomadas as medidas preventivas atualmente conhecidas. Hoje, dos 33,3 milhões de pessoas que estão vivendo com HIV-1 no mundo cerca de 50% são mulheres (UNAIDS/WHO 2010). No Brasil, o cenário epidemiológico reflete a tendência histórica da epidemia da aids sendo caracterizada pela “heterossexualização, feminilização, juvenilização, interiorização e pauperização” (Brasil 2009). A razão de sexo no Brasil diminuiu consideravelmente do início da epidemia para os dias atuais. Em 1986, a razão era de 15 casos de aids em homens para cada caso em mulheres. A partir de 2003, a razão se estabilizou, para cada 15 homens, existem 10 mulheres (Brasil 2010a).

O avanço da infecção pelo HIV-1 em mulheres em idade fértil traz como consequência o número cada vez maior de crianças expostas ao vírus durante a gestação e o risco da transmissão materno-infantil (TMI). A TMI é a principal via de infecção pelo HIV-1 em crianças em todo o mundo (Burns & Mofenson 1999). A prevenção da TMI representou importante avanço no controle da infecção na última década. A taxa de infecção em crianças nascidas de mães infectadas pelo HIV-1 diminuiu significativamente de 500.000 casos em 2001 para 370.000 casos de infecções em 2009 (UNAIDS/WHO 2010). No Brasil, o número de casos de transmissão materno-infantil em menores de 13 anos de idade diminuiu de 1.025 casos notificados em 1998 para 280 casos em 2009. Estes números representam uma redução de aproximadamente 70% da TMI desde a implantação do programa de prevenção da transmissão vertical do HIV-1 em 1996 (Brasil 2010a). A taxa de incidência de aids em crianças com até 11 anos de idade é utilizada para monitorar rotineiramente a transmissão vertical do HIV-1, pois praticamente representa a principal forma de transmissão de quase a totalidade de casos nessa faixa etária (93,9% das notificações) (Brasil 2010a).

1.3 VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA TIPO I: ESTRUTURA E CICLO REPLICATIVO

O HIV-1 é constituído externamente por um envelope formado por uma bicamada lipídica derivada da célula do hospedeiro e as glicoproteínas gp120 e gp41 responsáveis pela entrada do vírus na célula do hospedeiro. Internamente, uma matriz protéica (p17) envolve o capsídeo viral (p24). Dentro do capsídeo esta o genoma viral que consiste de duas fitas simples de RNA associadas a três enzimas virais, denominadas transcriptase reversa (TR), integrase (IN) e protease (PR) (Barre-Sinoussi 1996) (Figura 1).

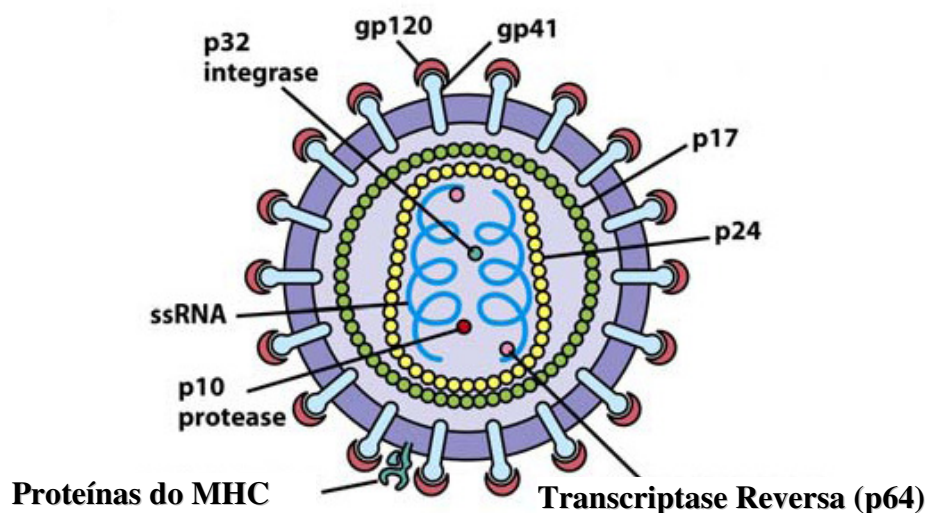


Figura 1: Estrutura do HIV-1.

Fonte: Kuby (2007)

As proteínas virais são codificadas por nove genes, sendo três estruturais (*env*, *gag* e *pol*) e seis funcionais (*tat*, *rev*, *nef*, *vif*, *vpr* e *vpu*) (Figura 2). O gene *pol* codifica uma poliproteína de 160 kilodaltons (KD) que após clivagem proteolítica origina as enzimas virais transcriptase reversa (TR), protease (PR) e integrase (IN). A TR é constituída por dois monômeros: p51 e p66, e representa uma enzima fundamental para o ciclo replicativo do HIV-1, uma vez que é responsável pela síntese de DNA (ácido desoxirribonucléico) a partir do RNA viral (Connor & Ho 1992). Em razão da ausência de capacidade de reparo, a TR não é capaz de corrigir erros que ocorrem durante a retrotranscrição, o que conseqüentemente leva a uma alta taxa de mutações. A PR viral está envolvida no processamento pós-traducional das poliproteínas *gag* (para produzir as proteínas estruturais p24, p17 e p7 do core viral) e *gag-pol*

(para produzir enzimas essenciais como TR e IN). Este processamento gera várias proteínas e enzimas virais, e a PR é necessária para o ciclo replicativo do vírus e importante alvo de terapia antirretroviral (TARV) (Gavin & Yogen 2002). A IN é essencial para incorporação do DNA viral ao DNA da célula do hospedeiro. O genoma viral integrado é denominado “provírus” e servirá de molde para a geração de RNA genômicos e mensageiros quando a célula infectada for ativada e começar a transcrever seus próprios genes (Connor & Ho 1992). A IN também é responsável por outras funções no ciclo replicativo que incluem cooperação na transcrição reversa, importação nuclear dos complexos pré-integração e produção de partículas do vírus (Mulder et al. 2002).

O gene *gag* codifica uma proteína de 55kD, a qual, após clivagem, origina várias proteínas virais da matriz (p17), do capsídeo (p24) e do nucleocapsídeo (p7/p9) (Connor & Ho 1992).

Entre os três genes estruturais, o gene *env* é o que revela maior variabilidade genética. Variações nas sequências dos genes *gag* e *pol* podem levar à formação de vírus inviáveis, mas as sequências *env* aceitam um grande número de substituições, muitas das quais auxiliam no escape a resposta imune do hospedeiro (Connor & Ho 1992).

As repetições terminais longas (LTRs) são sequências idênticas que se localizam em cada extremidade do genoma (5' e 3') e regulam a integração do genoma viral ao genoma da célula do hospedeiro, a expressão de genes virais, bem como sua replicação (Peng et al. 1989). O gene *tat* regula a transcrição destas LTRs pela ligação aos RNAs recém-transcritos. O gene *rev* promove o transporte do RNA mensageiro (RNAm) do núcleo para o citoplasma para tradução de novas proteínas de *env*, *gag* e *pol*. O gene *nef* está envolvido na replicação do HIV-1 *in vivo*. O gene *vif* desempenha um papel importante na fase de maturação viral mediante o desenvolvimento da estrutura cônica do capsídeo, que está envolvida na infectividade dos vírions em células não infectadas. O gene *vif* também, pode interromper a atividade antiviral da enzima humana APOBEC (enzima citidina desaminase que muda ácidos nucleicos virais) por degradação proteossômica, inibindo sua entrada nos vírions. O gene *vpr* atua na liberação de vírions de células infectadas mediante o brotamento das partículas virais recém produzidas. O gene *vpr* se liga ao complexo de pré-integração facilitando o transporte do material genético até o núcleo e atua na replicação viral em células que não estão em divisão (Barre-Sinoussi 1996, Miller et al. 2007, HIV Database 2010a). A Figura 2 representa a organização genômica do HIV-1.

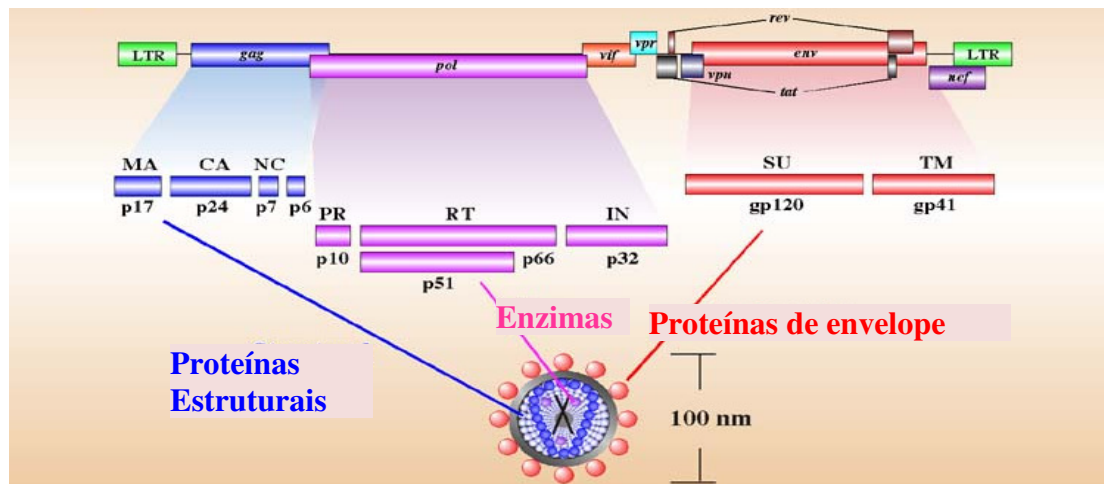


Figura 2: Organização genômica do HIV-1.

MA= Matriz; CA=capsídeo; NC=nucleocapsídeo; PR=protease; RT=Transcriptase Reversa; IN=integrase; SU=superfície; TM=Transmembrânica.

Fonte: Universidade de Stanford. <http://www.stanford.edu/group/virus/retro/2005gongishmail/HIV-1.html>

Os principais eventos do processo de entrada do vírus na célula do hospedeiro são divididos entre os eventos de ligação com os receptores e co-receptores e eventos de fusão do envelope do vírus com a membrana da célula alvo. A unidade funcional do envelope é um trímero composto de três moléculas gp41 e três moléculas gp120, as quais são associadas por interações não-covalentes. A associação não-covalente destas subunidades permite mudanças significativas na conformação destas glicoproteínas. A gp120 deve ser flexível para permitir a mudança conformacional e ao mesmo tempo manter contato com a gp41. Esta flexibilidade garante a integridade do trímero após ligação com a molécula CD4 e permite as transições da gp41 durante o processo de fusão (Pancera 2010). A entrada do vírus se inicia com a ligação da gp120 com o primeiro domínio *Ig-like* da molécula CD4 da célula alvo. A ligação com o CD4 resulta em uma reconfiguração da molécula gp120. O “assoalho” da molécula se estabiliza e a alça V3 é exposta. Os domínios da alça V3 interagem com a segunda alça extracelular dos co-receptores CCR5 ou CXCR4. A estequiometria do complexo trimérico gp120:CD4:co-receptor é 1:1:1. Após interação com o co-receptor, peptídeos hidrofóbicos da gp41 (peptídeos de fusão) são inseridos na membrana da célula alvo. Este evento ancora o vírus na membrana da célula do hospedeiro, e a gp41 age como uma ponte entre o vírus e a membrana celular. As regiões C- e N-terminal das regiões hepta-repetidas da gp41, conhecidas como HR1 e HR2 se emparelham formando um complexo prefusional estável composto por seis α -hélices do tipo helicoidal. Este emparelhamento da HR1 com a HR2 promove a aproximação e contato entre a membrana celular e o envelope viral, formação de

poros de fusão e liberação do capsídeo no citoplasma da célula hospedeira (Eckert & Kim 2001).

A molécula CD4 é o receptor primário utilizado pelo HIV-1 para iniciar o mecanismo de entrada na célula alvo. Em 1996, o grupo de pesquisa liderado por Edward Berger descreveu o primeiro co-receptor para o HIV-1, denominado CXCR4. A molécula de CXCR4 é um receptor para quimiocinas, cujo ligante natural é o SDF-1 (do inglês, *Stromal Derived Factor 1*) e está presente na membrana dos linfócitos T. Posteriormente, foi descrito outro co-receptor para o HIV-1, o receptor para quimiocinas – CCR5, presente na membrana de macrófagos (Alkhatib et al. 1996). A molécula CCR5 é o receptor natural para as quimiocinas RANTES, MIP1 α e MIP1 β . Os co-receptores CXCR4 e o CCR5 são considerados os mais importantes para mediar infecção de célula alvo (Levy 1996; Rucker et al. 1996). Entretanto, existem outros co-receptores para HIV-1 descritos, como o CCR2 e o CCR3 que são receptores fisiológicos para as quimiocinas MCP-1/CCL2 e RANTES/CCL5, MCP-3/CCL7, MCP-4/CCL13, eotaxina-2/CCL24, eotaxina-3/CCL26 expresso em eosinófilos e nas células da microglia, podendo resultar em doença do sistema nervoso central (He et al. 1997; Ross & Cullen 1998).

Após a entrada do vírus na célula, o RNA viral é transcrito em DNA proviral pela TR. O processo de transcrição reversa ocorre no citoplasma da célula, 4-6 horas após a infecção. Como há um intenso e rápido *turnover* do HIV-1, pode ocorrer erros de incorporação de nucleotídeos pela transcriptase reversa (TR) levando a inserções, deleções e substituições durante a transcrição do RNA viral em cDNA (Bebenek et al. 1989). A TR também tem baixa afinidade pela fita molde de RNA que permite a enzima saltar de uma fita para outra gerando uma fita de cDNA com alterações e conseqüentemente gerar recombinantes intra ou intersubtipos contribuindo para a alta diversidade genética do vírus (Stuhlmann & Berg 1992).

O cDNA viral é transportado para o núcleo a partir de complexos de pré-integração e é então integrado ao DNA da célula hospedeira mediante ação da enzima viral IN. O genoma viral integrado ao genoma da célula hospedeira é denominado “provírus”. O DNA proviral integrado ao genoma da célula hospedeira servirá de molde para a geração de RNA genômicos quando a célula infectada for ativada e começar a transcrever seus próprios genes. As células infectadas pelo HIV-1 e com DNA proviral integrado podem ser ativadas por citocinas da resposta imune celular, como IL-2 e fator de necrose tumoral (TNF),

desencadeada pelo próprio processo infeccioso gerado pelo HIV-1 (Freed 2001). A ativação celular resulta na ativação da expressão gênica e ativação da RNA polimerase que inicia o processo de transcrição gênica. No entanto, as RNA polimerases são incapazes de transcrever sequências maiores que algumas centenas de nucleotídeos. Assim, a proteína viral *tat* liga-se ao RNAm e aumenta a capacidade de transcrição da RNA polimerase, permitindo a formação de RNAm virais funcionais que são transportados para fora do núcleo para serem traduzidos. Durante a tradução, primeiramente são sintetizados os genes reguladores e acessórios e depois os genes estruturais (Turner & Summers 1999, Swanson et al. 2004).

A montagem das partículas virais infecciosas ocorre mediante o empacotamento do genoma viral, das proteínas codificadas pelo gene *gag* (p17, p24 e p7/p9) e das enzimas codificadas pelo gene *pol* (TR, PR e IN). O complexo nucleoproteína é inserido em um envelope contendo as glicoproteínas virais gp120 e gp41. A liberação dos vírions ocorre por brotamento da membrana plasmática da célula infectada e as novas partículas virais liberadas são capazes de infectar outras células após o processo de maturação que ocorre no meio extracelular, dando continuidade ao ciclo infeccioso (Turner & Summers 1999, Freed 2001).

A Figura 3 mostra resumidamente o mecanismo de replicação do HIV-1 na célula do hospedeiro.

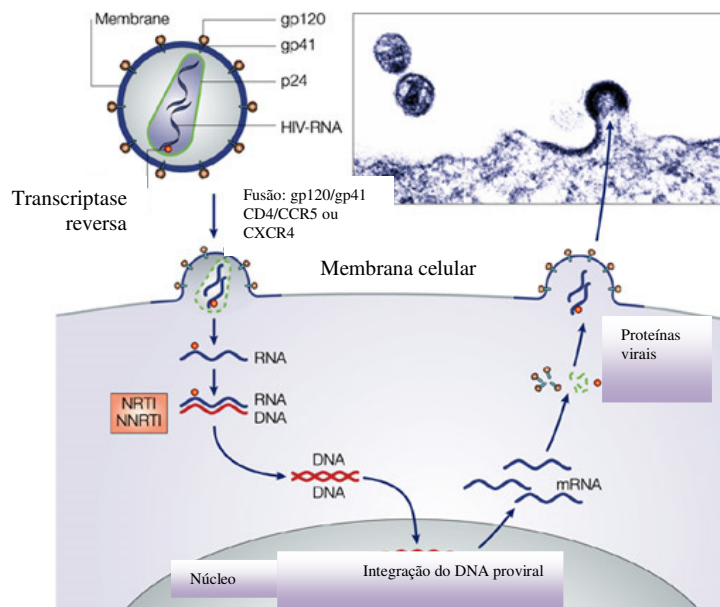


Figura 3: Ciclo replicativo do HIV-1.
Fonte: Simon & Ho (2003).

1.4 A DIVERSIDADE GENÉTICA DO HIV-1

De acordo com análise filogenética utilizando o genoma do ancestral comum, o HIV-1 foi classificado em dois tipos, HIV-1 e HIV-2. O HIV-2 é restrito a algumas regiões da África e raros casos em outros continentes, enquanto o HIV-1 é responsável pela pandemia. À diversidade genética do HIV-1 foi proposto um sistema de classificação baseado em grupos, subtipos, sub-subtipos e formas recombinantes circulantes. O HIV-1 compreende os grupos M (*Main*), N (*non-M, non-O*), O (*outlier*) e, mais recentemente, grupo P (Simon et al. 1998; Robertson et al. 2000; Plantier et al. 2009). O grupo M é caracterizado em nove subtipos (A-D, F-H, J e K), 4 sub-subtipos do subtipo A: A1, A2, A3 e A4 e dois sub-subtipos do subtipo F: F1 e F2, 51 formas recombinantes circulantes (CRFs) e formas recombinantes únicas (URFs) (HIV-1 Database 2010a).

Os sub-subtipos são assim classificados quando amostras distintas estão particularmente relacionadas a um determinado subtipo, mas não são geneticamente distantes o suficiente para serem designadas como um novo subtipo. As CRFs são formas híbridas descendentes de um mesmo evento de recombinação entre dois subtipos diferentes desde que não haja vínculo epidemiológico entre os indivíduos comparados. Para nomeá-las é estabelecido um número, relacionado à ordem de descrição, seguido dos subtipos envolvidos na recombinação, por exemplo: o primeiro recombinante descrito entre os subtipos A e E: CRF01_AE. Existem CRFs complexos formados a partir da recombinação de mais de 2 subtipos que são denominados CRFs cpx (complexo) (Robertson et al. 2000). Existem ainda as formas recombinantes únicas (URF) cujas cepas virais não constituem um grupo filogenético definido, identificado em apenas um indivíduo ou grupo de indivíduos com vínculo epidemiológico (Robertson et al. 2000).

As assinaturas dos subtipos têm sido marcadores epidemiológicos importantes para traçar o curso da pandemia pelo HIV-1. Assim, a África Central abriga a maior diversidade do grupo M, sendo, provavelmente, o local onde se iniciou a transmissão zoonótica e a diversificação regional, tornando-se o epicentro da pandemia do HIV-1 (Vidal et al. 2000). A partir daí, a distribuição heterogênea e a predominância de diferentes subtipos genéticos nas diferentes regiões do mundo reforçam a teoria do efeito fundador, ou seja, introdução única com rápida propagação da variante genotípica introduzida na região (Rambaut et al. 2001).

Segundo estimativas da distribuição global dos subtipos genéticos do HIV-1 em 2004, o subtipo C contribuiu com 50% dos casos, seguido do subtipo A (12%) e B (10%) e juntas, as CRFs foram responsáveis por 18% das infecções no mundo (Hemelaar et al. 2006). No Brasil, o padrão de distribuição dos subtipos do HIV-1 indica que o mais freqüente é o subtipo B (80 – 90%), seguido do F (10 - 15%) e C (5%) (Brindeiro 2003), além da presença de seis CRFs designadas como CRF28_BF e CRF29_BF (de Sa Filho et al. 2006; Sanabani et al. 2006), CRF31_BC (Santos et al. 2006), CRF39_BF, CRF40_BF (Guimaraes et al. 2008) e CRF46_BF1 (Sanabani et al. 2010).

A região Sul tem um perfil diferenciado, pois há predomínio da infecção pelo subtipo C do HIV-1, seguido do subtipo F e recombinantes BC (Soares *et al.* 2003; Soares *et al.* 2005). Acreditava-se que as cepas do subtipo C introduzidas no sul do Brasil eram oriundas de Moçambique (África), mas esta teoria não foi sustentada pela análise filogenética (de Macedo Brigido 2009; Fontella et al. 2009). Além disso, há estreita relação entre as cepas do subtipo C circulantes no sul do país com as cepas do subtipo C de Burundi na África (Bello et al. 2008).

Estados da região Norte, como o Estado de Tocantins desmembrado do Estado de Goiás recentemente, apontaram baixa prevalência do subtipo F (2%), quase 6% do subtipo C e 13,5% de formas recombinantes BF e CF (Coelho et al. 2011). Na região Centro-Oeste, a epidemia de aids, assim como no sudeste, norte e nordeste do país, também é predominada pelo subtipo B (~80%), seguido do subtipo F e com grande prevalência das CRFs. Um dos primeiros trabalhos sobre diversidade genética na região mostrou 14,5% de CRFs, com predomínio dos mosaicos BF (10-16%), 4 casos de recombinantes BC (Goiás e Mato Grosso) e um caso CD em Mato Grosso do Sul. O Subtipo F correspondeu a 2,5% dos subtipos e foi identificada uma baixa circulação do subtipo C (1,5%) detectado apenas no Estado de Goiás (Stefani et al. 2000; Stefani et al. 2007). Resultados semelhantes foram descritos no Distrito Federal, neste mesmo período (Cerqueira et al. 2003, Vêras et al. 2007). Atualmente, a epidemia no Centro-Oeste tem mostrado crescente prevalência dos subtipos não-B com circulação dos mosaicos BF1, BC, F1C, F1CB e DF1, inclusive dos CRF29_BF-like e CRF31_BC-like e com prevalência do subtipo C variando de 3 a 10% (Alcântara et al. 2009; Cardoso et al. 2009; Cardoso et al. 2010; Ferreira et al. 2011; Silveira et al. 2011). A prevalência do subtipo C e recombinantes BC tem aumentado na região Sudeste (Bello et al. 2006; Brígido et al. 2011) e a estreita relação econômica do Centro-Oeste com o Sul e Sudeste

do país pode proporcionar rotas de transmissão de subtipos e CRFs que circulam naquela região. Essa estreita relação entre Sudeste e o centro-Oeste pode estar contribuindo para que mosaicos caracterizados na região Sul como o CRF31_BC (Santos et al. 2006) e CRF29_BF descrito em São Paulo (Sanabani et al. 2006) sejam identificados no Centro-Oeste brasileiro.

O imenso polimorfismo genético do HIV-1 tem como alguns dos principais fatores o rápido *turnover* do HIV-1 com cerca de 10^{10} vírions produzidos por dia, a alta taxa de replicação viral e a alta taxa de erros de incorporação de nucleotídeos pela transcriptase reversa (TR) (Bebenek et al. 1989). Além disso, a alta taxa de mutações e recombinações resulta em uma população com inúmeras variantes virais mutantes não idênticas, mas relacionadas. Essas variantes virais em contínua mutação são denominadas *quasispecies* (Goodenow et al. 1989; Wain-Hobson 1989).

A notável variabilidade genética do HIV-1 representa não só um dos maiores desafios para o desenho de vacinas como tem implicações diretas no diagnóstico sorológico e molecular da infecção. O monitoramento da diversidade e disseminação do vírus em diferentes regiões do mundo contribui para a tomada de decisões na política de saúde pública para a prevenção e tratamento da infecção.

1.5 CURSO CLÍNICO DA INFECÇÃO PELO HIV-1

A infecção primária ou fase aguda da infecção pelo HIV-1 é geralmente assintomática e corresponde ao período de alta viremia. Geralmente as manifestações surgem de duas a quatro semanas após a contaminação e podem apresentar características clínicas inespecíficas como febre, linfadenopatia, cefaléia, mialgia, artralgia, anorexia, náusea, vômito, diarreia e exantema maculopapular eritematoso. Mas o curso da fase aguda é autolimitante e rápido, cessando em até 30 dias. A infecção primária de curso mais severo tem sido relacionada a uma rápida progressão da doença. Nesta fase, os exames laboratoriais demonstram uma diminuição na contagem de células T CD4+, que geralmente é transitória (Bartlett & Moore 1999).

A soroconversão do paciente em geral ocorre após duas a seis semanas do contágio e antes desse período, os testes sorológicos para a detecção de anticorpos anti-HIV-1 são negativos em decorrência da pequena quantidade de anticorpos produzida e a sensibilidade dos testes. Este período é conhecido como “janela imunológica” e nesta etapa, a resposta

imune adaptativa é capaz de controlar parcialmente a infecção e a replicação viral (Staprans & Feinberg 2004).

Com a resolução do quadro de infecção primária e a soroconversão, o paciente entra na fase crônica da infecção assintomática sendo conhecida como fase de latência clínica do HIV-1. Esta fase pode durar de vários meses a alguns anos. A replicação viral é mantida nos órgãos linfóides, porém, identifica-se um processo de equilíbrio dinâmico no qual a destruição das células $CD4^+$ é parcialmente contrabalanceada pela sua produção. Portanto, ocorre uma destruição lenta e gradativa de células T $CD4^+$, macrófagos e células dendríticas (Bartlett & Moore 1999, Geskus et al. 2007).

Ao final do período de latência, com o declínio constante de células T $CD4^+$, o sistema imune começa a evidenciar a sua fragilidade frente ao HIV-1: a contagem absoluta de células T $CD4^+$ pode cair abaixo de 200 céls/mm³ e algumas doenças oportunistas começam a aparecer, caracterizando o início da infecção sintomática pelo HIV-1 e o paciente desenvolve a aids (Karon et al. 1992, Bartlett & Moore 1999, Staprans & Feinberg 2004). A Figura 4 representa a progressão natural da infecção pelo HIV-1.

O estadiamento clínico pode utilizar como critérios a sintomatologia e a quantificação dos linfócitos T $CD4^+$. O Centro para Controle de Doenças dos EUA (CDC- *Center for Diseases Control*) utiliza o critério imunológico à época do diagnóstico para definir os estágios 1 e 2. A definição, do estágio 3 leva em conta também a sintomatologia (CDC 2008a):

- Estágio 1: linfócitos T $CD4^+$ > 500 células/ μ L (>29% do total de linfócitos);
- Estágio 2: linfócitos T $CD4^+$ entre 200 e 499 células/ μ L (14-28%);
- Estágio 3: linfócitos T $CD4^+$ \leq 200 células/ μ L (<14%) e/ou presença de um dos 26 critérios (Anexo I) clínicos de definição de aids (CDC 2008b). Pacientes no estágio 3 são clinicamente considerados como caso de aids.

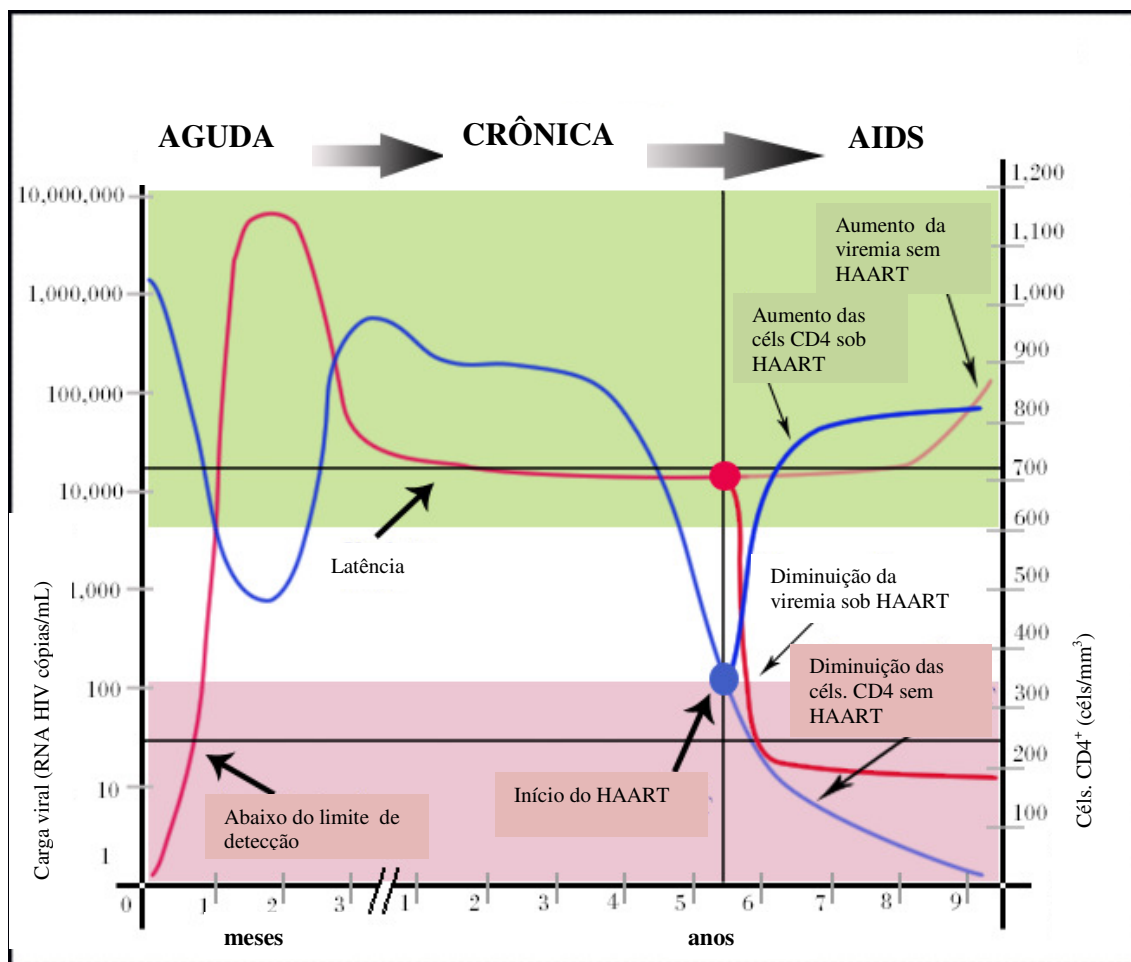


Figura 4: Infecção pelo HIV-1: dinâmica da carga viral e das células T CD4⁺.

Fonte: <http://www.metapathogen.com/HIV-1/HIV-1-disease-progression.html> (adaptado)

Ainda não há um consenso na categorização dos pacientes, baseada na duração da fase assintomática. Algumas classificações clínicas têm sido descritas na literatura incluindo progressores rápidos, progressores típicos, progressores lentos (*long-term nonprogressors*) e “controladores de elite”. Em geral, pacientes que após soroconversão apresentam rápido declínio de células TCD4⁺ progridem para aids em um período de tempo inferior a cinco anos e são denominados progressores rápidos. Aproximadamente 70% dos indivíduos infectados pelo HIV-1 são progressores típicos, ou seja, desenvolvem aids dentro de 8 a 10 anos da infecção. Já indivíduos infectados pelo HIV-1 cujos níveis de células T CD4⁺ declinam lentamente, mantendo níveis praticamente normais por aproximadamente 10 anos, na ausência de TARV, são denominados progressores lentos. O pequeno grupo (0,1 a 1,0%) denominado “controladores de elite” é caracterizado pela persistência de carga viral

indetectável por até 25 anos ou mais (Soogoor & Daar 2005; Saksena et al 2007; Deeks & Walker 2007).

Recentemente, a literatura tem mostrado que a condição clínica nos “controladores de elite” não é dirigida por vírus com defeitos genéticos. Entretanto, alguns vírus são atenuados em consequência da pressão seletiva exercida pelo sistema imune. Os controladores de elite apresentam este fenótipo provavelmente devido a fatores genéticos do hospedeiro que permitem uma resposta imune celular robusta para controlar a replicação viral e os reservatórios (Autran et al. 2011). Os “controladores de elite” têm sido alvo de pesquisas que buscam entender os mecanismos desta “cura funcional”, buscando alvos para novas estratégias terapêuticas (Richman et al. 2009; Trono et al. 2010). Para entender os fatores envolvidos no curso clínico da infecção pelo HIV-1 é preciso entender a imunopatogênese da infecção levando em consideração a influência dos fatores genéticos, imunológicos e virais.

1.6 IMUNOPATOGÊNESE DO HIV-1

Em julho de 2010, durante seminário sobre indivíduos expostos e resistentes ao HIV-1 realizado nos EUA, a designação para os indivíduos de alto risco expostos ao HIV-1 e não infectados foi padronizada para “indivíduos soronegativos altamente expostos” (HESN – *‘highly exposed seronegative’ subjects*). Estes indivíduos são definidos coletivamente como aqueles que não fazem soroconversão e não têm evidência de infecção apesar da frequente exposição ao HIV-1 e/ou repetido comportamento de alto risco em áreas de alta prevalência da infecção (Horton et al. 2010). Entre estes indivíduos estão as profissionais do sexo de Nairobi e do Kenya na África, casais soro-discordantes, usuários de drogas injetáveis e crianças que nascem de mães infectadas pelo HIV-1 que são expostas ao vírus durante o parto vaginal e/ou amamentação e não se infectam (Fowke et al. 1996; Pallikkuth et al. 2007; Tiemessen et al. 2009).

Este grupo de indivíduos bem como os *long-term non-progressors* e os “controladores de elite” chamam atenção para o fato de que existem diferenças individuais intrínsecas no sistema imune, estreitamente relacionadas com a proteção eficaz caracterizada por diferentes respostas imunológicas contra a infecção pelo HIV-1.

1.6.1 - IMUNIDADE INATA

A maioria dos casos de transmissão do HIV-1 ocorre através da exposição de mucosas ricas em células de Langerhans e macrófagos que expressam o co-receptor CCR-5. A família das β -quimiocinas, em particular a CCL3 (ou MIP-1 α), a CLL4 (ou MIP-1 β) e a CCL5 (ou RANTES), desempenha papel primordial na resistência a infecção por competir com o HIV-1 pelo uso do co-receptor CCR5 nas células-alvo. Ao mesmo tempo, as β -quimiocinas auxiliam na disseminação do HIV-1 por promoverem a migração de células (alvo em potencial) para os tecidos infectados (Weinberg et al. 2006).

A secreção de peptídeos antimicrobianos pelas células epiteliais de mucosas tem sido relacionada a um papel protetor na infecção pelo HIV-1. Entre os peptídeos antimicrobianos com atividade antiviral descritos estão o inibidor da PR leucocitária secretória (SLP1) presente na saliva e a lactoferrina presente no leite materno e em secreções (McNeely et al. 1995; Groot et al. 2005). Outros peptídeos antimicrobianos como as α e β -defensinas secretados pelas células epiteliais têm sido identificados como substâncias que podem aumentar a proteção contra a infecção pelo HIV-1. No entanto, existem controvérsias quanto ao papel protetor das defensinas. Iqbal et al. (2009) demonstraram que apesar da atividade antiviral HIV-1, o aumento destas substâncias na secreção vaginal de profissionais do sexo foi associada com maior risco de transmissão do HIV-1 devido a associação com outras doenças sexualmente transmissíveis, vaginoses e inflamação da mucosa vaginal. Não existe consenso sobre a ação anti HIV-1 das α -defensinas presentes no leite materno (Bosire et al. 2007). Apesar da conhecida ação antiviral dos peptídeos antimicrobianos secretados pelas células epiteliais, é pouco provável que estes fatores antivirais possam realizar uma barreira completa à infecção. As células do sistema imune inato como as células dendríticas (DC) e as células *natural killer* (NK) podem reforçar a barreira natural contra a infecção pelo HIV-1 (Mailliard et al. 2003).

As DCs parecem ter um papel importante na patogênese do HIV-1 não só nos estágios iniciais de transmissão, mas também no curso da infecção pelo HIV-1 (Turville et al. 2001). Existem basicamente duas populações de células dendríticas: as mielóides (mDC) e as plasmocitóides (pDC). A entrada do HIV-1 nas mDC é mediada por vários receptores de entrada como as moléculas CD4, CCR5, CXCR4, CCR3, CCR8, CCR9 e CXCR6, DC-SIGN (ICAM-3 específica de DC), *langerrinas* como CD207 ou CLEC4K e imunorreceptores (DCIR) como CLEC4a (Wu & KewalRamani 2006). Por outro lado, a entrada do vírus nas pDC é mediada basicamente pela molécula CD4 e CXCR4 (Schmidt et al. 2005). A interação

HIV-1-DC-SIGN leva a internalização do HIV-1 mantendo-o intacto no endossomo, e ao transportar o vírus para os linfonodos, as DCs aumentam a probabilidade de infecção dos linfócitos T CD4⁺ e, conseqüentemente, a rápida disseminação do vírus pelas células hospedeiras (Sabatte et al. 2007). A internalização do HIV-1 dependente das *langerrinas* mediada pelas células de Langerhans leva à degradação do vírus mediante ação dos grânulos de *Birbeck*, impedindo que o vírus chegue intacto aos linfonodos. Neste caso, as células de Langerhans funcionariam como uma barreira para a infecção pelo HIV-1 (de Witte et al. 2007). Portanto, o destino do HIV-1 depende dos receptores das células dendríticas (DCs) utilizados para a ligação do vírus HIV-1 e isto vem enfatizar o quanto os diferentes subtipos de DC podem contribuir para ou impedir a infecção pelo HIV-1.

Apesar das pDC de indivíduos saudáveis secretarem grande quantidade de interferon tipo I (IFN tipo I) em resposta a estimulação pelos receptores semelhantes ao *toll – Toll Like Receptors* (TLR7 e TLR9), não há consenso sobre como estas células se comportam durante a infecção pelo HIV-1. Beignon et al. (2005) demonstraram que o reconhecimento do RNA viral pelo TLR-7 leva a pDC a produzir IFN tipo I, quimiocinas e outras citocinas pró-inflamatórias contribuindo para a resposta imune inata contra o HIV-1. Por outro lado, Benlahrech et al. (2011) demonstraram que as pDC perdem a capacidade de estimular células NK via produção de IFN tipo I. Além disso, as pDC podem induzir a diferenciação das células T reguladoras (Treg) que são potentes produtoras de IL-10 e, com isso, suprimir a ativação de células T efectoras (Manches et al. 2008). As pDC podem também ser responsáveis pela diminuição das células T_H17 durante infecção pelo HIV-1 levando a translocação microbiana e perda da integridade intestinal promovendo a progressão mais rápida para a aids (Brenchley et al. 2006; Favre et al. 2010). Acredita-se que a ação da IL-10 sobre as mDC e a baixa sinalização do HIV-1 via TLR-7 nestas células impedem a maturação e comprometem a capacidade de ativar uma resposta imune adaptativa efetiva contra o HIV-1 (Sabado et al. 2010). No entanto, Benlahrech et al. (2011) não demonstraram alteração funcional nas mDC durante infecção pelo HIV-1.

As DCs podem promover a ativação das células *natural killer* (NK). As células NK promovem atividade antiviral e antitumoral mediante a produção de citocinas pró-inflamatórias e pela lise de células infectadas ou alteradas. Além disso, as células NK podem interagir com as células T modulando a magnitude da resposta imune adaptativa (Mailliard et al. 2003). A maioria (90%) das células NK circulantes no sangue periférico são CD56^{low} e,

constitutivamente, produzem grande quantidade de grânulos citotóxicos e têm grande capacidade lítica. Estas células são consideradas funcionalmente e fenotipicamente maduras e expressam receptores semelhantes à imunoglobulinas (KIRs) CD94 ou NKG2A e receptores de citotoxicidade natural (NCRs). Os receptores CD94 ou NKG2A reconhecem HLA-E. As outras células NK são CD56^{high} e são consideradas imunoreguladoras por secretarem grande quantidade de citocinas pró-inflamatórias. Estas células têm baixa expressão de KIR (Lanier 2008).

Os mecanismos pelos quais as células NK reconhecem o HIV-1 ainda não estão elucidados. Elas podem reconhecer o HIV-1 diretamente mediante seus receptores ou indiretamente via CD16 (receptor para a porção Fc da IgG). Os receptores KIR3DS1 e KIR3DL1 parecem ser receptores importantes para o reconhecimento dos peptídeos do HIV-1 apresentados via HLA-B Bw4-80I durante a fase aguda da doença. Estes receptores KIR3DS1 e KIR3DL1, podem levar à ativação das células NK e têm sido associados a mecanismos protetores naturais contra a infecção pelo HIV-1 e, em caso de infecção, a uma progressão lenta para a aids (Alter et al 2007). Barbour et al. (2007) concluíram que as moléculas HLA-B Bw4-80I e KIR3DS1 são protetoras, com KIR3DS1 associado com a contagem de células T CD4⁺ elevada durante estágios iniciais da doença enquanto a molécula HLA Bw4-80I encontra-se associada com a redução da carga viral.

Durante a infecção pelo HIV-1, diversos estudos têm mostrado que as células NK podem sofrer alterações funcionais importantes que contribuiriam para maior infectividade do vírus e progressão da doença. Uma destas alterações é a diminuição do conteúdo de *granzima A* e *perforina* que reduzem a capacidade citotóxica da célula (Portales et al. 2003). A expressão aberrante de receptores nas células NK como a diminuição da expressão dos receptores NCR pode prejudicar a capacidade de *clearance* viral destas células na fase aguda da infecção. Pode haver ainda redução da ativação dos mesmos, o que faria com que as células NK contribuam para a progressão da doença por lisarem as células CD4⁺ infectadas (de Maria et al. 2003; Vieillard Strominger & Debre 2005). Outra alteração importante é a presença de maior número de células NK anérgicas na circulação periférica, ou seja, células com expressão incompleta dos marcadores de ativação (HLA-DR⁺CD69⁺CD56⁻CD3⁻CD25⁻NKp44⁻) (Fogli et al. 2004).

As células NK CD4⁺ e CXCR4⁺ podem ser infectadas pelo HIV-1 que ao executar os mecanismos de escape acabam por fazer destas células reservatórios virais importantes. A

expressão da proteína nef (fator negativo) do HIV-1 leva à diminuição da expressão das moléculas de HLA-A e HLA-B, mas não do HLA-E e/ou HLA-C. Com isso, os linfócitos T citotóxicos restritos ao HLA-A e HLA-B não reconhecem os epítomos antigênicos e as células NK poderão continuar inibidas via KIR que normalmente interagem com HLA-E e HLA-C (Bonaparte & Barker 2004).

Resumidamente, durante a fase aguda da infecção pelo HIV-1 a resposta imune natural seria conduzida pelas DCs que, uma vez ativadas, secretariam IL12, IL15, IL18 e IFN tipo I que estimulariam as células NK. As células NK ativadas secretariam IFN γ o qual promoveria a maturação das células DC e estimularia a resposta Th1. No entanto, esta resposta imunológica parece ser prejudicada durante a infecção pelo HIV-1 (Altfeld et al. 2011).

Outras células primordiais na resposta imune contra qualquer agente infeccioso são os macrófagos, mas na infecção pelo HIV-1 os macrófagos representam alvo fácil para o estabelecimento e manutenção de reservatórios virais latentes. Além dos macrófagos serem encontrados em muitos órgãos e tecidos e a expressarem o co-receptor CCR5, estas células mantêm a viabilidade e a produção de novos *virions* por pelo menos trinta dias (Kelly et al. 2008).

A infecção dos macrófagos pelo HIV-1 dispara uma resposta imune mediada por citocinas pró-inflamatórias que podem tanto auxiliar na proteção como contribuir para a progressão da doença. A liberação das quimiocinas pode aumentar o tráfego de células infectadas e favorecer a disseminação do vírus. As quimiocinas podem também, aumentar o tráfego pela barreira hemato-encefálica de monócitos CD16^{high} infectados, contribuindo para a instalação de reservatórios no sistema nervoso central e, aumentando o risco de desenvolvimento da demência associada ao HIV-1 na fase crônica da doença (Ancuta et al. 2006; Dunfee et al. 2006).

Tem sido demonstrado que a TARV atualmente utilizada não atua sobre os macrófagos da mesma forma que age nos linfócitos. As concentrações das drogas antivirais dentro dos macrófagos são menores do que dentro dos linfócitos (Gavegnano & Schinazi 2009). Além disso, a penetração das drogas pela barreira hemato-encefálica não é tão eficiente como em muitos outros tecidos, não alcançando os reservatórios teciduais do HIV-1 (McGee et al. 2006). Por isso, recente artigo de revisão (Govegnano & Schinazi 2009) afirma que a

erradicação da infecção sistêmica do HIV-1 só seria possível se houvesse o *clearance* das células infectadas latentes. Para que isso ocorra é preciso entender a farmacologia das drogas antivirais nos macrófagos e, subsequentemente, eliminar a infecção produtiva nestas células.

1.6.2 - MECANISMOS ANTIVIRAIS INTRACELULARES – “IMUNIDADE INTRÍNSECA”

As células podem apresentar atividades celulares autônomas intrínsecas que suprimem a replicação viral: que são coletivamente chamadas de fatores de restrição. A imunidade “intracelular” ou “intrínseca”, mais rápida do que a tradicional resposta imune inata e resposta imune adaptativa, tem sido assim chamada por compreender fatores intracelulares responsáveis pela defesa do hospedeiro contra determinados agentes infecciosos e prevenir a instalação da infecção. A idéia de que determinados genes poderiam codificar inibidores da replicação retroviral teve sua origem a partir de estudos em camundongos a partir de 1960, e levaram a descoberta dos fatores antivirais Fv1 e Fv4 (Odaka & Yamamoto 1966).

Hoje, em humanos, a proteína melhor caracterizada e conhecida pela capacidade de inativar vários retrovírus como o HIV-1 são as enzimas que editam a apolipoproteína B (*apolipoprotein B mRNA-editing enzyme* – APOBEC). APOBEC são proteínas do grupo das citidina deaminases e incluem as proteínas APOBEC1, APOBEC2 e APOBEC3A, APOBEC3B, APOBEC3C, APOBEC3DE, APOBEC3F, APOBEC3G E APOBEC3H e APOBEC4 (Jarmuz et al. 2002; Rogozin et al. 2005). Estas proteínas têm como alvo as citosinas e as convertem em uracilas (C para U) na fita de DNA ou RNA. Durante a síntese da segunda fita de DNA as transições de C para U são todas convertidas de guanina para adenina (G para A) (Teng et al. 1993).

Entre todas as APOBECs, a APOBEC3G é a mais estudada e parece ser a que tem maior efeito antiviral. Depois da entrada do vírus na célula e do desencapsulamento, a TR inicia a transcrição do RNA em cDNA. Durante a síntese da primeira fita de DNA proviral, a deaminação dos resíduos de citosina (C) dependente das APOBEC3G e APOBEC3F resulta no acúmulo excessivo de uracila (U). A uracila é reconhecida como timina (T) pela TR e a adenina (A) é incorporada à segunda fita de DNA no lugar de guanina (G). Esta mutação no genoma viral bloqueia a replicação do vírus porque as N-glicosidases de uracila - retiram as uracilas do DNA que é clivado pelas enzimas de reparo. Alternativamente o bloqueio pode

ocorrer porque após a nova troca de G para A e *splicing* alternativo poderia haver produção de proteínas virais não-funcionais. Em geral a hipermutação mediada pela APOBEC3G seria fatal, dependendo do número de eventos de deaminações no genoma viral e do sítio específico de ação da enzima que é preferencialmente nos dinucleotídeos GG (Mangeat et al. 2003).

A atividade antiviral da APOBEC é inibida pela proteína vif ou fator de infectividade viral. A interação física da proteína vif com a APOBEC3G induz a poliubiquitinação da APOBEC3G que é então degradada pelo proteasoma impedindo a encapsulação desta proteína aos virions (Marin et al. 2003; Sheehy et al. 2003). Desta forma pode ocorrer um desequilíbrio entre APOBEC3G – vif, pois ao mesmo tempo em que algumas proteínas associadas ao complexo vif /APOBEC3G como a ubiquitina ligase e a *cullin-5*, propiciam a ubtiquinação da APOBEC, elas aumentam a estabilidade da proteína vif por mais tempo na célula do hospedeiro. Além disso, durante o processo de infecção viral a expressão da proteína vif também culmina com uma redução da expressão das APOBECs (Stopack et al. 2003). A Figura 5 representa a ação antiviral da APOBEC3G e o mecanismo de infectividade do HIV-1 mediada pela proteína vif.

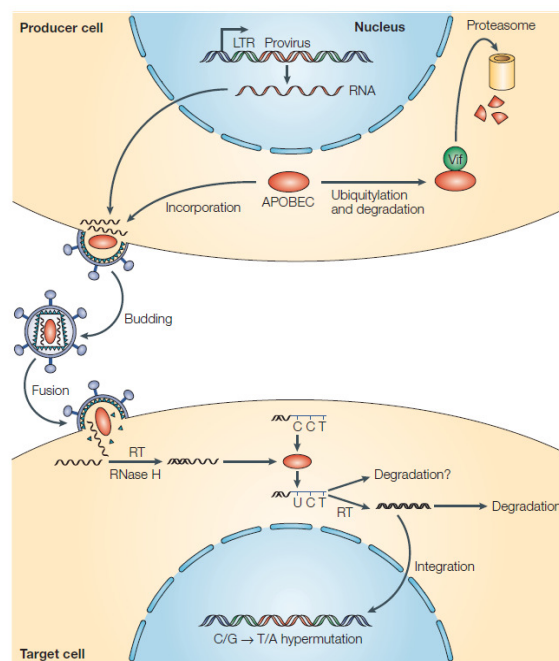


Figura 5: APOBEC e VIF envolvidas com a infectividade do HIV-1

FONTE: Harris & Liddament (2004).

Vários outros estudos têm sugerido que a proteína vif tem propriedades funcionais que podem prevenir o encapsulamento da APOBEC3G e a atividade catalítica tanto através da degradação como mediante mecanismos independentes da degradação (Kao et al. 2004; Opi et al. 2007). Segundo Kao et al (2004), a degradação da APOBEC3G induzida por vif não está necessariamente correlacionada com a capacidade da proteína vif de impedir a encapsulação sugerindo que estes dois mecanismos podem acontecer separadamente. Os mecanismos pelos quais vif impede a encapsulação da APOBEC3G ainda não estão elucidados, mas uma das hipóteses é que vif promoveria uma mudança conformacional da APOBEC impedindo o tráfego normal desta molécula pelo citoplasma (Bennett et al. 2006).

1.6.3 - RESPOSTA IMUNE CELULAR

Ao vencer a barreira natural imposta pelas defensinas, β -quimiocinas, DCs e células NK, o HIV-1 infecta as células T CD4⁺. A eficiência da replicação viral nas células T CD4⁺ é dependente do estado de ativação destas células. Enquanto as células T CD4⁺ ativadas são permissivas à replicação viral, as células T quiescentes não sustentam a retrotranscrição, integração e expressão do genoma viral, devido aos baixos níveis de nucleotídeos, ATP e fatores de transcrição (Coiras et al. 2009). No entanto, o HIV-1 possui mecanismos que promovem a imunomodulação dos linfócitos T CD4⁺, principalmente, via TCR, mantendo a replicação e a infectividade viral (Neri et al. 2011).

A proteína acessória nef é responsável pela persistência viral e aceleram a progressão para a aids em indivíduos infectados. A proteína nef diminui a expressão das moléculas de MHC classe I e classe II, moléculas CD4, CD28 e receptores para quimiocinas (Arien & Verhasselt 2008) e age sobre fatores pertencentes às vias de sinalização como, por exemplo, o fator nuclear de ativação de células T (NFAT) e estimula a produção de IL-2 (Fenard et al. 2005). Outros autores sugerem que os efeitos negativos do nef favorecem a replicação viral, pois ao impedirem a completa ativação das células T CD4⁺, inibiriam a morte celular induzida pela ativação dos linfócitos T infectados (Fackler et al. 2007).

Apesar da manutenção da infectividade viral mesmo em células CD4⁺ parcialmente ativadas ou em quiescência, a infecção direta pelo HIV-1, a apoptose das células ativadas e a morte das células infectadas mediada pelos linfócitos T CD8⁺ resultam na depleção das células T CD4⁺ durante a infecção (Hazenberget al. 2000). Para manter os níveis adequados de linfócitos T CD4⁺ é preciso manter a capacidade de renovação destas células que ao longo

do tempo, nos indivíduos progressores, parece se perder. Alguns fatores têm sido atribuídos a insuficiente reconstituição imunológica em alguns pacientes que mesmo após introdução de TARV e supressão da viremia não conseguem recuperar o sistema imune. O HIV-1 pode infectar as células tronco-hematopoiéticas CD34⁺ (CTH) e causar a depleção das mesmas, a proteína NEF pode inibir a ação dos fatores de crescimento sobre as CTH e, principalmente, a resposta imunológica exacerbada pode levar a exaustão da linfopoiese (Carter et al. 2010; Sauce et al. 2011). Sauce et al. (2011) mostraram que a diminuição dos precursores CD34⁺ em pacientes que progrediram para aids mesmo com viremia suprimida parece estar intimamente relacionada com o prejuízo da renovação da população das células T CD4⁺. A ativação imune, principalmente com intensa produção de IFN α , tem efeitos supressores sobre a hematopoiese e pode causar efeitos irreversíveis que mesmo após a introdução da TARV não levam a reconstituição imunológica (Hazenberg et al. 2003).

Em pacientes submetidos a HAART com sucesso na supressão da carga viral, a reconstituição imunológica parcial tem sido considerada uma das principais causas de mortalidade. A morbi-mortalidade é maior em pacientes com reconstituição imunológica insuficiente (Engsig et al. 2010). Na maioria das vezes, o sucesso da reconstituição imunológica depende do estado imunológico do paciente antes da introdução da terapia antiviral (Battegay et al. 2006; Baker et al. 2008). No entanto, Nakanjako et al. 2011, demonstraram que a reconstituição imunológica parcial entre pacientes submetidos a TARV, não estava associada aos parâmetros clínicos antes da terapia e sim ao elevado nível de ativação das células T e ao aumento da expressão da molécula indutora de morte programada PD-1 (*Programmed Cell Death 1*).

Durante a resposta imune inata é produzida grande quantidade de IFN α e esta citocina induz a diferenciação dos linfócitos T CD4⁺ *naive* em células T reguladoras (Treg) CD4⁺CD25^{high}CD127^{dim} (Manches et al. 2008). O papel das células T reguladoras na infecção pelo HIV-1 ainda não está totalmente elucidado. Durante a infecção pelo HIV-1, as células T reguladoras podem diminuir a resposta imune específica contra o HIV-1, o que contribui para a crescente viremia. As células Treg podem também diminuir as respostas inespecíficas impedindo a depleção das células T CD4⁺ e outras respostas inflamatórias (Hunt et al. 2011). Os linfócitos Treg ao inibirem a ativação das células T podem estar envolvidos em mecanismos de proteção da infecção de crianças expostas ao HIV-1 durante a gestação (Legrand et al. 2006).

A proteína p21 é uma proteína inibidora das quinases ciclina-dependentes que são essenciais para a efetiva replicação do HIV-1 nas células. A p21 foi descrita como uma proteína capaz de modular a replicação do HIV-1 em macrófagos, células-tronco hematopoiéticas e, mais recentemente, em células T CD4⁺ (Zhang, Scadden & Crumpacker 2007; Bergamaschi et al. 2009; Chen et al. 2011). Este fator intrínseco das células T CD4⁺ tem sido associado à menor suscetibilidade à infecção pelo HIV-1 por interferir no ciclo replicativo viral e bloquear proteína do hospedeiro essencial para a replicação do HIV-1. A p21 bloqueia a atividade enzimática da CDK9 (quinase ciclina-dependente 9) que tem como função promover o alongamento da cadeia de RNAm mediante a fosforilação da polimerase II (essencial para a expressão gênica do HIV-1). A habilidade da p21 em bloquear uma proteína do hospedeiro em vez de interferir diretamente nas enzimas do ciclo replicativo viral HIV-1 pode explicar porque o HIV-1 parece não ser capaz de escapar da restrição mediada pela p21 (Chen et al. 2011).

Durante as primeiras semanas de infecção, a resposta imune adaptativa surge dando origem a resposta inicial mediada pelos linfócitos T CD8⁺ específicos (CTLs). A associação temporal entre uma resposta dos CTLs HIV-1 específicos e a diminuição da carga viral na fase aguda da infecção pelo HIV-1 aponta os CTLs como o principal fator responsável pelo controle inicial da replicação viral (Koup et al. 1994). O conteúdo dos grânulos citotóxicos dos linfócitos T CD8⁺ é essencial para o controle da infecção pelo HIV-1. Migueles et al. (2008) demonstraram que, nos indivíduos não progressores, a concentração de granzima B e perforina nos grânulos dos CTLs é maior do que nos progressores. Além disso, os linfócitos T CD8⁺ de memória mantêm a capacidade citolítica que pode ser re-estimulada e com isso aumentar a capacidade citotóxica dos CTLs na fase crônica da doença.

A eficiente supressão viral é contato-dependente e mediada predominantemente por linfócitos T CD8⁺ dirigidos contra as proteínas gag (Julg et al. 2010). Estas células são polifuncionais e são capazes de secretar múltiplas citocinas e quimiocinas como IFN γ , TNF α , IL2 e MIP-1 β o que garante a qualidade das respostas T CD8⁺ específicas (Saez-Cirion et al. 2009). No entanto, esta resposta imune eficaz não é observada na fase crônica da infecção pelo HIV-1 (Streeck & Nixon 2010). Com a persistência da viremia, a função e diferenciação das respostas imunes mediadas pelas células T CD8⁺ tornam-se exauridas. Algumas moléculas têm sido descritas como importantes mediadores da exaustão das células T incluindo a molécula PD-1, e as moléculas CTLA-4 e KLRG1 (Kaufmann et al. 2007).

O receptor KLRG1 (receptor de “morte” semelhante a lectina – *killer cell lectin-like receptor G1*) é uma molécula inibitória expressa em maior quantidade nas células T CD8⁺ durante infecção crônica pelo HIV-1. O ligante natural deste receptor é uma molécula de adesão importante na manutenção da integridade intestinal conhecida como E-caderina. Durante a infecção pelo HIV-1 devido a translocação microbiana pode ocorrer lesão intestinal e com isso, aumentar os níveis de E-caderina solúvel. Assim, a interação do KLRG1⁺ das células T CD8⁺ com a E-caderina solúvel prejudica a produção de TNF α pelos CTLs HIV-1 específicos levando a progressão para aids (Streeck et al. 2011).

1.6.4 - A RESPOSTA IMUNE HUMORAL

Os linfócitos B compreendem a classe dos linfócitos residentes em tecidos linfóides associados às mucosas e órgãos linfóides secundários. A infecção pelo HIV-1 provoca mudanças estruturais nos folículos de células B, incluindo a hiperplasia folicular associada com um dos sinais clínicos da infecção pelo HIV-1 que é a linfadenopatia (Tenner-racz et al. 1989). Alguns autores relatam a presença de plasmócitos (células B maduras) na circulação de pacientes recém infectados pelo HIV-1 (Levesque et al. 2009) e, acredita-se que as altas concentrações de citocinas produzidas durante a fase aguda da infecção sejam as responsáveis por este aumento (Wrammert & Ahmed 2008).

A infecção pelo HIV-1 tem sido associada a uma hiperativação crônica dos linfócitos B (Martinez-Maza et al. 1987). A ativação policlonal das células B pode ocorrer indiretamente, pela ação de citocinas e pela interação com células T CD4⁺. A ativação pode também ocorrer diretamente mediante a interação do CD40L (CD154) incorporado aos vírions e o CD40 presente nas células B. Esta interação resulta na expressão da citidina-deaminase (AID), enzima que tem como uma das principais funções promover a hipermutação somática além de contribuir para erros moleculares importantes resultando em disfunção celular (Epeldegui et al. 2010). Outros autores defendem que na fase aguda da infecção a produção de anticorpos neutralizantes anti-HIV-1 pode ser tardia devido à depleção das células T CD4⁺, e estas deixariam de sinalizar e ativar os linfócitos B (Brenchley et al. 2004).

A resposta inicial de anticorpos anti-HIV-1 é essencialmente dirigida para epítopos das glicoproteínas de envelope, mas não tem ação neutralizante. Enquanto a resposta de anticorpos que neutralizam a infecção é tardia e aparece vários meses após a infecção

(Tomaras et al. 2008). Os anticorpos neutralizantes podem ser divididos em duas categorias: aqueles que ligam a regiões variáveis do HIV-1 e neutralizam um grupo pequeno de isolados virais e aqueles que se ligam em regiões conservadas dos vírus e podem neutralizar um grupo maior de isolados de diferentes subtipos e de diferentes regiões geográficas (Burton et al. 2005).

Os anticorpos neutralizantes são dirigidos contra o sítio de ligação ao CD4 e co-receptores (Li et al. 2009). O domínio C3 da proteína de envelope é o primeiro alvo dos anticorpos neutralizantes, seguido pela região V1/V2 e mais tarde outras regiões do complexo env (Moore et al. 2009). Acredita-se que há um padrão sequencial na produção de anticorpos anti-HIV-1: entre 5 e 13 dias após o pico de viremia na fase aguda da infecção, anticorpos anti gp41 podem ser identificados no plasma dos pacientes. Estes anticorpos consistem simultaneamente de IgM e IgG, sugerindo que a troca de classes de imunoglobulinas ocorre precocemente na infecção pelo HIV-1. Já os anticorpos anti-gp120 aparecem mais ou menos 28 dias após o pico da viremia (Tomaras et al. 2008). As razões para esta produção sequencial ainda não são conhecidas (Alter & Moody 2010). Apesar do surgimento destes anticorpos na fase inicial da doença, geralmente, não estão associados ao controle da viremia (Stamatatos et al. 2009), nem mesmo nos controladores de elite (Bailey et al 2006; Pereyra et al. 2009).

O fato dos anticorpos neutralizantes não controlarem a viremia e não protegerem contra a infecção prejudica muito o desenho de vacinas eficazes contra o HIV-1 baseadas na produção de anticorpos. Ensaio clínico mais recente realizado na Tailândia (*ALVAC prime-recombinant Env gp120 boost RV144 phase III*) combinou duas vacinas desenhadas para estimular a produção de anticorpos neutralizantes e protegeu apenas 30% dos indivíduos que foram vacinados (Rerks-Ngarm et al. 2009).

Anticorpos catalíticos têm sido desenhados para desfazer a ligação CD4-gp120. Alguns autores já demonstraram que alguns anticorpos têm a capacidade de clivar a gp120 usando um mecanismo semelhante a serina-protease e podem ser gerados através da imunização de camundongos com fragmentos da gp120 (Nishiyama et al. 2007).

As funções dos anticorpos não diretamente relacionadas com a capacidade de neutralizar o HIV-1 podem ter papel protetor na infecção. A região constante dos anticorpos é capaz de ativar o sistema complemento, estimular a secreção de citocinas e quimiocinas, disparar fagocitose e recrutar atividade citolítica (Jefferis & Lund 2002). Todas estas funções

são disparadas pela interação do domínio CH2 e as proteínas do complemento e os receptores Fc encontrados nas células do sistema imune. Os anticorpos podem orquestrar a atividade antiviral da resposta imune inata pela citotoxicidade mediada por célula dependente de anticorpo (ADCC – *antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*), sendo este um dos mecanismos antivirais essenciais no controle da viremia. Forthal et al. (2005), verificaram que, apesar dos níveis reduzidos de anticorpos neutralizantes nos controladores de elite, estes anticorpos têm capacidade ímpar na indução da atividade antiviral das células NK pela ADCC. Recentemente, Isitman et al. (2011), sugeriram que as proteínas pol são alvos significantes para as repostas ADCC em indivíduos infectados pelo HIV-1, mas esta resposta declina ao longo do tempo e não está relacionada com a progressão mais lenta da doença.

1.6.5 A INFLUÊNCIA DO ANTÍGENO LEUCOCITÁRIO HUMANO - HLA

Depois de internalizados e processados os antígenos virais são apresentados aos linfócitos T via moléculas do antígeno leucocitário humano (HLA) presentes nas células infectadas. Os linfócitos T CD8⁺, selecionados de acordo com o repertório de peptídeos virais associados ao HLA, podem controlar a replicação viral eficientemente mediante a lise de células infectadas antes que outras partículas virais possam ser formadas (Harrer et al. 1996). Fatores genéticos que envolvem os genes do HLA classe I (HLA-I), particularmente o HLA-B podem exercer influência direta na infecção pelo HIV-1e na progressão da doença (Martin & Carrington 2005). As especificidades do HLA-B podem ser agrupadas em duas famílias: HLA-Bw4 e HLA-Bw6 (Muller et al. 1989).

Como já mencionado anteriormente, no item relacionado à função das células NK, o HLA-B Bw4-80I e o receptor inibitório presente em células NK KIR3DS1 são protetores. No Brasil, estudo realizado em pacientes HIV-1 do estado da Bahia, detectou uma associação significativa entre a presença dos alelos HLA-Bw4-B57 e Cw18 e a baixa viremia. Estes resultados sugerem que estes alelos podem estar desempenhando papel protetor para progressão da doença nesta população (Silva et al. 2010).

Os alelos *HLAB*27* e *HLAB*57* têm sido descritos como alelos que conferem proteção contra a progressão para aids quando comparados com outros alelos do HLA classe I. O *HLAB*57* confere proteção na fase inicial da infecção retardando o declínio do número de células CD4⁺, enquanto o *HLAB*27* retarda o aparecimento de doenças oportunistas e progressão para aids (Goulder et al 1997; Kelleher et al 2001; Feeney et al. 2004). Segundo

Kelleher et al. (2001), o efeito protetor tardio do *HLAB*27* deve-se à presença de cepas que escaparam da resposta dos linfócitos T citotóxicos e exigiram mutações compensatórias dentro ou perto do *locus HLAB*27* restrito a estes epítomos antigênicos. Brackenridge et al. (2011), demonstraram recentemente que uma mutação precoce de um epítomo do HIV-1 (G9E) dentro do HLA-B*57 anula a ligação com receptor inibitório KIR3DL1 das células NK. Portanto, a dinâmica pela qual os diferentes alótipos conferem proteção contra o HIV-1 não é necessariamente a mesma. Este fenômeno pode depender dos tipos de epítomos antigênicos restritos por estes alótipos (Telenti & Carrington 2008).

1.7 AS ESTRATÉGIAS TERAPÊUTICAS NO COMBATE A AIDS

Sem dúvida o progresso mais significativo na batalha contra o HIV-1/aids tem sido o desenvolvimento de drogas antirretrovirais (ARV) eficazes que proporcionam importantes opções de tratamento para o HIV-1. A TARV tem como objetivo reduzir a viremia plasmática a níveis indetectáveis, resgatar e preservar o sistema imunológico, reduzir a progressão clínica e mortalidade e diminuir a transmissão do HIV-1 (Hammer et al. 2008). Dependendo do método utilizado os limites de detecção da viremia podem variar de <50, <40 ou <20 cópias de RNA/mL.

A zidovudina (AZT) foi a primeira droga ARV aprovada em 1987. Dois anos depois o FDA (*Food and Drug Administration*) aprovou a didanosina (DDI) e em 1991 iniciou-se a dupla terapia com AZT e DDI. Em 1995, com a aprovação de uma segunda classe de ARV, um inibidor de protease o saquinavir (SQV), o cenário do tratamento de pacientes com aids mudou. A partir de então iniciou a era da TARV altamente eficaz (HAART, do inglês, *highly active antiretroviral therapy*) (Cooper & Merigan 1996). A monoterapia com AZT ou o uso de duas drogas de uma mesma classe contribuiu para uma sobrevivência de aproximadamente um ano. Por outro lado a associação de três drogas sendo pelo menos duas de classes diferentes diminuiu muito a incidência de doenças oportunistas e mortes pela aids (Detels et al. 1998; Gulick et al. 2003).

Apesar da eficácia da HAART, a interação entre as drogas, a toxicidade e, principalmente, a seleção de cepas resistentes contribuíram para pesquisas em busca de novos fármacos. Assim, em 2003, o inibidor de fusão enfurvitida (Fuzeon® ou T20) foi aprovado para uso exclusivo por pacientes multidroga-resistentes. Em 2007, outro inibidor de entrada antagonista do CCR5, o Maraviroc recomendado para uso por pacientes multidroga-

resistentes infectados por cepas R5 foi aprovado. Além desta droga um inibidor da integrase, o Raltegravir, também teve aprovação em 2007 (FDA 2011).

Atualmente 24 drogas ARV aprovadas pelo FDA estão disponíveis para o tratamento da infecção pelo HIV-1 (FDA 2011). Os alvos destas drogas são as enzimas virais e as proteínas envolvidas na entrada do vírus na célula hospedeira. Estas drogas pertencem a cinco diferentes classes de ARV. Estas classes de drogas são representadas pelos inibidores nucleosídeos e nucleotídeos da TR (*Nucleoside and Nucleotide Analog Reverse Transcriptase Inhibitors*, NRTI e N(t) RTI), inibidores não-nucleosídeos da TR (*Non-Nucleoside analogs Reverse Transcriptase inhibitors*, NNRTIs), inibidores da protease (*Protease Inhibitors*, PI), inibidor da integrase (*Integrase Inhibitor*, IN), inibidores de entrada (*Entrance Inhibitors*, EI) sendo um inibidor de fusão e um antagonista do co-receptor CCR5. A Tabela 1 mostra a relação das drogas ARV aprovadas pelo FDA e pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária agrupadas nas respectivas classes (FDA 2011).

Tabela 1: Drogas antirretrovirais aprovadas pelo *Food and Drug Administration* e pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) no Brasil

NRTIs	NNRTIs	PI	Inibidores da Integrase	Inibidores de Entrada
Zidovudina (AZT)	Efavirenz (EFV)	Amprenavir (APV)	Raltegravir	Enfurvitida (T20)
Abacavir (ABC)	Nevirapina (NVP)	Atazanavir (ATV)		Maraviroc
Didanosina (ddI)	Etravirina (ETV)*	Darunavir (DRV)		
Estavudina (d4T)	Delavirdina*	Indinavir (IDV)		
Lamivudina (3TC)		Lopinavir/r (LPV)		
Tenofovir (TDF)		Nelfinavir*		
Zalcitabina*		Fosamprenavir (FPV)		
Emtricitabina*		Ritonavir (RTV)		
		Saquinavir (SQV)		

*Não disponíveis no Brasil.

NRTIs = Inibidores Nucleosídeos da Transcriptase Reversa; NNRTIs = Inibidores Não-Nucleosídeos da Transcriptase Reversa; PI = Inibidores da Protease; EFV = efavirenz; FTC = emtricitabina; TDF= Tenofovir disoproxil fumarato.

Fonte: FDA 2011

1.7.1 - Os Inibidores da Transcriptase Reversa

Para entender o mecanismo de ação dos inibidores da TR é preciso entender a estrutura molecular desta enzima e o seu mecanismo de ação. A TR é um heterodímero assimétrico composto pelas subunidades p66 (560 aminoácidos), a qual é clivada na porção carboxi-terminal gerando uma subunidade p15 (120 aminoácidos) correspondente a RNaseH que tem atividade ribonuclease. Esta clivagem gera também uma subunidade p51 (440 aminoácidos) sendo ambas as subunidades codificadas pela mesma sequência do genoma viral (Kohlstaedt et al. 1992). A estrutura tridimensional da p66 é comparada com a mão direita (Figura 4). Os domínios de três ácidos aspárticos (110, 185 e 186) contidos na “palma” são o sítio ativo da polimerase, ou seja, onde ocorre o alongamento da cadeia do DNA proviral.

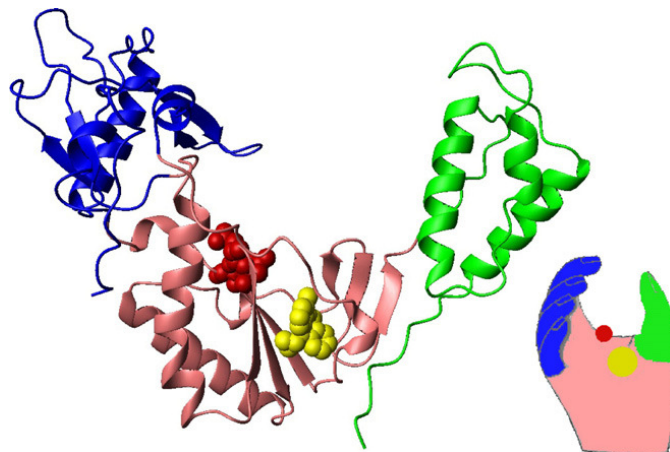


Figura 6: Estrutura tridimensional da transcriptase reversa. Esta representação esquemática do domínio da atividade da TR, ilustrada com uma mão, mostra os dedos (azul), palma (rosa) e o polegar (verde). O sítio ativo (átomos em vermelho), onde o DNA é alongado, está na região da “palma”. Também é mostrado um inibidor da RT (amarelo) na fenda onde ele se liga.

Fonte: Madri & Lukin 2000.

Os NRTIs são inibidores competitivos que competem com os nucleosídeos naturais (adenosina, citosina, timidina e guanosina). Os NRTI não têm o grupo hidroxila (OH) no carbono 3 da ribose e com isso, impedem a formação das pontes fosfodiésteres para estabilizar a dupla cadeia de DNA. Desta forma, outros nucleotídeos não podem ser adicionados à cadeia, impedindo a continuidade da transcrição e síntese do DNA proviral (de Bethune 2010) (Figura 7a).

Os NNRTIs são inibidores não competitivos da TR e bloqueiam o sítio ativo da transcriptase reversa disparando uma mudança conformacional na molécula que parece afetar

a atividade catalítica da enzima. Assim, a TR não consegue polimerizar, parando a transcrição do RNA em DNA (de Bethune 2010) (Figura 7b).

Os N(t)RTI têm o mesmo mecanismo de ação dos NRTI, mas enquanto os NRTI necessitam de três etapas de fosforilação intracelular para formar metabólito ativo, os N(t)RTI necessitam de apenas duas etapas.

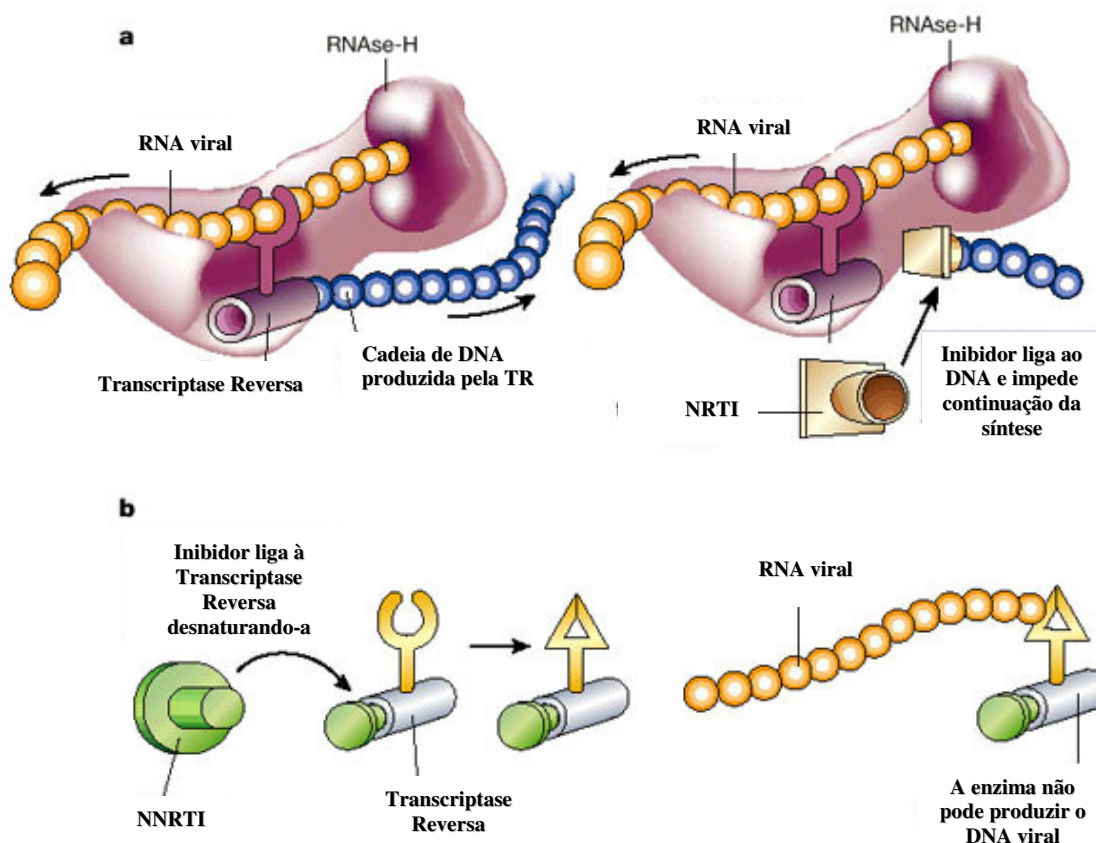


Figura 7: (a) Mecanismo de ação dos Inibidores da Transcriptase Reversa Análogos a Nucleosídeos (NRTI). (b) Mecanismo de ação dos Inibidores da Transcriptase Reversão Não-Análogos a Nucleosídeos (NNRTI).

Fonte: Richman (2001).

1.7.2 - Os inibidores da protease

A PR do HIV-1 processa as poliproteínas gag, gag-pol e env em subunidades funcionais. A inibição da PR previne a fragmentação proteolítica e a maturação dos vírions e leva a liberação de partículas virais incapazes de infectar novas células (Figura 8).

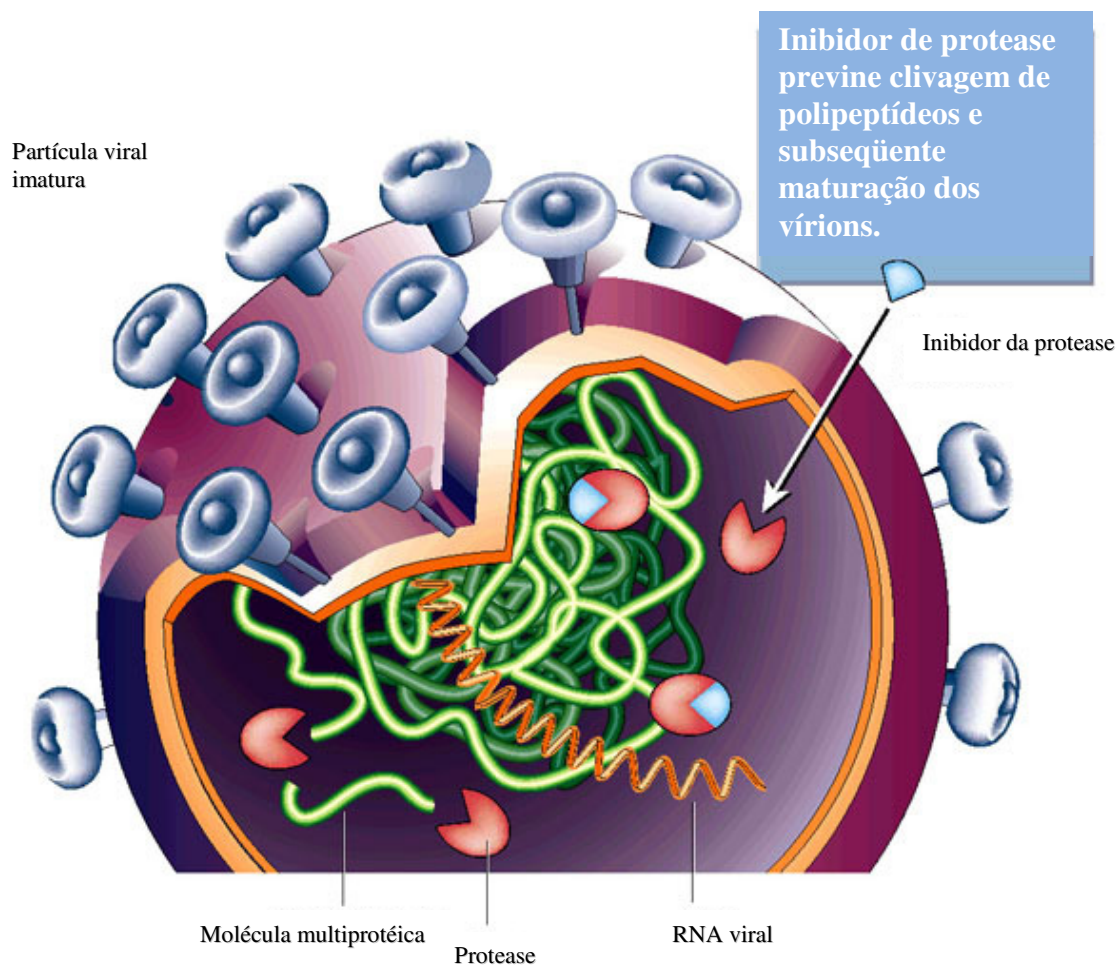


Figura 8: Mecanismo de ação dos Inibidores de Protease.
 Fonte: Richman (2001).

1.7.3 - Inibidor da integrase

Após a transcrição do RNA em DNA viral (cDNA), a enzima IN é responsável pela inserção da fita de DNA ao genoma da célula hospedeira. Primeiramente, a IN retira dois nucleotídeos das extremidades 3' do cDNA, em seguida o cDNA é translocado para o núcleo onde a IN promove a inserção do cDNA ao genoma do hospedeiro. O inibidor da integrase, Raltegravir, impede a etapa de inserção interagindo com metais divalentes no sítio ativo da enzima (Figura 9) (Hazuda et al. 2000).

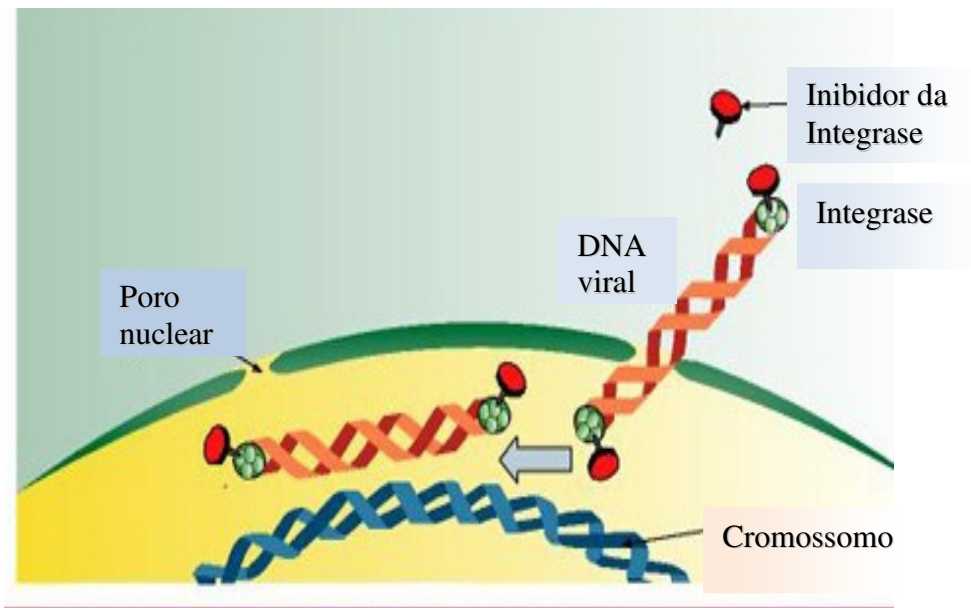


Figura 9: Mecanismo de ação do inibidor da Integrase, Raltegravir.
 Fonte: <http://www.immunopaedia.org/index.php?id=63> (citado em 14/01/2011; adaptado)

1.7.4 - Inibidores de entrada

O grupo dos inibidores de entrada pode ser subdividido em classes de drogas que agem em diferentes estágios de entrada do vírus na célula: inibidores de ligação da gp120 com a molécula CD4, antagonistas dos co-receptores e inibidores de fusão (Tilton & Doms 2010) (Figura 10).

O inibidor de fusão liga-se a gp41 impedindo a ligação entre os domínios HR1 e HR2, necessária para a fusão do envelope viral com a membrana da célula hospedeira. O antagonista do CCR5 também impede a entrada do vírus na célula, mas via a ligação com o CCR5 alterando a estrutura conformacional da alça de interação com a gp120 (de Clercq 2009). Atualmente, foram aprovados pelo FDA o antagonista do CCR5 (Maraviroc) e o inibidor de fusão (T20 ou enfurvitida).

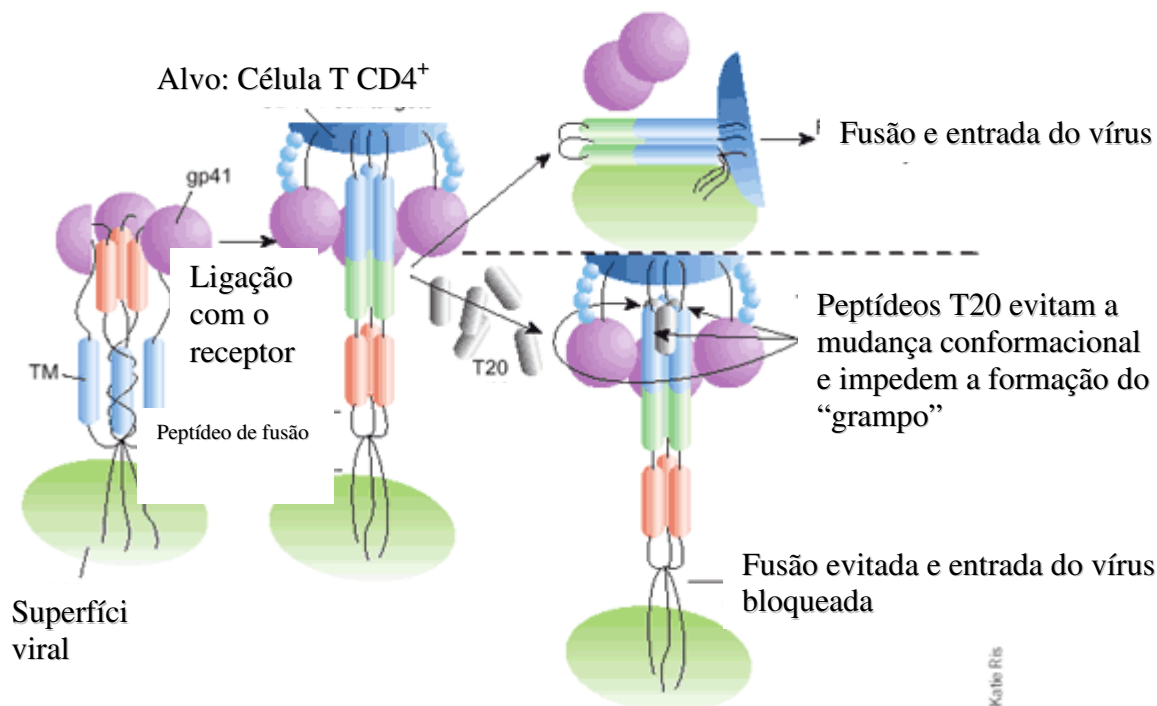


Figura 10: Mecanismo de ação dos inibidores de entrada.
 Fonte: Pomerantz & Horn (2003); adaptado

1.8 ADESÃO À TERAPIA ANTIRRETROVIRAL E AS MUTAÇÕES DE RESISTÊNCIA

A adesão à HAART é fundamental para o sucesso terapêutico e é preconizada para que não haja seleção de cepas com mutações associadas à resistência a drogas ARV. A falha ou o sucesso terapêutico é demonstrado pela ocorrência de eventos clínicos e evolução dos parâmetros laboratoriais: carga viral plasmática e contagem de células T CD4⁺.

A falha virológica é definida por não-obtenção ou não-manutenção da carga viral indetectável. Caracteriza-se por carga viral superior a 400 cópias/mL após 24 semanas ou superior a 50 cópias/mL após 48 semanas de tratamento (Gallant 2007). A falha imunológica é caracterizada pelo declínio progressivo da contagem de células T CD4⁺, geralmente, maior que 25% na contagem de células T CD4⁺ (Turner et al. 1994). A falha clínica é caracterizada pela progressão clínica da infecção expressa principalmente por meio de infecções ou tumores oportunistas. No entanto, na ausência de falha virológica, a ocorrência de doenças oportunistas não indica falha do tratamento ARV, mas reflete, na maioria dos casos, reconstituição imune parcial e insuficiente.

A falha virológica pode ter impacto imunológico e clínico devido à viremia persistente, aumentando o risco de progressão da doença, além de levar a seleção de mutações que podem conferir resistência às drogas, diminuindo as opções terapêuticas posteriores. A manutenção dos ARVs na presença de carga viral detectável pode levar ao acúmulo de mutações de resistência. Quanto mais elevada a carga viral na presença da medicação ARV, maior a chance de seleção de novas mutações de resistência (Gallant 2007).

1.8.1 - Mutações de Resistência aos Antirretrovirais

Entender a base genética da resistência aos ARV é importante para prever a resistência cruzada a novos ARV em uma determinada população. A genotipagem para resistência do HIV-1 identifica a presença de mutações para resistência mediante sequenciamento do gene *pol*. O sequenciamento do gene *pol* permite a identificação de mutações associadas à resistência aos inibidores da TR, da PR e da IN e o sequenciamento da região HR1 da gp41 codificada pelo gene *env* permite a identificação da resistência ao inibidor de entrada T20.

A nomenclatura das mutações associadas à resistência aos ARV é baseada na sequência de aminoácidos de uma sequência referência. Para o HIV-1 a sequência de referência para se avaliar resistência viral é a sequência HXB2 do subtipo B do HIV-1 (número de acesso ao GenBank K03455). Esta sequência contém os aminoácidos mais comuns em cada posição do subtipo B do HIV-1 (HIV-1 Database 2010b). Para indicar uma mutação usa-se a letra do aminoácido consenso seguido do número da posição do códon e da letra referente ao aminoácido presente na mutação. Por exemplo, a mutação M184V significa que o aminoácido metionina foi substituído pela valina na posição 184. Caso haja mais de um aminoácido na mesma posição devido à *quasispecies* viral, as letras dos aminoácidos são citadas individualmente e separadas por barra após o número da posição do códon (ex: K103K/N) (Shafer 2002).

Algumas mutações que surgem durante a transcrição do RNA viral em cDNA podem gerar vírus com proteínas não funcionais interferindo negativamente sobre seu *fitness*, ou seja capacidade de replicação. Entretanto outras mutações geram vírus capazes de escapar da resposta imune e vírus resistentes aos ARV (Pulsinelli & Temin 1991).

As mutações associadas à resistência aos ARVs podem ser classificadas como principais e acessórias. As mutações capazes de conferir elevado nível de resistência a uma ou várias drogas de uma determinada classe são denominadas principais. Já as mutações que não conferem níveis significativos de resistência às drogas quando presentes isoladamente são denominadas acessórias. No entanto, as mutações acessórias, quando presentes, acompanhadas de mutações principais específicas podem compensar a perda do *fitness* que estas geralmente impõem ao vírus. Além disso, as mutações acessórias podem conferir algum grau de resistência aos inibidores, levando à diminuição da susceptibilidade viral (Nijhuis et al. 1998).

A barreira genética representa a “distância” genética para o desenvolvimento de resistência completa a um ARV. A barreira genética se relaciona, principalmente, com o número de mutações necessário para diminuir a atividade antiviral da droga. Neste contexto, os NRTI necessitam de uma a duas mutações para expressiva perda da suscetibilidade à droga. Os NNRTIs necessitam de apenas uma mutação para conferir resistência a praticamente toda a classe. Os PIs são os que têm maior barreira genética, sendo necessárias três a quatro mutações para conferir resistência. Já o inibidor de entrada T20 tem baixa barreira genética, sendo necessária apenas uma mutação para perda da ação da droga (Diaz 2007).

O Brasil foi o pioneiro entre os países em desenvolvimento a fornecer acesso livre e universal aos ARVs aprovados pelo FDA para pacientes infectados pelo HIV-1 que preencham critérios pré-estabelecidos (Teixeira et al. 2004). No entanto, em países em desenvolvimento com larga exposição aos ARVs, a baixa adesão e doses inadequadas dos ARVs são fatores importantes que contribuem para a seleção e a transmissão de cepas resistentes (Bangsberg et al. 2001).

No Brasil, aproximadamente 45% dos indivíduos expostos aos ARVs têm resistência a duas classes de ARVs e 35% às três classes (Munerato et al. 2010). Entre aqueles infectados pelo HIV-1 e não expostos aos ARVs a taxa de resistência transmitida situa-se entre 1,5% e 10% (Pedroso et al. 2007; Cardoso et al. 2009; Inocencio et al. 2009; Sprinz et al. 2009). Em cidades do Sul e Sudeste a taxa de resistência transmitida de acordo com um estudo multicêntrico recente foi de 5,7% (Sprinz et al. 2009) e em outro estudo envolvendo seis capitais brasileiras (São Paulo, Rio de Janeiro, Salvador, Porto Alegre, Brasília e Belém) foi de 8,1% (Inocencio et al. 2009). Em Recife, no norte do país, a taxa de resistência transmitida

em pacientes recrutados entre 2003 e 2004 foi de 3,6% (de Medeiros 2006). Recentemente, foi descrita uma taxa de resistência transmitida de 11,5% na cidade de Palmas/TO (Carvalho et al. 2011) que faz divisa com o estado de Goiás, onde a taxa de resistência transmitida situa-se em aproximadamente 10% (Cardoso et al. 2009).

A resistência viral secundária é devida a seleção de mutações de resistência aos ARV em decorrência da pressão seletiva exercida pelos ARV (Hirsch et al. 2008). A resistência primária ou transmitida é aquela em que um indivíduo nunca exposto aos ARV se infecta com cepas resistentes. Desde os primeiros relatos de resistência transmitida, há preocupação crescente com a transmissão de cepas resistentes (Yerly et al. 1999; Little et al. 2002; Hirsch et al. 2003; Yerly et al. 2007). Como a resistência primária pode reduzir a eficácia da terapia ARV inicial, dependendo da prevalência de resistência primária regional testes de resistência devem ser recomendados antes do início da terapia ARV (Hirsch et al. 2003).

1.8.2 - Detecção das Mutações de Resistência aos Antirretrovirais

As mutações de resistência aos ARV são identificadas, principalmente, por ensaios genotípicos que identificam mutações genéticas verificadas no genoma viral que tenham impacto na eficiência das drogas ARV. Os testes de genotipagem se baseiam em sequenciamento direto de fragmentos do genoma viral amplificados pela reação em cadeia da polimerase (PCR - *Polimerase Chain Reaction*) com terminadores de cadeia do tipo dideoxynucleotídeos fluorescentes (Sanger et al. 1977). O fragmento amplificado é sequenciado automaticamente e, posteriormente, uma análise minuciosa da sequência de nucleotídeos é realizada por comparação com uma sequência de referência reconhecidamente suscetível às drogas (Eshleman et al. 2004).

O HIV-1 existe *in vivo* como uma *quasispecies* consistindo de inúmeras variantes genômicas que evoluem simultaneamente mediante mutação, recombinação e seleção, o que representa uma dificuldade na identificação de variantes resistentes a drogas. Os testes de genotipagem convencionais raramente detectam mutantes em genomas virais que representem menos de 20% da população de vírus plasmáticos (Larder et al. 1993, Schuurman et al. 1999; Schuurman et al. 2002).

Para detectar a presença de população minoritária com mutações de resistência tem sido empregada a técnica da reação em cadeia da polimerase em tempo real alelo específica (*real time PCR* – qPCR). Esta técnica altamente sensível permite detectar e avaliar as mutações de resistência em isolados que representem 0,01% da população viral (Metzner et al. 2009).

Clinicamente, a persistência de variantes minoritárias resistentes a drogas em pessoas previamente expostas a inibidores não nucleosídicos da TR (NNRTIs) foi associada à maior chance de falha virológica (Jourdain et al. 2004) e há relato de caso de transmissão materno-infantil (TMI) do HIV-1 entre gestante portadora de população minoritária de vírus resistentes às drogas ARV (Machado et al. 2004).

1.9 A TRANSMISSÃO MATERNO-INFANTIL DO HIV-1

1.9.1 GESTAÇÃO E A INFECÇÃO PELO HIV-1

Uma das metas da OMS para o controle da aids no mundo até 2015 almeja que nenhuma criança exposta ao HIV-1 durante a gestação e/ou parto seja infectada (UNAIDS/WHO 2010). Para alcançar esta meta é preciso garantir o acesso universal precoce aos testes de diagnóstico da infecção pelo HIV-1, mediante triagem eficiente de infecção pelo HIV-1 no pré-natal. A triagem da infecção pelo HIV-1 em mulheres de idade fértil permite tratamento e introdução de profilaxia da TMI reduzindo os riscos de casos neonatais.

O Brasil preconiza o direito reprodutivo das pessoas que vivem com HIV-1 e aids e assegurando de maneira livre e responsável a decisão sobre sua reprodução, livre de discriminação, violência ou coerção (Brasil 2010b). As políticas de saúde pública visam garantir o acesso à informação e aos insumos necessários para o exercício saudável e seguro da reprodução. Assim,

no aconselhamento das mulheres soropositivas para o HIV-1 que pretendem engravidar, é importante investigar as suas condições imunológicas, a presença de comorbidades (incluindo as DST, a tuberculose, o vírus da hepatite B e o vírus da hepatite C), a dependência de drogas, fumo e álcool, as condições psicossociais, bem como o uso de antirretrovirais (ARV) e outros medicamentos (Brasil 2010b).

O diagnóstico de infecção pelo HIV-1 entre as mulheres ocorre na maioria das vezes (~70%) durante a gestação. No Brasil, estudos sentinela com parturientes infectadas pelo HIV-1 mostraram que a cobertura da sorologia subiu de 52% em 2002 para 63% em 2004 e então se estabilizou. No entanto, há grande discrepância regional nesta cobertura. Nas regiões Centro-Oeste, Sudeste e Sul a triagem sorológica para HIV-1 no pré-natal atinge mais de 70% das gestantes. Em gestantes das regiões Norte e Nordeste esta cobertura é de aproximadamente 30% (Szwarcwald et al. 2005; Souza Jr et al. 2004; Brasil 2010b). Entre as falhas no processo de detecção da infecção pelo HIV-1 durante a gestação, destacam-se a ausência ou início tardio do acompanhamento pré-natal, sem tempo hábil para o resultado da sorologia e a devida intervenção; o não comparecimento às consultas do pré-natal, falta de pedido de sorologia anti HIV-1, realização de teste sorológico tardiamente ou extravio do mesmo (Souza Jr et al. 2004). A cobertura insuficiente da sorologia anti HIV-1 no pré-natal ainda representa um importante fator limitador para o controle da TMI do HIV-1.

A introdução dos testes rápidos para diagnóstico da infecção pelo HIV-1 para gestantes e puérparas que não foram testadas durante o pré-natal, ou foram testadas tardiamente na gestação e desconhecem o resultado no momento do parto permite a introdução de medidas profiláticas para a TMI do HIV-1 no último trimestre da gestação, no parto e no pós-parto.

Estima-se em 0,41% a proporção de mulheres gestantes infectadas pelo HIV-1 (Souza Jr et al. 2004). Entre 2008 e 2009, 8.116 casos de infecção por HIV-1 em gestantes foram notificados ao Ministério da Saúde. Entre estas, 44 tinham entre 10 e 12 anos de idade e 722 eram adolescentes entre 13 e 19 anos (Brasil 2010). A gestação da mulher portadora do HIV-1 vem associada ao risco da TMI que na ausência de profilaxia chega a 25% (Connor et al. 1994)

1.9.2 ADOLESCENTES GESTANTES E A INFECÇÃO PELO HIV-1

Segundo a OMS, há um aumento na incidência de comportamento de risco, baixa frequência no uso de preservativo, e altas taxas de doenças sexualmente transmissíveis entre os adolescentes (UNAIDS/WHO 2009). No Brasil, estudo recente realizado na cidade de São Paulo com voluntários que procuraram centros de testagem e aconselhamento anônimo (CTA) revelou que jovens menores de 25 anos são os mais vulneráveis ao risco de infecção por HIV-1 (Bassichetto et al. 2008). Os fatores de risco para meninas e meninos são diferentes. Os

garotos apresentam maior chance de relacionamentos homossexuais ou heterossexuais com profissionais do sexo sem o uso de preservativos, e podem associar este comportamento ao uso de drogas injetáveis. As garotas geralmente se infectam mediante relacionamentos heterossexuais desprotegidos e em relacionamentos com usuários de drogas injetáveis infectados (Pechansky et al. 2004).

Mais de 6000 casos de aids entre adolescentes do sexo feminino de 13 a 19 anos foram notificados ao Ministério da Saúde desde o início da epidemia no Brasil (Brasil 2010a). Em adolescentes a ocorrência de gravidez indesejada é frequente. Atualmente a gravidez na adolescência contribui com mais de 400.000 partos/ano no Brasil (MS / SVS / DASIS – Sistema de Informação sobre Nascidos Vivos - SINASC. DATASUS, 2009). Em torno de 5000 casos de gestação entre as adolescentes infectadas pelo HIV-1 com idade entre 10 e 19 anos foram notificados ao Departamento de Doenças Transmissíveis e Aids (DST/AIDS/Ministério da Saúde) (Brasil 2010a).

A gravidez na adolescência tem sido associada com parto prematuro, anemia, hipertensão arterial, baixo peso ao nascimento e alta taxa de mortalidade neonatal (Fraser et al. 1995; Jolly et al. 2000). Estes fatores associados à infecção pelo HIV-1 podem contribuir para um risco elevado da TMI entre as adolescentes gestantes infectadas. No entanto, estudo sobre a gravidez em adolescentes que foram infectadas por transmissão vertical e em gestantes não infectadas não mostrou diferenças nas intercorrências gestacionais nem maior taxa da TMI do HIV-1 entre pacientes adolescentes e adultas (Williams et al. 2009).

Com a introdução da HAART em 1996, a mortalidade dos pacientes infectados pela via perinatal tem diminuído (Abrams et al. 2001; Gortmaker et al. 2001). Atualmente, a primeira geração de crianças infectadas pelo HIV-1 pela via perinatal estão entrando na adolescência, iniciando a atividade sexual e muitas adolescentes infectadas acabam engravidando. Com isso, a segunda geração de crianças expostas ao HIV-1 durante a gestação tem surgido. Por isso, o comportamento sexual e os aspectos clínicos das gestantes que se infectaram pela via perinatal têm sido investigados (Zorrila et al. 2003; Williams et al. 2009, Cruz et al. 2010; Bassols et al. 2010). Entre as gestantes infectadas por via perinatal têm sido observados alguns aspectos clínicos como maior imunossupressão e alta taxa de mutações de resistência (Foster et al. 2009, Williams 2009). No entanto, no Brasil, a grande maioria das gestantes adolescentes é infectada por comportamento de risco representado principalmente pelo sexo desprotegido ou em menor escala pelo uso de drogas injetáveis (Brasil 2010a).

Gestantes adolescentes recém-infectadas podem selecionar mutações de resistência precocemente devido a exposição à profilaxia para TMI do HIV-1.

1.9.3 PROFILAXIA DA TRANSMISSÃO MATERNO-INFANTIL DO HIV-1

Um marco importante na história da transmissão vertical do HIV-1 foi a publicação dos resultados do “Pediatric AIDS Clinical Trials Group Study” (PACTG076). Estes ensaios clínicos demonstraram redução significativa de transmissão vertical em crianças não amamentadas, tratadas com AZT xarope por 6 semanas e cujas mães receberam monoterapia com AZT durante a gestação e trabalho de parto (Connor et al. 1994). Este protocolo profilático teve como objetivo reduzir a carga viral materna e diminuir, assim, a exposição intraútero e intraparto do feto ao vírus.

Mundialmente, a cobertura dos serviços para prevenir a TMI do HIV-1 subiu de 10% em 2004 para 45% em 2008 (UNAIDS/WHO 2009). A queda no número de novas infecções pelo HIV-1 entre crianças sugere que as medidas preventivas têm sido eficazes. A prevenção da TMI do HIV-1 envolve múltiplas estratégias que visam reduzir o risco da criança ser infectada devido a exposição ao vírus durante a gestação, trabalho de parto e no pós-parto por amamentação. Entre estas estratégias estão a redução dos novos casos de infecção entre homens e mulheres em idade reprodutiva, redução de gravidez indesejada entre as mulheres infectadas pelo HIV-1, diagnóstico precoce da infecção, oferta de tratamento ou profilaxia ARV para a gestante e cesariana eletiva (UNAIDS/WHO 2010).

O Brasil ocupa posição privilegiada entre os países em desenvolvimento oferecendo desde 1996 ARVs para as gestantes infectadas, AZT injetável para parturientes e AZT solução oral para os recém-nascidos expostos ao HIV-1.

Segundo o Ministério da Saúde (Brasil 2010b) a utilização do AZT injetável nas parturientes é um marcador importante na profilaxia da TMI. Cerca de 60% das parturientes infectadas pelo HIV-1 têm acesso ao AZT durante o parto e 20% das gestantes portadoras do HIV-1 perdem alguma etapa de oportunidade para prevenir a TMI (Souza Jr et al. 2004; Brasil 2010b). Desta forma, apesar das intervenções preconizadas terem tido forte impacto na redução da TMI do HIV-1 e não obstante a oferta de profilaxia, a cobertura das ações profiláticas ainda é considerada baixa no Brasil. O diagnóstico tardio da infecção pelo HIV-1 na gestação, a baixa adesão às recomendações dos serviços de saúde e a fraca qualidade da

assistência, principalmente nas regiões com menor cobertura/acesso a serviços de saúde têm dificultado a diminuição mais significativa das taxas nacionais de TMI do HIV-1 (Brasil 2010b).

1.9.4 TERAPIA ANTIRRETROVIRAL NA GESTAÇÃO

A indicação da HAART na gestação pode ter dois objetivos: profilaxia da TMI e/ou tratamento da infecção pelo HIV-1. A profilaxia ARV é indicada para gestantes assintomáticas com contagem de LT CD4+ ≥ 350 céls./mm³ e deve ser iniciada entre a 14^a e a 28^a semana de gestação. Na presença de qualquer fator que possa causar disfunção placentária como a co-infecção pelo citomegalovírus, sífilis, toxoplasmose e uso de drogas ilícitas a profilaxia pode ser introduzida precocemente. A profilaxia da TMI é interrompida após o parto. O tratamento da infecção durante a gestação é indicado para gestantes sintomáticas e/ou com contagem de LT CD4+ ≤ 350 céls/mm³ independente da idade gestacional. Neste caso o tratamento deve ser mantido após o parto (Brasil 2010b).

As reações adversas aos medicamentos ARV utilizados para a profilaxia da TMI são pouco frequentes, transitórias, de baixa intensidade e, raramente, é preciso readequar ou suspender o tratamento. Os efeitos dos ARV na profilaxia da TMI sobrepõem aos riscos das reações adversas aos mesmos. Estudos não têm demonstrado efeito teratogênico dos ARVs (Covington et al. 2004; Watts et al. 2004). No entanto, existem evidências de malformações congênitas em crianças expostas ao EFV no primeiro trimestre de gestação (Chersich et al. 2006).

A primeira recomendação para profilaxia da TMI para as gestantes foi baseada na monoterapia com AZT (Connor et al. 1994). No entanto, vários estudos subsequentes demonstraram que o uso de esquemas combinados com dois ou mais ARVs podem reduzir a TMI para menos de 2% (Lambert et al. 2003; Amaral et al. 2007; Hoffman et al 2010). Hoje, prescreve-se para a profilaxia da transmissão materno-infantil esquema terapêutico com dois NRTIs (AZT/3TC – Biovir) e um inibidor de PR (LPV/r - Kaletra) de alta barreira genética.

1.9.5 MUTAÇÕES DE RESISTÊNCIA NA GESTAÇÃO E A TRANSMISSÃO MATERNO-INFANTIL DO HIV-1

O número crescente de cepas resistentes do HIV-1 é atribuído ao uso generalizado dos ARV e à pressão seletiva que os mesmos exercem sobre os vírus. Como as gestantes são

expostas aos ARV para a profilaxia da TMI ou para o próprio tratamento, a resistência aos ARV pode levar a falha da profilaxia por transmissão de cepas resistentes da mãe para o filho (Henry et al. 2008). Entre gestantes infectadas pelo HIV-1, submetidas à profilaxia, a taxa de resistência pode chegar a 23% (Kakehasi et al. 2007; Cardoso et al. 2010). Entre as crianças infectadas pelo HIV-1 submetidas a profilaxia 45% apresentaram mutações para resistência aos ARVs (Martinson et al. 2007).

Desde a introdução da profilaxia para TMI estudos têm demonstrado a transmissão de cepas resistentes aos NRTIs (Bauer et al. 2006; Kamkamidze et al. 2001), e, raramente, aos NNRTI e PI (Bauer et al. 2006; Martinson et al. 2007). Bauer et al. 2006, não observaram concordância de mutações de resistência entre pares de mães infectadas e filhos infectados quanto às mutações K103N para NNRTI e as mutações principais L90M e V82V/I para IP. Isolados com mutações de resistência para os NRTI e mutações menores para os IP foram concordantes entre mãe e filho. Portanto, não se pode afirmar que as cepas com mutação de resistência sejam preferencialmente transmitidas das mães para os filhos. Acredita-se que as cepas virais com mutações mais deletérias para o vírus (ex. L90M), diminuindo principalmente o *fitness* viral não têm sucesso no *bottleneck* ou na seleção das cepas transmitidas da mãe para o filho.

No Brasil a profilaxia de primeira escolha é composta por AZT/3TC e LPV/r. Apesar de efeitos satisfatórios na manutenção da viremia materna em níveis indetectáveis, a terapia dupla composta pela associação entre AZT/3TC pode resultar em maior ocorrência da mutação M184V que é associada a resistência a lamivudina (Mandelbrot et al. 2001). No entanto, ao sofrer esta mutação, o vírus diminui o *fitness* viral e aumenta a atividade inibitória do AZT, TDF e, possivelmente, da d4T (Wei et al. 2002). Portanto, a droga 3TC pode ser utilizada em conjunto com AZT, TDF ou d4T, mesmo quando a mutação de resistência M184V for detectada.

Para detecção das mutações de resistência é recomendado o teste de genotipagem durante a gestação. Este teste é considerado um exame de urgência, pois em pacientes em tratamento ARV otimiza a terapia de resgate permitindo mudança do esquema ARV e reduz a chance de acúmulo progressivo de mutações e resistência antirretroviral. Em gestantes a genotipagem para resistência permite otimizar regime profilático ou tratamento ARV visando garantir a eficácia da profilaxia. Este teste é preconizado pelo MS para as gestantes que mantêm carga viral acima de 2000 cópias/mL após três meses de terapia ARV regular (Brasil

2010b). No entanto, essa medida parece não ser viável para a realidade brasileira, cujo diagnóstico para as gestantes ainda é tardio e o resultado final de um teste de genotipagem pode levar até 60 dias para ser entregue (Brasil 2010a).

Atualmente, tem sido possível identificar populações minoritárias do HIV-1 mediante uso de ensaios ultra-sensíveis como o PCR em tempo real. No entanto, no cenário da TMI, pouco se sabe sobre a presença e impacto de populações virais minoritárias resistentes ao HIV-1. Até o momento, há relato de um caso de TMI de população minoritária resistente a NNRTI no Brasil (Machado et al. 2004). A transmissão da resistência aos ARV pode limitar futuras opções de tratamento para o filho (Martinson et al. 2007).

1.9.6 MOMENTOS DE TRANSMISSÃO MATERNO-INFANTIL DO HIV-1E FATORES DE RISCO RELACIONADOS

A TMI do HIV-1 pode ocorrer durante a gestação (intra-útero), o parto (intraparto) e após o parto (pós-natal) através do aleitamento materno (Newell 2006). A maioria dos casos de transmissão de mãe para filho ocorre na fase tardia da gestação, durante o trabalho de parto e no parto propriamente dito (Jourdain et al. 2007).

A transmissão é considerada intra-útero quando RNA do HIV-1 é detectado em amostra de sangue colhida na primeira semana de vida da criança (Bryson et al. 1992). Acredita-se que a transmissão intra-útero pode ser mediada, principalmente, por microtransfusões materno-fetais ou infecções que alterem a permeabilidade e seletividade placentária (Kourtis et al. 2001). Ainda não é possível elucidar o momento da infecção intra-útero, mas sabe-se que vários compartimentos virais maternos (vírus circulante no plasma, secreções vaginais e leucócitos infectados) contribuem para transmissão durante a gestação (Kourtis et al. 2011).

A transmissão intraparto é definida quando a primeira amostra de sangue colhida nas primeiras horas de vida do bebê é negativa para RNA do HIV-1. Quando na ausência de aleitamento materno teste posterior apresenta resultado positivo para RNA do HIV-1 considera-se que a transmissão correu no momento do parto (Bryson et al. 1992). A transmissão intraparto é mediada pela exposição da pele e mucosas do bebê ao sangue e

secreções do canal de parto da mãe contendo partículas virais infectantes (Kourtis & Bulterys 2010).

O aleitamento materno representa um risco adicional de transmissão de 7 a 22%, sendo esse risco diretamente proporcional ao tempo de amamentação (Leroy et al. 1998; Nduati et al. 2001; Kourtis et al. 2006). Em países desenvolvidos e em alguns países em desenvolvimento, as mulheres infectadas são esclarecidas sobre o risco adicional da amamentação materna e são orientadas a substituírem a amamentação por leite artificial. No entanto, em países com alto índice de pobreza esta conduta é inviável, pois pode aumentar o risco de mortes neonatais por infecções (Coovadia 2009). No Brasil, são proscritos o aleitamento cruzado por outra nutriz, a alimentação mista (leite humano e fórmula infantil) e o uso de leite humano com pasteurização domiciliar (Brasil 2010b).

O risco de transmissão vertical é considerado um evento multifatorial para o qual contribuem fatores maternos e fetais. Entre os fatores maternos citamos o estado clínico, nutricional, imunológico, presença de DST, uso de drogas injetáveis e fatores obstétricos como o tipo de parto. Fatores relacionados à criança, como nascimento pré-termo com baixo peso também podem representar maior risco de TMI (Newell 2006). Portanto, a definição dos fatores associados ao risco da TMI do HIV-1 é complexa e envolve a interação entre todos os aspectos maternos, obstétricos e pediátricos.

A alta viremia materna é considerada, isoladamente, o principal fator de risco para a transmissão vertical do HIV-1 tanto intra-útero como intraparto (Katzenstein et al. 1999; Rogers & Shaffer 1999; Mock et al. 1999). A carga viral materna à época do parto parece ser um fator de risco ainda maior. A cada incremento de um log₁₀ cópias/mL na viremia materna, o risco de TMI aumenta em até 2,4 vezes (95% IC, 1,3 – 3,5) (Cooper et al. 2002).

O uso de HAART tem se mostrado eficaz na profilaxia da TMI. No entanto, regimes curtos podem aumentar o risco de transmissão, pois não conseguem suprimir a viremia materna até o momento do parto (Katz et al. 2010). Este dado reforça a importância do diagnóstico precoce da infecção pelo HIV-1 entre as mulheres em idade fértil para que as medidas profiláticas sejam introduzidas ainda no primeiro trimestre de gestação.

A TMI do HIV-1 pode ocorrer mesmo no contexto de partos a termo, viremia abaixo de 400 cópias/mL e sem aleitamento materno. Este tipo de TMI tem recebido a denominação

de transmissão residual. Tentando entender os fatores envolvidos com a transmissão residual do HIV-1, estudo envolvendo uma Coorte Perinatal Francesa (EPF-ANRS/C01) avaliou 19 casos de transmissão residual comparando a viremia materna em diferentes momentos da gestação com grupo controle não transmissor. Os 19 transmissores estudados tinham viremia plasmática superior ao grupo controle durante toda a gestação. Portanto, a transmissão residual foi atribuída não à viremia no momento do parto e sim a viremia ao longo da gestação (Tubiana et al. 2010). Este estudo mostrou ainda que a introdução tardia da HAART fez com que o declínio da viremia plasmática materna fosse mais lento em relação ao grupo controle, comprovando que a viremia materna representa o principal fator de risco para a TMI do HIV-1.

A resposta imune da gestante ao HIV-1 também parece contribuir para o risco de transmissão vertical (Bongertz 2001). Uma resposta local mediada por anticorpos neutralizantes parece ser eficaz no controle da rápida replicação viral durante a gestação. Entretanto esta resposta tem-se mostrado incapaz de controlar a transmissão do HIV-1 por células infectadas (Bongertz 2001). Resposta imune celular citolítica vigorosa em gestantes HIV-1/aids parece ser eficaz na proteção contra a transmissão de células infectadas pelo HIV-1 (Mac Donald et al. 1998).

O uso de drogas ilícitas pode acarretar dano vascular placentário que aumenta sua permeabilidade e, conseqüentemente, o risco da passagem do HIV-1 e de transmissão intra-útero. Em gestantes usuárias de drogas ilícitas, a HAART, mesmo que profilática, deve ser iniciada o mais precocemente possível (Brasil 2010b).

As práticas sexuais desprotegidas aumentam o risco de reinfecção pelo HIV-1 (acarretando aumento na carga viral), além da exposição a variantes resistentes do vírus e da aquisição de outras DST. As DSTs facilitam a infecção pelo HIV-1 por mecanismos biológicos e o diagnóstico precoce e o tratamento primário das DST devem fazer parte das estratégias eficazes para a prevenção da infecção pelo HIV-1 (Fleming & Wasserheit 1999). Em mulheres, a infecção por HIV-1 está, muitas vezes, associada com a suspeita e/ou confirmação de outras DST, especialmente úlceras genitais (OR = 2.28, CI 95%) (Dorjgochoo et al. 2009). Segundo Hoare (2008) a presença de DSTs aumenta o risco de infecção pelo HIV-1.

Entre os fatores obstétricos, a realização de parto vaginal e o tempo de ruptura de membranas superior a 4 horas são os mais críticos para TMI (Read 1999). Durante o parto, a transmissão pode ocorrer por um ou mais mecanismos: microtransfusão do sangue materno durante as contrações, ou após o rompimento das membranas, ou por contato direto do feto com secreções e sangue no trato genital. Para evitar a transmissão durante o parto, a cesariana eletiva tem sido recomendada. Este procedimento visa evitar a exposição da criança à secreção vaginal e ao sangue com vírus durante passagem pelo canal de parto, diminuindo o risco de transmissão vertical em até 50% em relação ao parto vaginal (The European Mode of Delivery Collaboration 1999; Grosch-Worner et al. 2000).

No Brasil, a cesariana eletiva é indicada para gestantes infectadas pelo HIV-1 que não realizaram a profilaxia ARV combinada durante a gestação, que usaram monoterapia AZT, ou que tenham carga viral desconhecida ou superior a 1000 cópias/mL em idade gestacional de 34 semanas ou mais (Brasil 2010b).

A grande maioria dos isolados de HIV-1 de gestantes infectadas são do tipo R5 que utiliza CCR-5 como co-receptor (Misrashi et al. 1998). Crianças com heterozigose para a mutação de 32 pares de base conhecida como CCR5 Δ 32, expostas ao HIV-1 durante a gestação são menos suscetíveis a transmissão vertical. Mesmo em casos de infecção pelo HIV-1, a heterozigose pode estar associada à progressão lenta para aids (Misrahi et al. 1998; Kostrikis et al. 1999; Mas et al. 1999; Ometto et al. 2000). Portanto, as características genéticas da criança referentes ao gene *CCR-5* parecem influenciar a transmissão vertical do HIV-1.

A prematuridade também tem sido associada a um maior risco de transmissão vertical do HIV-1. O parto prematuro tem sido relacionado com as características imunológicas e virais maternas, uma vez que gestantes com contagem de linfócitos T CD4⁺ inferior a 200 células/mm³ e alta viremia têm maior tendência ao parto prematuro (The European Mode of Delivery Collaboration 1999).

1.9.7 - CRIANÇAS EXPOSTAS AO HIV-1 DURANTE A GESTAÇÃO: DIAGNÓSTICO E ACOMPANHAMENTO

Todo filho de mãe infectada, sintomática ou não, nasce com sorologia positiva para o HIV-1 devido a transmissão transplacentária da IgG materna. Em casos de crianças

expostas, mas não infectadas, a sororreversão (negativação da sorologia) pode levar até 24 meses indicando que a sorologia não deve ser usada no diagnóstico precoce da TMI do HIV-1 (Gulia et al. 2007). O diagnóstico laboratorial precoce da transmissão vertical é baseado em técnicas moleculares sensíveis e específicas para a detecção de RNA viral ou DNA proviral permitindo o diagnóstico da transmissão vertical antes do primeiro ano de vida (Brasil 2010b).

Inicialmente, o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) estabeleceu que a persistência de anticorpos IgG anti-HIV-1 após os 15 meses de vida da criança exposta ao HIV-1 durante a gestação era indicativo de infecção na criança (CDC 1987). Posteriormente, devido aumento da sensibilidade dos métodos de diagnóstico sorológico que conseguem detectar quantidade cada vez menor de anticorpos circulantes, a idade estabelecida para o diagnóstico sorológico da infecção seguida de testes confirmatórios foi de 18 meses (CDC 1994). Segundo Gulia et al. (2007), crianças nascidas antes de 1997 faziam sororreversão até, aproximadamente, 15 meses de idade, enquanto aquelas nascidas após 1999 o tempo de sororreversão tem sido de até 21 meses.

O tempo para a negativação de testes sorológicos por anticorpos adquiridos por via transplacentária depende dos níveis de anticorpos maternos, da eficiência de transferência placentária e da taxa de catabolismo dos anticorpos após o nascimento (Scott et al. 2007). Crianças expostas ao HIV-1 durante a gestação, infectadas ou não, apresentam níveis mais baixos de imunoglobulinas totais do que crianças nascidas de mães saudáveis (Scott et al. 2007). A alta carga viral materna pode influenciar a baixa produção ou baixa transferência de anticorpos maternos de gestantes HIV-1/aids para filhos (Farquhar et al. 2005). No entanto, determinantes da transferência placentária ou de produção de anticorpos reduzida entre mulheres HIV-1/aids não são ainda conhecidos.

2 JUSTIFICATIVA

Nos países em desenvolvimento o avanço da epidemia de aids em mulheres em idade fértil traz como consequência um maior número de crianças sob o risco da transmissão vertical do HIV-1. Informações sobre as características imunológica, viral e epidemiológica de gestantes infectadas pelo HIV-1 podem indicar medidas mais eficazes para o diagnóstico, profilaxia e terapia. No Brasil apesar da implementação de medidas profiláticas para transmissão vertical desde 1996, só no período de janeiro/2009 a junho/2010, um total de 346 novos casos de TMI do HIV-1 foram registrados (Brasil 2010). Além disso, a juvenilização da epidemia entre mulheres indica risco de gestação na adolescência e consequentemente de transmissão vertical. Recentemente no período de janeiro/2009 a junho/2010, 491 casos de aids entre adolescentes (13-19 anos) foram notificados ao MS (Brasil 2009). Segundo dados oficiais do Ministério da Saúde, em torno de 20% dos nascidos vivos têm mães entre 15 e 19 anos de idade (MS/SVS/ DASIS - Sistema de Informações sobre Nascidos Vivos – SINASC. DATASUS, 2009). Em conjunto estes dados sobre o avanço da epidemia de aids em mulheres jovens e sobre o risco de gestação e transmissão vertical do HIV-1 ressaltam a importância de estudos que caracterizem melhor este grupo vulnerável (Brasil 2010b).

A presença de mutações associadas à resistência aos ARV pode comprometer o sucesso da profilaxia da TMI e de futuras opções terapêuticas em mulheres infectadas pelo HIV-1. Dados moleculares sobre a prevalência de mutações associadas à resistência aos ARVs e diversidade genética do HIV-1 em gestantes e crianças infectadas pela via perinatal em regiões distantes do epicentro da epidemia de aids no Brasil são escassos. Neste contexto, em 2007, iniciamos o projeto de pesquisa que deu origem aos resultados apresentados nesta tese após aprovação pelo MS/MCT/CNPq edital SCTIE-DECIT/CT-Saúde no. 022/2007 (Anexo II). O estudo da transmissão vertical do HIV-1 representa uma das linhas de pesquisa do Laboratório da Imunologia da Aids e da Hanseníase (Stefani et al. 2000; Alcântara et al. 2009; Cardoso et al. 2010; Costa et al. 2011).

Os estudos apresentados nesta tese de doutorado foram baseados numa coorte de mulheres gestantes infectadas pelo HIV-1 e filhos expostos. A parceria estabelecida com um eficiente programa público de pré-natal que inclui rastreamento para infecções em gestantes de todo o Estado de Goiás nos possibilitou incluir neste estudo um número representativo de

gestantes infectadas pelo HIV-1. Além das gestantes, as crianças expostas ao HIV-1 foram também acompanhadas até a definição do diagnóstico de transmissão vertical do HIV-1. O presente estudo representou uma oportunidade única de conhecer melhor o perfil sócio-demográfico e comportamental, avaliar fatores associados a TMI e identificar mutações de resistência e os subtipos virais circulantes entre as gestantes do Estado de Goiás. Os resultados aqui apresentados podem contribuir para o delineamento de políticas educacionais e estratégias para o diagnóstico precoce e implementação de medidas preventivas mais eficazes para transmissão vertical do HIV-1.

3 OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Estudar características imunológicas, virais, clínicas, epidemiológicas e identificar fatores associados à transmissão materno-infantil do HIV-1 entre gestantes infectadas pelo HIV-1/filhos recrutados no estado de Goiás.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 3.2.1 Caracterizar o perfil sócio-demográfico de gestantes infectadas pelo HIV-1 do Estado de Goiás;
- 3.2.2 Descrever as características imunológicas e virais de gestantes recém-diagnosticadas entre 2008-2010 e compará-las com as gestantes com diagnóstico prévio a gravidez em estudo;
- 3.2.3 Comparar aspectos sócio-demográficos, imunológicos e virais de gestantes adolescentes e adultas infectadas pelo HIV-1;
- 3.2.4 Identificar os subtipos do HIV-1 circulantes entre as gestantes no Estado de Goiás e nos neonatos infectados por transmissão vertical;
- 3.2.5 Identificar a prevalência de resistências transmitida e secundária entre as gestantes infectadas pelo HIV-1;
- 3.2.6 Definir o diagnóstico de transmissão vertical em crianças expostas ao HIV-1 do HIV-1;
- 3.2.7 Determinar o tempo para atingir sororreversão nas crianças expostas e não infectadas bem como os possíveis fatores associados;
- 3.2.8 Avaliar a prevalência de mutações primárias e secundárias ao uso de ARVs em filhos de mães HIV-1/aids infectados pela via perinatal;

4 MÉTODOS

4.1 População e área de estudo

Os estudos aqui apresentados foram realizados em duas coortes prospectivas de gestantes infectadas pelo HIV-1 e seus respectivos filhos recrutados em Goiânia (1.256.514 habitantes), capital de Goiás (8.849.105 habitantes). A primeira coorte foi recrutada entre 2000-2001, e a atualização sobre o desfecho clínico das crianças expostas ao HIV-1 foi feita mediante revisão sistemática dos prontuários médicos em 2008. O segundo grupo foi recrutado entre 2008-2010 e as crianças foram acompanhadas até o desfecho do diagnóstico de infecção ou ausência de infecção pelo HIV-1 até 2011.

Coorte 1: Foi composto por pares de gestantes HIV/aids-filhos recrutados entre abril/2000- agosto/2001 no Hospital Materno Infantil (HMI-SUS) na cidade de Goiânia/ Goiás, principal centro de referência regional para atendimento de gestantes HIV/aids e seus neonatos. Naquele período, 90% das gestantes infectadas pelo HIV-1 faziam acompanhamento pré-natal e o parto no HMI. A coleta de sangue do par mãe-filho foi realizada até 48 horas após o parto e durante os seis primeiros meses de vida do neonato. Estas amostras biológicas foram utilizadas para confirmar sorologicamente o diagnóstico de infecção por HIV da gestante e para caracterizar o perfil imunológico e viral da mesma, incluindo subtipagem do HIV-1 em duas regiões distintas do genoma viral (env/gag) mediante a técnica de Mobilidade de Heteroduplex (HMA). As amostras biológicas das crianças expostas ao HIV-1 durante a gestação/parto foram utilizadas para contagem de células CD4+ e para realização de testes moleculares para definir precocemente a ocorrência de transmissão vertical por RT-PCR para HIV-1.

Dados referentes ao diagnóstico materno, ao uso de HAART no pré-natal, definição do esquema ARV usado, tipo de parto e informações dos recém-nascidos como sexo, peso, estatura, idade gestacional e uso de AZT oral foram obtidos mediante revisão sistemática dos prontuários médicos (HMI/SUS). Informações relacionadas à data do diagnóstico materno,

situação clínica da gestante na gravidez em estudo (assintomática/aids) e ocorrência de doenças oportunistas foram obtidas dos prontuários médicos do Hospital Anuar Auad (HAA/HDT/SUS) que é o centro de referência estadual para o atendimento de pacientes infectados pelo HIV-1. Mediante revisão de prontuários médicos foram obtidos os dados relacionados às crianças, como uso de profilaxia com AZT nas primeiras 6 semanas de vida, informações clínicas e resultados da sorologia anti IgG (ELISA- ICE HIV-1.0.2 Abbot/Murex 1.2.0, Inglaterra) realizada durante os primeiros 24 meses de vida das crianças expostas ao HIV-1 ou até a sororreversão (negativação da sorologia inicialmente positiva, nas crianças não infectadas pela via perinatal).

Coorte 2: Estudo prospectivo de uma coorte de pares de mães infectadas pelo HIV-1/crianças expostas conduzido entre junho/2008-junho/2010 no estado de Goiás. A maioria das gestantes foi diagnosticada para a infecção pelo HIV-1 realizada durante o pré-natal pelo “Programa de Proteção à Gestante” (PPG) da rede de saúde pública do estado que tem uma cobertura de quase 100% dos municípios de todo o estado (em torno de 240 municípios). Este programa não exclui da triagem mulheres que já tenham diagnóstico confirmado de infecção pelo HIV-1. Desta forma este grupo de estudo incluiu tanto gestantes recém diagnosticadas na gestação em estudo como gestantes previamente diagnosticadas, mas que não fizeram parte da coorte 1. O PPG inclui triagem sorológica inicial em eluato de sangue seco coletado em papel filtro foi realizada no “Instituto de Diagnóstico e Prevenção/Associação de Pais e Amigos dos Excepcionais (IDP/APAE)” por ELISA (UMELISA HIV 1+2 Recombinant, Tecnosuma; Havana, Cuba). Resultados positivos ou indeterminados foram confirmados em outra amostra de sangue utilizando-se Imunofluorescência Indireta (Biomanguinhos, Fundação Oswaldo Cruz; Rio de Janeiro, Brasil), ou imunoblot ou western blot (HIV BLOT 2.2, Genelabs Diagnostics Pte Ltd, Singapore). Como parte do Programa de Proteção as gestantes, além da triagem sorológica para HIV-1/2 as gestantes são testadas quanto a hepatites B e C, infecção por HTLV, sífilis, toxoplasmose, rubéola, doença de Chagas e infecção por CMV.

Durante este segundo período de estudo (2008-2010), 217,590 nascidos vivos no Estado de Goiás foram notificados ao Sistema de Saúde Pública – DATASUS e 146.897 (67,5%) gestantes foram triadas pelo PPG/IDP/APAE. Do total de 198 gestantes com diagnóstico confirmado de infecção pelo HIV-1, 172 (86,9%), de mais de 50 diferentes municípios do Estado de Goiás, participaram da coorte 2. Portanto, nosso trabalho representa

quase a totalidade de gestantes que viviam com HIV/aids no Estado de Goiás durante o período em estudo.

Para a coorte 2 as gestantes com diagnóstico confirmado para a infecção pelo HIV-1 foram recrutadas durante o pré-natal em duas instituições públicas de referência para o diagnóstico de HIV-1 e acompanhamento dos pacientes (Instituto de Diagnóstico e Prevenção/IDP e Hospital Anuar Auad/HDT/SUS) em Goiânia, Goiás. Dados epidemiológicos maternos incluindo os fatores de risco para TMI foram coletados mediante entrevista individual usando questionário padronizado (Anexo II). Informações clínicas foram obtidas mediante revisão dos prontuários médicos arquivados no HAA/HDT/SUS. A profilaxia da TMI nas gestantes infectadas pelo HIV-1 seguiu as recomendações preconizadas pelo MS/PNDST/AIDS: dois NRTIs (AZT/3TC - Combivir[®]) e um PI (LPV/r - Kaletra[®]) (Brasil 2010b).

Os projetos de pesquisa que geraram estes resultados foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Humana e Animal do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás e pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Hospital Anuar Auad, protocolo # 003/2008 (Anexo III). Os termos de consentimento esclarecidos foram assinados por todas as participantes que também assinaram o termo de consentimento de seus filhos (Anexo IV).

4.2 Ensaio laboratoriais

Amostra de sangue materno foi coletada durante o último trimestre de gestação e no máximo 30 dias após o parto para a contagem de linfócitos T CD4⁺, avaliação da carga viral e ensaio de genotipagem do HIV-1. Amostras de sangue dos bebês foram obtidas para sorologia anti-HIV-1, contagem de linfócitos T-CD4⁺ e diagnóstico molecular da infecção pelo HIV-1 através da detecção do RNA viral. As crianças foram consideradas não infectadas quando o RNA do HIV-1 não foi detectado nas amostras de sangue colhidas aos 30 e 120 dias de vida. Criança com RNA viral detectável em duas amostras de sangue colhidas consecutivamente após os 30 dias de vida era considerada infectada. Para as crianças infectadas foi realizado o teste de genotipagem do HIV-1. Para as crianças expostas e não infectadas o teste sorológico ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) para detecção de IgG anti-HIV-1e 2 foi realizado durante os primeiros dois anos de vida ou até a sororreversão.

4.2.1 Ensaio Sorológico – ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*)

O acompanhamento da sororreversão das crianças expostas ao HIV-1 durante a gestação e não infectadas foi realizado através do ensaio imunoenzimático ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) para determinação de anticorpos anti-HIV-1 (grupos M e O) e HIV-1-2 (Wiener® Laboratórios, Rosario, Argentina). O Ensaio foi realizado manualmente conforme protocolo do fabricante.

Em uma placa de poliestireno revestida por antígenos sintéticos com sequências correspondentes aos genes *pol* e *gag* foram adicionados 200µL do diluente de amostra (Albumina bovina em solução fisiológica tamponada com tampão fosfato pH 7,2) e 10µL do plasma colhido com EDTA. Em seguida, a placa foi incubada na estufa a 37°C por 30 min. Após o período de incubação, a placa foi lavada cinco vezes com tampão de lavagem (cloreto de sódio 1,4 mol/L em tampão fosfato 100mmol/L e tensoativo não iônico 0,1g/L) diluído 10x empregando-se 300µL/vez/cubeta. Após a lavagem da placa, foi acrescentada uma gota (50µL) de conjugado (anti-imunoglobulinas humanas conjugadas com peroxidase). Após mais uma etapa de incubação em estufa a 37°C por 30 min, a placa foi lavada cinco vezes com tampão de lavagem e foram acrescentadas uma gota do substrato peróxido de hidrogênio 60 mmol/L em tampão citrato 50 mmol/L pH 3,2 e uma gota do cromógeno tetrametilbenzidina (TMB) 0,01 mmol/L em ácido clorídrico 0,1N. Seguiu-se uma etapa de incubação a TA por 10 min, quando foi adicionado uma gota do ácido sulfúrico 2N para parar a reação. A leitura da densidade ótica foi realizada em espectrofotômetro em comprimento de onda de 450nm.

As amostras foram testadas simultaneamente com dois controles positivos e três controles negativos. As absorbâncias dos controles foram utilizadas como critérios de validação do teste e para cálculo do *cut off*: média das absorbâncias dos controles negativos mais 0,150. Amostras cuja absorbância estava acima do valor do *cut off* mais 10% eram consideradas reagentes, amostras com absorbância abaixo do valor do *cut off* menos 10% foram consideradas não-reagentes e aquelas com valor da absorbância entre $\pm 10\%$ o valor do *cut off* foram reportadas como indeterminadas.

4.2.2 Quantificação dos linfócitos T CD3⁺, T CD4⁺ e T CD8⁺

A análise do perfil imunológico das mães e das crianças inclusas neste estudo foi feita a partir da quantificação de linfócitos T CD3⁺, T CD4⁺ e T CD8⁺ através da imunofenotipagem das células de sangue periférico por citometria de fluxo.

Primeiramente, a 100µL de sangue total foram acrescentados 10µL da solução de anticorpos monoclonais contra os marcadores de superfície celular CD4, CD8 e CD3 (tripla marcação CD4/CD8/CD3 - Cytognos®) marcados com os fluorocromos Isotiocinato de Fluoresceína (FITC), Ficoeritrina (PE) e Ficoeritrina –Cy5 (PE-Cy5), respectivamente. Após 15 minutos de marcação à temperatura ambiente (TA) e no escuro, foi acrescido 1mL de uma solução de lise contendo 15% de formaldeído e 50% de dietilenoglicol (Solução de Lise – FACS™ Lysing Solution, B&D) para lise das células vermelhas que podem interferir na quantificação dos linfócitos. Após 10 minutos de incubação a TA e no escuro foi realizada uma centrifugação a 2000 rpm durante 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* lavado duas vezes com solução Fosfato-Borato-Sulfato (PBS) 10% enriquecido com soro bovino fetal (2%) e azida sódica (0,1%) sob centrifugação de 2000 rpm durante 5 minutos. O *pellet* foi ressuscitado com 500µL de paraformaldeído (0,5%) e as células foram adquiridas para análise imediatamente, ou no máximo até 5 dias se mantidas a 4°C no escuro. A aquisição das células foi realizada no aparelho FACSCalibur™ (Becton & Dickson, San Jose, CA, USA), gentilmente cedido pelo Laboratório de Imunofenotipagem do Hospital Araújo Jorge, Goiânia-Go.

A contagem absoluta dos linfócitos T CD3⁺, T CD4⁺ e T CD8⁺ T foi obtida a partir de uma combinação de resultados de contador hematológico e dos resultados percentuais obtidos com o FACSCalibur™. Os cálculos foram feitos da seguinte maneira:

$$\text{CD3}/\mu\text{L} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de linfócitos}/\mu\text{L} \times \text{CD3}(\%)}{100}$$

$$\text{CD4}/\mu\text{L} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de células CD3}^+/\mu\text{L} \times \text{CD4}(\%)}{100}$$

$$\text{CD8}/\mu\text{L} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de células CD3}^+/\mu\text{L} \times \text{CD8}(\%)}{100}$$

onde, o n° de linfócitos/µL foi obtido através do contador hematológico; CD3(%) corresponde ao percentual de células CD3⁺ obtido mediante “janela” ou *gate* na população linfocitária total; CD4(%) e CD8(%) refere-se ao percentual de células CD4⁺ e CD8⁺, respectivamente, obtido mediante *gate* na população de células CD3⁺.

4.2.3 Quantificação da Viremia Plasmática

A quantificação do RNA do HIV-1 foi realizada em transcrito reverso do RNA viral através da técnica de RT-PCR (Amplicor HIV-1 Monitor test, versão 1.5; Branchburg - NJ, USA) utilizando-se amostras de plasma – EDTA separadas até 6 horas após a coleta e estocadas a – 80°C até o momento do teste.

4.2.3.1 Extração e precipitação do RNA viral

200 µL de plasma-EDTA foram utilizados para a extração do RNA viral mediante a lise das partículas virais com um agente caotrópico (Tampão Tris-HCL, Tiocianato de guanidina a 68%, Ditiotretitol a 3% e Glicogênio a 1%) e precipitação do ácido nucleico do HIV-1 com álcool isopropílico 100% e etanol 70%.

4.2.3.2 Transcrição reversa do RNA viral

As reações de transcrição reversa do RNA e de amplificação do cDNA por PCR foram efetuadas com enzima termoestável recombinante *Thermus thermophilus* (rTth pol) DNA Polimerase. Na presença de manganês e sob condições de tampão adequadas (Manganês a 2%, ácido acético, corante de amaranço, azida sódica a 0,05%, Tampão Bicina, Glicerol, Acetato de Potássio) a rTth pol apresenta uma atividade simultânea de transcriptase reversa e de DNA polimerase. Esta propriedade faz com que a transcrição reversa e a amplificação por PCR ocorram na mesma reação. Os iniciadores (biotinilados nas extremidades 5') utilizados para formar uma cadeia de DNA complementar (cDNA) ao RNA alvo foram SKCC1B e SK145 (detalhes no protocolo do fabricante).

4.2.3.3 Amplificação do DNA proviral

Após transcrição reversa do RNA alvo do HIV-1, para realizar reação cíclica de amplificação do cDNA dependente da variação de temperatura, utilizamos o termociclador GeneAmp PCR Systems 2400 – Perkin Elmer, Connecticut, USA. Após 31 ciclos a 94°C, 52°C e 72°C, ocorre amplificação exponencial de fragmentos de DNA de 155 pares de bases (amplicom).

4.2.3.4 Hibridização e Detecção do DNA viral

O amplicom do HIV-1 foi quimicamente desnaturado por uma solução de Hidróxido de Sódio a 1,6%, EDTA e corante de Amaranço, para formar uma fita simples de DNA. Alíquotas de 25 µL de amplicom desnaturado foram adicionadas em uma microplaca revestida por sondas oligonucleotídicas específicas para o HIV-1 (SK102). Para obter resultados quantitativos, foi realizada a análise de diluições sucessivas do amplicom desnaturado na microplaca.

Posteriormente, à reação de hibridização, o conjugado Avidina-Peroxidase HRP (Horse Radish Power), na presença de peróxido de hidrogênio, agiu sobre o substrato TMB (3,3', 5,5'- Tetrametilbenzidina) formando um complexo colorido. Para interromper a reação foi utilizado ácido sulfúrico a 4,9 % e a densidade óptica foi medida a 450 nm através do leitor automatizado para microplacas (Behring EL 311 Microplate Reader).

4.2.3.5 Quantificação do RNA viral

O Teste Amplicor HIV-1 Monitor test, versão 1.5, quantifica o RNA viral do HIV-1 utilizando uma segunda seqüência alvo denominada Padrão de Quantificação do HIV-1 (QS) que é adicionada à amostra teste numa concentração conhecida. Este QS é uma molécula de RNA não infecciosa, composta de 233 nucleotídeos e transcrita *in vitro*, apresentando regiões de ligação aos iniciadores idênticas à seqüência alvo do HIV-1. Dentro dos limites lineares do ensaio (400 – 750.000 cópias/mL), a densidade óptica (DO) total, calculada através do programa AMPLICALC® (Roche Diagnostics, Branchburg, NJ, USA), é proporcional à quantidade de RNA do HIV-1 presente em cada reação de amplificação por PCR. O cálculo é feito a partir da proporção entre a DO total do HIV-1, a DO total do QS e o número de moléculas de RNA do QS introduzidas que varia de acordo com o lote dos reagentes.

Os resultados obtidos foram expressos em número de cópias/mL e \log_{10} cópias/mL, segundo recomendações do fabricante. Resultados inferiores a 400 cópias/mL foram relatados como “abaixo do limite de detecção do teste” e os valores superiores a 750.000 cópias/mL, como “acima do limite de detecção do teste”. Para análise estatística, para carga viral abaixo de 400 cópias/mL foi atribuído valor arbitrário de 399 cópias/mL.

4.3 Genotipagem do HIV-1

4.3.1 Extração do DNA genômico

A extração do DNA genômico foi realizada apenas quando o RNA viral não foi obtido com sucesso a partir do plasma. A extração do DNA genômico foi obtido a partir de sangue total colhido com ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) em presença de enzima protease e do tampão de lise, seguida por 10 min de incubação à temperatura de 56 °C. Esse tratamento promove a lise das células mononucleares do sangue periférico com liberação do DNA genômico que foi posteriormente precipitado com 200 µL de etanol 98% (*QIAamp® DNA Blood Mini Kit, Qiagen GmbH, Hilden, Alemanha*). O material foi centrifugado (Eppendorf, 8000 rotações por minuto, rpm 1 min), promovendo a adsorção do DNA a uma membrana de sílica. Seguiram-se duas centrifugações com tampão de lavagem, para remoção de proteínas e outros contaminantes garantindo a pureza do DNA. A eluição do DNA da membrana de sílica foi realizada com uma rápida etapa de centrifugação com tampão de eluição. As amostras de DNA foram armazenadas à temperatura de -80 °C.

4.3.2 Extração do RNA viral

A extração do RNA foi realizada através do kit *QIAamp® Viral RNA Mini Kit* (Qiagen GmbH, Hilden, Alemanha), conforme protocolo do fabricante: a partir de 140µL de amostra de plasma, 5,6µL da enzima carrier-RNA e 560µL do tampão de lise, seguido por 10 min de incubação à temperatura ambiente (15-25 °C), as partículas virais sofrem lise e o RNA viral é precipitado com 560 µL de etanol absoluto (Merck). Durante uma rápida centrifugação (8000 rpm, 1 min), o RNA é adsorvido a uma membrana de sílica. Seguem-se duas etapas rápidas de centrifugação com 500µL de tampão de lavagem em cada etapa para que proteínas e outros contaminantes sejam retirados garantindo a pureza do RNA. A eluição do RNA da coluna de sílica é realizada com uma rápida centrifugação com 60µL de tampão de eluição. As amostras de RNA viral estão sendo armazenadas à temperatura de -80 °C.

4.3.3 Síntese do DNA complementar: Transcrição reversa do RNA (RT-PCR)

A transcrição reversa do RNA para obtenção do cDNA foi realizada através do kit de transcrição reversa do RNA (Invitrogen) conforme protocolos do fabricante: a partir de 10µL de RNA extraído ($\leq 1 \mu\text{g}$), 1 µL de Desoxirribonucleotídeos Trifosfatados (dNTPs constituída por dATP desoxiAdenina Trifosfatada; dCTP desoxiCitosina Trifosfatada; dTTP desoxiTimina Trifosfatada e dGTP desoxiGuanina Trifosfatada) (10 mM) e 1 µL primer randômico (150 ng/µL) segue-se uma incubação de 5 min a 65°C e após, choque térmico em

gelo por 1 min. Em seguida é adicionado 1 µL da enzima super script III RT (200 U/µL), 4 µL de tampão 5x, 1 µL do agente redutor ditioneitol (DTT a 0,1 M), 1 µL da enzima RNase out (40 U/mL) e, 1 µL de água ultra pura (GIBCO). A reação de retrotranscrição é realizada com o período de ciclagem de 25°C por 5 min, 50°C por 60 min e 70°C por 15 min. As amostras de cDNA foram armazenadas à temperatura de -80 °C.

4.3.4 Amplificação do gene *pol* do HIV-1 através da reação de *nested*-PCR

Duas regiões diferentes do gene *pol* foram alvos de amplificação por “*nested*”-PCR: o gene completo da protease (PR) (HXB2, 2253 – 2549) e o fragmento de 750 pb do gene da transcriptase reversa (TR) (HXB2, 2550 – 3299). Na primeira etapa da “*nested*”-PCR foram utilizados tampão de PCR 10x (Invitrogen), MgCl₂ a 50mM (Invitrogen), dNTP 25mM (Invitrogen), Taq DNA polimerase a 5U/µL, *primers* externos Kozal-1 e Kozal-2 a 10 pmol/µL cada (GIBCO) (Kozal, et al., 1996), 5µL do cDNA obtido por RT-PCR e água Ultra Pura (Gibco) qsp 50µL. Na segunda etapa da “*nested*”-PCR foram utilizados tampão de PCR 10x (Invitrogen), MgCl₂ a 50mM (Invitrogen), dNTP 25mM (Invitrogen), Taq DNA polimerase a 5U/µL, *primers* internos para a região *pol* DP10 e Frenkel-2 a 10 pmol/µL cada (GIBCO) (Frenkel et al., 1995), 5µL do produto da primeira etapa da *nested*-PCR e água ultra pura (Gibco) qsp 100µL. As duas etapas da “*nested*”-PCR foram realizadas em termociclador automático (GeneAmp PCR System 9700) utilizando o seguinte programa de ciclagem: 1 ciclo de 94°C por 1 min, 35 ciclos de 94°C por 45 seg, 55°C por 45 seg e 72°C por 2 min e extensão final de 72°C por 10 min e 4 °C por tempo indeterminado (Cardoso et al 2009).

4.3.5 Eletroforese em gel de agarose a 1%

Visando confirmação dos produtos de amplificação por “*nested*”-PCR de fragmentos de 1111 pb o gene *pol*, o material obtido foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1% (GIBCO) em presença de brometo de etídio 0,005% (50 µL de brometo de etídio, GIBCO/ 1 L de tampão TAE 1x, GIBCO). Uma mistura contendo 4 µL de material amplificado + 1 µL de azul de bromofenol puro (GIBCO) foi aplicada no gel e paralelamente aplicou-se uma mistura de padrão de peso molecular (100 pb Low DNA Mass Ladder, Invitrogen) e 1 µL de azul de bromofenol puro (GIBCO). Este marcador de peso molecular é uma mistura de fragmentos de 2000, 1200, 800, 400, 200 e 100 pb contendo 200, 120, 80, 40, 20, e 10 ng de DNA, respectivamente. A corrida eletroforética foi realizada em cuba horizontal (Horizon 11-

14 e 25-25 Gel Electrophoresis Apparatus, Gibco-Life Technologies, USA), durante 1 h a 100 V, 400 mA em tampão TAE 1x. O gel analisado sob luz ultravioleta a 310 nm de comprimento de onda para visualização de bandas fluorescentes.

4.3.6 Purificação dos produtos amplificados do gene *pol* obtidos por *nested*-PCR.

A purificação dos produtos de PCR foi realizada empregando-se o kit *QIAquick® PCR Purification Kit/QIAGEN, Qiagen GmbH, Hilden, Alemanha*. Resumidamente, 96µL do produto da segunda etapa da “*nested*”-PCR para o gene *pol* foram adicionados a 480µL de tampão com alta concentração de sais caotrópicos que modifica a estrutura da água e permite um pH ótimo para ligação eficiente de produtos de PCR de dupla fita e, ainda é removedor de *primers*, sais, enzimas e nucleotídeos não incorporados. Mediante etapa rápida de centrifugação (13000 rpm por 1 min), o produto de PCR é adsorvido a uma membrana de sílica. Segue-se outra etapa rápida de centrifugação com um volume de 750 µL de tampão de lavagem, para que as proteínas e outros contaminantes sejam retirados garantindo a pureza do produto de PCR. Uma centrifugação adicional é requerida para eliminação total de resíduos. A eluição do produto puro de PCR da membrana de sílica é realizada com 50 µL de tampão de eluição que provoca a redução do pH e da concentração de sais, seguida por uma incubação de 1 min a temperatura ambiente e uma etapa rápida de centrifugação. As amostras do produto de PCR purificadas foram armazenadas à temperatura de -20 °C.

4.3.7 Sequenciamento automatizado do gene *pol*

Os produtos de PCR purificados do gene *pol* foram submetidos ao sequenciamento automatizado utilizando o kit *DYEnamic ET Dye Terminator (GE Healthcare)*. Em placas de 96 poços (*Applied Biosystems Inc, Foster City, CA, USA*) foram adicionados 2 µL de produto de PCR purificado, 3 µL de tampão de sequenciamento 5x (*Applied Biosystems Inc, Foster City, CA, USA*), 4 µL de cada um dos 8 *primers* separadamente a 1,5 pmol/µL (*Gibco*) (PR: DP10, DP16, RT9, DP17; TR: DP11, RT1, F3 e F2), 1 µL de *DyeNamic ET Dye Terminator (GE Healthcare)* e 5 µL de água ultra pura (*Gibco*). A reação de sequenciamento foi realizada em termociclador automático (*GeneAmp PCR System 9700*) com o seguinte programa de ciclagem: 25 ciclos de 95 °C por 20 seg, 50°C por 15 seg e 60°C por 60 seg.

Os produtos seqüenciados foram submetidos à precipitação com isopropanol e etanol para purificação do material. Foram adicionados à placa contendo amostra seqüenciada 60µL de isopropanol 65% (Merck), homogeneizadas em vortex por 30 seg, seguida de incubação de 20 min à temperatura ambiente ao abrigo da luz. Seguiu-se uma centrifugação de 45 min a 2000 g (força centrífuga relativa à gravidade). Após esse período os sobrenadantes são descartados por inversão das placas em papel absorvente por 2 min. Foram adicionados 250 µL de etanol 60% (MERCK) seguida por centrifugação por 10 min a 2000 g. Novamente os sobrenadantes foram descartados e adicionados 100 µL de etanol 60% (MERCK) seguido por centrifugação por 10 min a 2000 g. Os sobrenadantes foram descartados e a placa invertida centrifugada por 1 min a 500 rpm para sua completa secagem. As amostras foram ressuspensas com 10 µL de formamida Hi-Di (Applied Biosystems Inc, Foster City, CA, USA) para desnaturação da fita dupla de DNA, seguida por um período de incubação de 2 min a 95°C e choque térmico em gelo por 1 min. Finalmente a leitura dos eletroferogramas foi realizada em seqüenciador automático para leitura dos eletroferogramas (ABI PRISM® 3130 Genetic Analyser da Applied Biosystems do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade federal de Goiás (IPTSP/UFG).

4.3.8 Análise dos cromatogramas

As seqüências foram editadas manualmente por comparação de complementaridade dos *contigs* e alinhadas com a seqüência de referência HXB2 (GenBank, K03455), através do programa *Staden Package* 1.6 para Windows (<http://staden.sourceforge.net/>). Este programa consiste em uma série de ferramentas para preparação das seqüências (pregap4), montagem e edição (gap4) e análise de seqüência de DNA e proteína.

Todas as seqüências geradas através da edição manual no programa *Staden Package* foram submetidas a análise de controle de qualidade para garantir ausência de possíveis contaminações entre as amostras (Learn, Jr. *et al.* 1996). Esta análise foi realizada através do programa de bioinformática *HIV-1 Quality Analysis Pipeline* (<http://sanbi.ac.za>), que testa as seqüências para possíveis existências de contaminações usando BLAST (comparação) com um banco de dados público no GenBank de aproximadamente 200.000 sequencias publicadas e um BLAST com um banco de dados interno do laboratório.

4.3.9 Análise genética

A presença de mutações transmitidas relacionadas à resistência aos ARV foi avaliada com a ferramenta de bioinformática Calibração da População com Resistência (CPR), do programa da Universidade de Stanford [Stanford HIV-1 Drug Resistance Mutation (SDRM) Database - <http://HIV-1db6.stanford.edu>] que, define as mutações a partir de diferenças da sequência consenso do subtipo B do HIV-1 e a presença de mutações secundárias foi analisada pelo SDRM e através da comparação com o banco de dados da Sociedade Internacional de AIDS dos Estados Unidos (IAS-USA). Através da análise de similaridade genética, as mutações virais encontradas pela técnica de seqüenciamento são interpretadas e fornecem informação do perfil de resistência as drogas ARV (suscetível, potencial de baixo nível, baixo nível, intermediário e alto nível de resistência).

A definição dos subtipos genéticos dos isolados do HIV-1 estudados foi realizada empregando ferramentas de subtipagem do HIV-1 como: REGA HIV-1 versão 2.0 através do site (<http://bioafrica.net/subtypetool/HTML>), e por fim, inferência filogenética.

A construção da árvore filogenética foi realizada através do alinhamento das sequências de estudo com sequências de referências mais representativas dos diversos subtipos puros e recombinantes do grupo M do HIV-1 obtido através do banco de dados Los Alamos HIV-1 Database (http://HIV-1_web.lanl.gov). O alinhamento foi obtido através do programa Clustal X versão 2.0 (Thompson et al. 1994) obtido através do site <http://bips.u-strasbg.fr/fr/Documentation/ClustalX/>. O alinhamento foi editado manualmente através do programa BioEdit versão 5.0.9 (Hall 1999) obtido através do site <http://mbio.ncsu.edu/BioEdit/Bioedit.html>. Por fim, a árvore filogenética foi construída através do método *neighbor-joining* (Kumar et al. 2001) e modelo evolutivo Kimura 2-parâmetros (Kimura 1980) com valor de suporte (*bootstrap*) de 1000 replicatas, usando o programa MEGA versão 5.0 (Tamura et al. 2007) obtido através do site http://megasoftware.net/bug_fixes.html. A sequência do vírus da imunodeficiência símia do chimpanzé (SIVcpz) foi utilizada como grupo externo.

Os isolados virais que apresentaram subtipos discordantes em mais de uma região genômica do HIV-1 foram analisados para confirmação da recombinação através do programa SIMPLOT versão 3.5.1 (Lole et al. 1999), sob os seguintes parâmetros: método *neighbor-joining*, modelo evolutivo Kimura 2-parâmetros com valor de *bootstrap* de 1000 replicatas, janela de 200pb com janela de 20 pb, *gap-stripped* e taxa de transcrição/transversão no valor de 2,0.

Todas as sequências dos isolados do HIV-1 obtidas neste estudo foram depositadas no banco de dados do GenBank (JN114114 – JN114235; JN662426 – JN622437).

4.4 Análise da Mobilidade dos Heteroduplex (HMA) para subtipagem genética do HIV-1.

Os subtipos do HIV-1 em amostras obtidas das mães HIV/aids foram identificados pelo Ensaio de Mobilidade de Heteroduplex (HMA) (Delwart et al. 1993), utilizando-se como regiões alvo parte dos genes *env* e *gag* (Heyndrickx et al. 2002). Amostras de sangue total foram colhidas em vacutanier-EDTA, aliquotadas e congeladas a -70°C . Os reagentes necessários para a realização do HMA *env* e *gag* (iniciadores, plasmídeos de cepas de referência) foram fornecidos pelo “AIDS Reagent Program” do “National Institute of Health (NIH)/AIDS Research and Reference Reagent Program, USA”. Para realização desta técnica foram seguidos os protocolos fornecidos pelo AIDS Reagent Program: “HIV *env* Subtyping Kit Protocol version 5” e “HIV-1 group M *gag* Heteroduplex Mobility Analysis (HMA) Subtyping Kit”. Resumidamente, estes protocolos incluem:

4.4.1 Extração e Purificação do DNA genômico

1 - Lise das hemácias: foram acrescentados 500 μL de sangue total a 2 mL de uma Solução Lítica (Triton X-100, MgCl_2 1 M, Tris-HCl 1 M e Sucrose 1 M) e depois centrifugado a 4.000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi desprezado.

2 - Lise das células mononucleares: Após desprezar o sobrenadante, 1 mL da solução lítica DNazol – Tiocianato de guanidina, Isotiocianato de Guanidina, Monotiocianato de guanidina e ácido tiocianato (Molecular Research Center Inc. Cincinnati, Ohio, USA) - foi acrescentada sobre o sedimento e posteriormente a suspensão foi transferida para um tubo de 2 mL e aguardou-se 15 minutos para lise das células mononucleares.

3 - Precipitação e Purificação do DNA: Foram acrescentados 500 μL de etanol 100% e refrigerou-se a amostra por uma hora a -70°C . O material foi centrifugado a 14.000 rpm, a temperatura ambiente (TA) e o sedimento lavado com etanol 80% duas vezes, secado a 60°C por 30 minutos e solubilizado com um volume de 50 μL de Tris-EDTA (TE), para evitar a ação de DNAses e RNAses.

4.4.2 Quantificação de DNA genômico

A concentração de DNA e o grau de pureza da amostra foram mensurados através do quantificador de RNA e DNA (Amersham Pharmacia Biotech – GeneQuant RNA/DNA Calculator, Cambridge, GMBH) em amostra diluída 1:20 em água ultrapura (Milli-Q Academic, Gradient, Biocel Synthesis, São Paulo, Brasil). Segundo recomendações do protocolo do AIDS Reagent Program/NIH/USA foi utilizado aproximadamente 1 µg de DNA por reação de PCR.

4.4.3 Amplificação do DNA proviral

A amplificação do DNA proviral das amostras foi realizada em duas etapas - “Nested-PCR” utilizando-se dois pares de iniciadores distintos para a região env.

PCR 1ª Etapa	PCR 2ª Etapa
Tampão PCR 10x _____ 5 µL	Tampão PCR 10x _____ 10 µL
MgCl ₂ 10mM _____ 6,25 µL	MgCl ₂ 10mM _____ 12,5 µL
dNTPs 1,25mM _____ 5 µL	dNTPs 1,25mM _____ 10 µL
Primer ED5 5pmol _____ 2 µL	Primer ES7 5pmol _____ 4 µL
Primer ED12 5pmol _____ 2 µL	Primer ES8 5pmol _____ 4µL
H ₂ O milliQ _____ 28,25 µL	H ₂ O milliQ _____ 57 µL
Taq polimerase (5U) _____ 0,5 µL	Taq polimerase (5U) _____ 0,5 µL
Amostra _____ 5 µL	Amostra (1ª etapa) _____ 2 µL
Volume final _____ 50 µL	Volume final _____ 100 µL

Na primeira etapa de amplificação, utilizamos os pares de iniciadores ED5 (5'ATGGGATCAAAGCCTAAAGCCATGTG3') e ED12 (5'AGTGCTTCCTGCTGCTCCCAAGAACCCAAG 3') que amplificam um fragmento de ~1.25 Kb da região V1-V5 que codifica a gp120. Na segunda etapa, utilizamos os pares de

iniciadores ES7 (5'TGTAAAAACGACGGCCAGTCTGTAAATGGCAGTCTCTAGC3') e ES8 (5'CAGGAAACAGCTATGACCCACTTCTCCAATTGTCCCTCA3') que amplificam um fragmento de aproximadamente 666 pb da região V3 - V5. As duas etapas da PCR obedeceram ao seguinte programa no termociclador: 3 ciclos de 1 min a 94°C, 55°C e 72°C, 32 ciclos de 15 seg a 94°C, 45 seg a 55°C e 1 min a 72°C e 1 ciclo de 5 min a 72°C (Perkin Elmer - GeneAmp PCR Systems 2400, Connecticut, USA; MJ Research – PTC-150 Minicycler version 3.0, CA, USA).

A amplificação do DNA proviral das amostras foi realizada em duas etapas - “Nested-PCR” utilizando-se dois pares de iniciadores distintos para a região gag.

PCR 1ª etapa	PCR 2ª etapa
Tampão PCR 10x _____ 5 µL	Tampão PCR 10x _____ 10 µL
MgCl ₂ 25mM _____ 3 µL	MgCl ₂ 10mM _____ 10 µL
dNTPs 1,25mM _____ 0,5 µL	dNTPs 1,25mM _____ 1 µL
Primer H1G777 10pmol _____ 1 µL	Primer H1Gag1584 10pmol _____ 4 µL
Primer H1P202 10pmol _____ 1 µL	Primer g17 10pmol _____ 4 µL
H ₂ O milliQ _____ 38 µL	H ₂ O milliQ _____ 68 µL
Taq polimerase (5U) _____ 0,5 µL	Taq polimerase (5U) _____ 1 µL
Amostra _____ 1 µL	Amostra (1ª etapa) _____ 2 µL
Volume final _____ 50 µL	Volume final _____ 100 µL

Na primeira etapa de amplificação utilizamos os pares de iniciadores H1G777 (5'TCACCTAGAACTTTGAATGCATGGG-3') e H1P202 (5'CTAATACTGTATCATCTGCTCCTGT-3') que amplificam um fragmento de 1.1 Kb que codifica desde o aminoácido 16 da p24 até o aminoácido 33 da protease (tendo como referência o genoma do isolado ELI, “GenBank Accession number K03454” do HIV-1 do grupo M). Na segunda etapa de amplificação, os pares de iniciadores utilizados foram

H1Gag1584 (5'AAAGATGGATAATCCTGGG3') e g17 (5'TCCACATTTCCAACAGCCCTTTTT3') que geram um fragmento de 460pb do gene gag correspondente a região que codifica para o aminoácido 132 da p24 até o aminoácido 40 da p7 (tendo como referência o genoma do isolado ELI). Nas duas etapas de amplificação do fragmento de gag o seguinte programa de ciclagem foi utilizado: 94°C - 2 minutos; 35 ciclos a 94°C - 30 segundos, 50°C - 30 segundos e 72°C - 90 segundos e 72°C por 7 minutos empregando-se os termocicladores Perkin Elmer - GeneAmp PCR Systems 2400; Connecticut, USA e MJ Research – PTC-150 Minicycler version 3.0, CA, USA.

Os plasmídeos de cepas de referência, tanto para *env* quanto para *gag*, foram submetidos a apenas uma etapa de amplificação com os iniciadores da 2ª etapa. Os plasmídeos de cepas de referência foram usados na concentração de 10 ng/μL (10mM de tris HCl pH 7,4 e 0,1mM de EDTA pH 8,0). Para subtipagem genética do HIV-1 na região *env* foram utilizadas as seguintes cepas de referência: A₂, A₃, B₁, B₂, B₃, C₁, C₂, C₃, D₁, D₃, E₁, E₂, E₃, F₁, F₂, G₁, G₂, G₃, H₂, J₁ e J₂. Para subtipagem genética do HIV-1, na região *gag*, foram utilizadas as seguintes cepas de referência: A₁, A₂, A₃, A₄, B₁, B₂, B₃, B₄, C₁, C₂, C₃, C₄, C₅, D₁, D₂, D₃, D₄, D₅, E₁, E₂, E₃, F₁, F₂, F₃, G₁, G₂, G₃, H₁, H₂, H₃, I₁, I₂, I₃, J₁ e J₂.

As amostras das pacientes e as cepas de referência amplificadas foram submetidas a eletroforese em gel de agarose obedecendo aos seguintes passos:

- a. Gel de agarose (GIBCO – Life Technologies, USA) 1%: 1 g de agarose em TAE -Tris-Acetato-EDTA – (GIBCO – Life Technologies, USA) 1x qsp 100mL.
- b. Preparou-se uma suspensão com 5 μL do material da 2ª etapa de amplificação +2 μL de tampão de corrida +5 μL de água.
- c. As amostras foram aplicadas no gel de agarose em paralelo com o padrão de peso molecular (100bp DNA Ladder, GIBCO – Life Technologies, USA).
- d. Corrida eletroforética (Horizon 11 – 14 and 20 - 25 Gel Electrophoresis Apparatus, GIBCO – Life Technologies, USA) durante 1 hora a 100 V (BIO-RAD Power Pac 300, USA) com TAE + Brometo de Etídio 0,005%

Ao final da eletroforese observou-se a intensidade das bandas amplificadas, em torno de 650 pb do padrão de peso molecular, sob radiação ultravioleta a 310 nm de comprimento (FOTO/PrepI Preparative DNA Transilluminator – Fotodyne; Hartland, USA).

4.4.4 Hibridização e Análise da Mobilidade Eletroforética dos Híbridos

Para subtipagem genética do HIV-1 nas regiões env e gag, inicialmente utilizamos para a hibridização as cepas de referência: B1, B2, B3, C1, C2, D1, D3, F1 e F2 (meio painel), que representam os subtipos mais prevalentes no Brasil. Caso não fosse possível definir o subtipo do HIV-1, utilizamos todas as cepas de referência (painel completo) mencionadas anteriormente no item d.3.

Para cada meio painel (cepas de referência / amostra desconhecida) preparamos uma mistura contendo:

- a) 5 µL do produto de 2^o etapa do PCR
 - b) 5 µL da cepa de referência amplificada
 - c) 1,1 µL do tampão de anelamento 10x concentrado (NaCl 1 M, Tris-HCl 100 mM pH 7,8, EDTA 20 mM)
- Para verificar a diversidade genética da amostra desconhecida, foi preparada uma mistura na qual colocamos apenas a amostra e água milliQ.
 - Os híbridos (cepas de referência/amostra desconhecida) foram formados pela desnaturação a 94°C por 2 minutos e resfriamento imediato em banho de gelo por 10 minutos.
 - 3 µL do tampão de corrida foram acrescentados a cada mistura de híbridos e então aplicados no gel de poliacrilamida.

4.4.4.1 Preparação do gel de poliacrilamida

** Eletroforese para análise da mobilidade dos heteroduplex (região env)*

a) Solução estoque de acrilamida/bisacrilamida:

30% Acrilamida e 0,8% Bisacrilamida

b) Preparação de gel com volume de 50 mL

a) Solução acrilamida/bisacrilamida 30% _____ 8,3 mL

b) TBE 10x concentrado _____ 5 mL

c) Água ultra pura _____ qsp 50 mL

- d) Persulfato de amônia _____ 50 mg
e) TEMED _____ 33 µL

Colocou-se a poliacrilamida na placa com espessadores de 1 mm e um pente de 20 dentes e aguardou-se até a polimerização por aproximadamente 1 hora.

** Eletroforese para análise da mobilidade de heteroduplex (região gag)*

A preparação do gel de poliacrilamida para subtipagem genética do HIV-1 região gag, incluiu além dos reagentes mencionados, 10 g (20%) de uréia.

4.4.4.2 Identificação dos Híbridos

Após 3 horas de eletroforese (V16-2 Vertical Gel Apparatus, GIBCO – Life Technologies, USA) com o tampão de corrida TBE (Tris-Borato-EDTA) a 250V (Power Pac 300, BIO-RAD Laboratories, Inc., USA) os géis foram corados com brometo de etídio 0,005% por vinte minutos. A mobilidade eletroforética do heteroduplex de DNA (DNA da amostra desconhecida e cepas de referência conhecida) foi visualizada sob luz ultravioleta de comprimento de onda igual a 310 nm (FOTO/PrepI Preparative DNA Transilluminator – Fotodyne; Hartland, USA) e fotografada com Câmera Digital (DC290 Zoom KODAK Digital Câmera, Rochester, NY, USA). As imagens foram analisadas através do programa –1D Image Analyses Software Windows Limited Edition, version 3.5, NY, USA e arquivadas no computador do Laboratório de Imunologia da Aids do IPTSP.

O subtipo do HIV-1 foi determinado como o heteroduplex de maior mobilidade eletroforética, indicando maior homologia entre a cepa desconhecida e a cepa de referência conhecida.

No caso da subtipagem do HIV-1 na região de gag, como esta é uma região mais conservada do que a região env, apresentando grande semelhança entre os subtipos B e D, em alguns casos observamos o mesmo padrão de migração de heteroduplex com a referência B e D. Nestes casos, repetimos a etapa de hibridização e a eletroforese em gel de poliacrilamida foi realizada em presença de maior concentração de uréia, ao invés de 20%, usamos 30%, conforme recomendações do protocolo: “HIV-1 group M gag Heteroduplexes Mobility Analysis-HMA Subtyping KIT”. A concentração aumentada de uréia permite a distinção entre

subtipos que são filogeneticamente muito próximos, permitindo maior mobilidade de migração ao heteroduplex de maior homologia.

4.5 Análise estatística

Análises descritivas de frequência, medianas, médias e desvios padrões para as variáveis numéricas foram realizadas utilizando o programa EPI Info™ versão 3.5.1 (CDC/WHO 2008). Análise univariada foi aplicada para verificar a associação entre a TMI do HIV-1 e os fatores de risco e a associação entre as oportunidades perdidas para prevenir a TMI e fatores epidemiológicos. Teste Exato de Fisher, Kruskal Wallis ou o teste de Mann Whitney (95% CI) foram calculados (valor de $p < 0,05$).

Os critérios CDC foram aplicados para a classificação clínica das mães infectadas pelo HIV-1: estágio A como assintomáticas/HIV positivo e estágio B como sintomática/aids. Para realização da análise da viremia, para carga viral abaixo do limite de detecção do teste (<400 cópias/mL) foi atribuído o valor de 399 cópias/mL. Oportunidades perdidas para prevenção foram definidos como aqueles casos em que a prevenção da transmissão vertical do HIV-1 poderia ter sido possível se as diferentes abordagens fossem seguidas, tais como a aplicação de profilaxia ou tratamento ARV, não aleitamento materno e parto cesáreo.

5. ARTIGO 1: SEROREVERSION IN CHILDREN BORN TO HIV POSITIVE AND AIDS MOTHERS FROM CENTRAL WEST BRAZIL

Keila C Alcântara ^a

Gisner AS Pereira ^a

Maly Albuquerque ^b

Mariane MA Stefani ^{a*}

INSTITUTIONAL AFFILIATIONS :

^a Tropical Pathology and Public Health Institute, Federal University of Goiás, Rua Delenda Rezende de Melo, s/n, Setor Universitário, 74.650- 050. Goiania, Goiás, Brazil.

^b Faculty of Medicine Federal University of Goiás and Anuar Auad Hospital/ HDT/SUS/ Goiania- Goiás/ Brazil.

* Corresponding Author:

Mariane Martins de Araújo Stefani

Phone: 55 62 3209 6111

Fax: 55 62 3521 1839

Email: mstefani@iptsp.ufg.br

Running Title: Child outcomes between HIV and AIDS mothers

Abstract

The spread of HIV-1 infection among women of childbearing age has led to increasing numbers of children at risk of vertical transmission. This study aimed to assess child outcomes among HIV positive (n=19) and AIDS mothers (n=22) from Central West Brazil. CD4⁺ T cell counts (FACScount, BD), viral loads (HIV-1 RT-PCR, Amplicor HIV-1 Monitor Roche) were assessed at delivery and during the first 6 months of life. Heteroduplex Mobility Assay identified *env* and *gag* HIV-1 subtypes. Frequencies and medians were calculated. HIV positive and AIDS mothers did not differ with regard to age, antiretroviral prophylaxis, parity and viral load. AIDS mothers had lower CD4⁺T cell counts. One vertical transmission and a neonatal death were observed. Gestational age, gender, oral AZT prophylaxis were similar regardless of maternal clinical status. Infants born to AIDS mothers had lower birth weight and shorter time to seroreversion. Eight infants were lost to follow up, two were breastfed due to delayed maternal diagnosis. HIV-1 B^{env}/B^{gag} subtype was 75.6%, discordant B^{env}/F^{gag} was 12.2%. Exposed uninfected infants born to AIDS mothers with lower CD4⁺T cell counts, seroreverted earlier than infants born to asymptomatic HIV positive mothers. It's possible that maternal immunological status may impact the time to seroreversion.

Key words: mother-to-child-transmission, seroreversion, breastfeeding HIV-1 subtypes.

Introduction

Worldwide, the proportion of women infected with human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) has grown over the years reaching almost half of the 40 million persons affected. Due to the “feminization” of AIDS, crescent numbers of children have been at risk of perinatal-mother-to-child-transmission (PMTCT) (UNAIDS Update 2004). Since early 90’s increasing numbers of young Brazilian women have been infected with HIV-1 and PMTCT accounts for around 80% of the 13 171 notified pediatric AIDS cases (Epidemiological Bulletin, 2006). The Brazilian AIDS epidemic is stable in the epicenter southeast but is expanding throughout the vast country, especially in the Central West and North regions. HIV-1 subtypes B, F, C and BF recombinant forms co-circulate in the southeast and south regions (Bongertz et al., 2000; Brindeiro et al., 2003; de Sa Filho et al., 2006). However there is scarce information about HIV-1 subtypes circulating in more remote Brazilian areas and among more vulnerable groups such as childbearing age women (Stefani et al., 2000; Stefani et al., 2007).

A landmark Pediatric AIDS Clinical Trials Group Study (PACTG076) demonstrated that in non-breastfeeding infants, the administration of three-part zidovudine (AZT) greatly reduced vertical transmission (Connor et al., 1994). Currently, highly active antiretroviral therapy (HAART) increased pregnancy rates among HIV-1 infected women at the same time that it has reduced vertical transmission (Suksomboon et al., 2007). Sensitive and specific molecular tests for HIV-1 detection have been available for the early diagnosis of vertical transmission (Young et al., 2000). The impacts of breastfeeding on postnatal transmission and of antiretroviral therapy in low birth weight and preterm birth have been investigated (Coovadia et al., 2007; Schulte et al., 2007).

The purpose of this study was to assess child outcomes among HIV positive and AIDS mothers. HIV-1 subtypes identified by Heteroduplex Mobility Assays in the *env* and *gag* regions were also identified.

METHODS

STUDY AREA AND POPULATION:

From April 2000 - August 2001, 64 HIV-1 infected pregnant women were attended at the main regional reference centers: “Materno Infantil” and “Hospital Anuar Auad” in Goiânia city (around 1.2 million inhabitants), capital of Goiás State (5 million inhabitants, approximately 8500 notified AIDS cases), Central West Brazil (Epidemiological Bulletin, 2006). Patients who lived far away and feared disclosure of results refused to participate. Forty-four women signed informed consents and were re-tested (Abbot HIV-1/HIV-2 3rd generation Plus EIA, Germany). Three rapid test positives at delivery (Determine, Abbot Laboratories, Tokyo, Japan) were ELISA negative and were excluded. Therefore, the study group of 41 pairs of HIV-1 infected mothers and infants reflects the availability of eligible participants during the study period. To avoid bias, a single collaborator (Alcantara KC) was trained to apply standardized forms to collect demographic, clinical and laboratory data retrieved by systematic reviews of medical files up to May 2007.

At the time of this study, all HIV infected pregnant women were offered the following PMTCT interventions by the public health: AZT prophylaxis for HIV positive and combined antiretroviral therapy (ARV) or HAART for AIDS cases, elective cesarean section, oral AZT and replacement feeding to neonates. Receipt of AZT PACTG076 regimen was classified as partial (during labor-postpartum) or complete (during pregnancy, independently of duration, intrapartum and postpartum to neonates). Mode of delivery was vaginal, elective cesarean section or emergency cesarean after labor with or without ruptured membranes. Low

birth weight was defined as < 2500 g and preterm birth occurring at < 37 weeks' gestational age.

LABORATORY TESTS

Maternal blood samples collected at delivery and newborn's samples collected at birth and throughout the first six months were employed to assess: CD4⁺T cell counts (FACSCount, Becton & Dickinson, San Jose, CA, USA); plasma viremia by Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) for HIV-1 (Amplicor HIV-1 Monitor test, version 1.5 – Roche Diagnostics System, Branchburg, NJ, USA). Anti HIV-1 serological status of exposed children was assessed throughout the first 24 months by ELISA - Murex 1.2.0 / Murex 1.0.2 (Abbot, Dartford, UK).

HIV-1 *env* and *gag* subtyping was determined by heteroduplex mobility assay (HMA) (Delwart et al. 1993; Heyndrickx et al. 2000). Briefly, envelope (*env*) and *gag* genes were amplified by nested PCR using the following pairs of primers: ED5/ED12- ES7/ES8 for the *env* gene; H1P202/H1G777- H1Gag1584/g17 for the *gag* gene. HMA HIV-1 *env* subtyping kit, protocol version 5 and HIV-1 *gag* HMA subtyping kit, protocol version 3, provided by the NIH/AIDS Reagent Program were employed.

STATISCAL ANALYSIS:

Mothers were stratified into HIV positive or AIDS, frequencies and descriptive statistics including medians were calculated for the main variables. Exploratory data analysis with box-plot figures and 25th-75th interquartile range (IQR) was applied to maternal viral loads and CD4⁺T cell counts. For viral loads < 400 copies/ml, an arbitrary value of 399 copies/ml was adopted. Seroreversion data was stratified according to age. Data analysis was performed using SPSS/PC version 14.0 (SPSS Inc. Headquarters, Chicago, Illinois, USA).

RESULTS:

CHARACTERISTICS OF HIV+/AIDS INFECTED MOTHERS AND INFANTS:

The study group consisted of 22 pairs of HIV-1 positive mothers-infants and 19 pairs of AIDS mothers-infants (Table I). HIV positive and AIDS mothers were similar in terms of age, duration of ARV prophylaxis, parity. Gestational age, sex distribution, breastfeeding and oral AZT prophylaxis were similar for infants born to HIV positive and to AIDS mothers, but the latter presented lower birth weights. Heterosexual transmission predominated: 35% of the male sexual partners were intravenous drug users (IDU) and 40% were infected with HIV-1. Most women were diagnosed during prenatal care however, two were notified after delivery. Complete or partial PACTG076 protocol, cesarean sections and prophylactic oral AZT were provided to most participants. Three-fourths of HIV-1 infected mothers had less than 8 years of formal education.

Figures 1A and 1B present box plot distributions of maternal viral loads and CD4⁺T cell counts at delivery. Among HIV positive and AIDS mothers the medians of viremia were 1043 (400-694 542 copies/ml range, IQR= 45 719) and 1472 copies/ml (400-229592 copies/ml range, IQR=7282) respectively (Figure 1A). The median CD4⁺ T cell counts for HIV-1 positive mothers was 484 cells/ul (225-1640 cells/ml range, IQR=256) and 245 cells/ml (107-767 cells/ml range, IQR= 322) for AIDS mothers (Figure 1B).

MOLECULAR AND SEROLOGICAL DATA FROM EXPOSED INFANTS

One vertical transmission case, HIV-1 RT-PCR negative at birth, reached 572 032 copies/ml at 2 months (Table II). Viremia at 5 months was $\geq 750\ 000$ copies/ml when the infant had pneumonia and Nevirapine and Sulfametoxazol-Trimetroprim were prescribed. The asymptomatic transmitting mother was diagnosed 3 days before the delivery, received intravenous AZT during the 24 hours of ruptured membranes and had emergency cesarean. One female infant died at 4 days due to respiratory insufficiency and was born to an AIDS mother who also had toxoplasmosis.

In the cohort of exposed infants, eight were lost to follow up (Table II), around one third seroreverted up to 12 months and the rest seroreverted from 13-24 months (Table III). Six out of ten infants who seroreverted during the first year of life were born to AIDS mothers (Table II). Most infants who seroreverted after 12 months were born to HIV positive asymptomatic mothers (Table III). The median time to seroreversion among infants born to HIV positive and AIDS mothers was 16 months (11-24 months range) and 13 months (9-16 months range) respectively.

Among maternal HIV-1 isolates, 75.6% were B^{env}/B^{gag} and 12.24% were discordant B^{env}/F^{gag} subtypes. HIV-1 B^{env}/B^{gag} was identified in the pair of mother- child infected perinatally.

DISCUSSION

The risk for mother to child HIV-1 transmission depends on maternal and infant factors, but maternal viremia alone is considered the strongest independent predictor (Blackart et al., 2001; Kamara et al, 2005). In this study highly viremic mothers did not transmit HIV. The long time of ruptured membranes and the viral load at delivery may have contributed to one vertical transmission. The newborn infected vertically had undetectable viremia at birth and high values at 2 months of life, suggesting intrapartum transmission (Fawzi et al., 2001).

Breastfeeding is one of the most cost-effective interventions for child survival in developing countries. However, in areas of high HIV-1 prevalence it can increase the risk of transmission (reviewed by Newell, 2006). Our cohort of infants born to HIV infected mothers was mostly non-breastfed, except for two newborns due to delayed disclosure of maternal diagnosis. A recent prospective study demonstrated that exclusive breastfeeding was associated with lower risk of transmission compared to mixed feeding consisting of breastfeeding and other food or liquids (Coovadia et al., 2007). Moreover, mortality for

replacement fed infants was more than double of those who were exclusively breastfed. The impact of breastfeeding on PMTCT was out of the scope of this study.

Age, anemia, low maternal weight, illicit drug use, sexually transmitted diseases, HIV infection and protease inhibitor contribute to low birth weight (Goldstein et al., 2000; Thorne et al., 2004). A large study with Latin American and Caribbean HIV infected women showed no association between protease inhibitor use during pregnancy, preterm birth and low birth weight (Szyld et al., 2006). Preterm birth and low birth weight were not observed among our infants born to mothers using protease inhibitor. Recently a large study among US infants born to HIV infected women showed declines in low birth weight and preterm birth from 1989-2004, a period of increased maternal antiretroviral use (Schulte et al., 2007).

In countries with high HIV-1 prevalence, postpartum care represents a crucial link to monitor the effectiveness of perinatal prevention programs. In our study eight infants, five of them born to AIDS mothers, were lost to follow up. Orphanage and advanced maternal disease may compromise neonate's follow up. An active search by the public health surveillance program could not retrace these mother-infant pairs lost to follow up, mainly due to incorrect address. In some African countries, challenges for postpartum health services, especially for HIV infected mothers, are influenced by misconceptions about the importance of postpartum care services, distance to health facilities, poverty and health system constraints (Lagro et al., 2006; Nabuekera et al., 2006).

Among infected mothers, HIV-1 B^{env}/B^{gag} predominated and was followed by discordant B^{env}/F^{gag} subtypes, both findings compatible with prior reports from Central Brazil (Stefani et al., 2000; Pereira et al., 2004; Pereira et al., 2006; Stefani et al., 2007). The impact of different HIV-1 subtypes in vertical transmission is controversial (Blackart et al., 2001,

Murray et al., 2000) and our results may not be generalized, as previous data indicate higher HIV-1 diversity among women (Long et al., 2000).

Seroreversion in HIV infection has been documented in non-infected babies of seropositive mothers (Bakshi et al., 1995; Lepage et al., 1992), in late stage AIDS patients and in neonates early treated with HAART (Gutierrez et al., 1994; Hainaut et al., 2005). In our study, a group of infants seroreverted during the first 12 months and another group became seronegative up to 24 months of life. Infants born to AIDS mothers seroreverted earlier. The earliest seroreversion at 9 months was observed in a preterm, low birth weight infant born to a severely immunosuppressed, highly viremic, untreated AIDS mother. On the other hand, most infants that seroreverted around 24 months were born to asymptomatic HIV positive mothers.

We are aware that our small sample size, further reduced by the loss to follow up, decreases the power to conclude about predictors of seroreversion. However, as in exposed uninfected infants HIV-1 seropositivity reflects maternal antibodies, it's possible that the mothers' immunological status characterized by immunosuppression for AIDS cases or robust immune response in HIV positives, may impact the time to seroreversion. It would be interesting to investigate whether reduced antigenic stimuli due to HAART in AIDS mothers has any role in time to seroreversion in exposed uninfected infants. The identification of maternal and infants' predictors of seroreversion remains an important area of investigation in PMTCT, which deserves further larger studies.

Conclusion: In our study, exposed uninfected infants born to AIDS mothers, who had lower CD4⁺T cell counts, seroreverted earlier than infants born to asymptomatic HIV positive mothers. It's possible that the maternal immunological status may impact the time to seroreversion in exposed uninfected infants.

ACKNOWLEDGEMENTS: The following reagents were obtained through the AIDS Research and Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH: Heteroduplex Mobility Analysis HIV-1 *env* Subtyping Kit from Dr. James Mullins and *gag* Subtyping Kit from Dr. Guido van der Groen, Leo Heyndrickx, and Gert van der Auwera.

AUTHORS CONTRIBUTIONS:

KCA and GASP were in charge of patient enrollment and performance of laboratory tests - CD4 cell counts, viral loads and HIV-1 subtyping; MA carried out clinical assessment; MMAS designed study protocol, analysis and interpretation of this data and drafted the manuscript. All authors contributed, read and approved the final manuscript.

FUNDING:

This study was sponsored by: CNPq (Brazilian Research Council) grants # 400183/99 and 474174/03-4; The Brazilian Ministry of Health DST/ AIDS Program grant # 166/03; CONCITEG (Conselho de Ciencia e Tecnologia do Estado de Goias) grant # 243; FUNAPE (Fundacao de Amparo a Pesquisa do Estado de Goias) grant # 69031 and CAPES (Coordenacao de Apoio a Ensino e Pesquisa). GAS Pereira and KC Alcantara were personally supported by grants from CNPq and CAPES respectively.

CONFLICT OF INTEREST:

None of the authors has any conflict of interest concerning the results reported in this paper.

ETHICAL APPROVAL:

The Institutional Review Board “Comite de Etica em Pesquisa Humana e Animal do Hospital das Clinicas, Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Goias” approved this study

and mother-infant pairs were enrolled in the study following the mothers' signature of Informed Consent Forms (ICFs).

GUARANTOR OF THE PAPER:

Mariane M A Stefani accepts full responsibility for the conduct of the study, managed the databank and made the decision to publish.

REFERENCES

- Bakshi S.S., Tetali S., Abrams E.J., Paul M.O., Pahwa S.G., 1995. Repeatedly positive human immunodeficiency virus type 1 DNA polymerase chain reaction in human immunodeficiency virus-exposed seroreverting infants. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 14, 658-662.
- Blackard, J.T., Renjifo, B., Fawzi, W., Hertzmark, E., Msamanga, G., Mwakagile, D., Hunter, D., Spiegelman, D., Sharghi, N., Kagoma, C., Essex, M., 2001. HIV-1 LTR subtype and perinatal transmission. *Virology* 287, 261-265.
- Bongertz, V., Bou-Habib, D.C., Brigido, L.F., Caseiro, M., Chequer, P.J., Couto-Fernandez, J.C., Ferreira, P.C., Galvao-Castro, B., Greco D., Guimarães, M.L., Linhares de Carvalho, M.I., Morgado, M.G., Oliveira, C.A., Osmanov, S., Ramos, C.A., Rossini, M., Sabino, E., Tanuri, A., Ueda, M., 2000. HIV-1 diversity in Brazil: genetic, biologic, and immunologic characterization of HIV-1 strains in three potential HIV vaccine evaluation sites. *Brazilian Network for HIV Isolation and Characterization. J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 23, 184-193.
- Brindeiro, R. M., Diaz, R. S., Sabino, E. C., Morgado, M. G., Pires, I. L., Brigido, L., Dantas, M. C., Barreira, D., Teixeira, P. R., Tanuri, A., and the Brazilian Network for Drug Resistance Surveillance., 2003. *Brazilian Network for HIV Drug Resistance*

- Surveillance (HIV-BResNet): a survey of chronically infected individuals. *AIDS* 17, 1063-1069.
- Connor EM, Sperling RS, Gelber R, Kiselev P, Scott G, O'Sullivan MJ, VanDyke R., Bey M. Shearer W, Jacobson R, Jimenez E, Coombs R, Elkins M, Moye J, Stratton P & Balsley J. 1994. Reduction of maternal-infant transmission of human immunodeficiency virus type 1 with zidovudine treatment. *N Engl J Med* 331, 1173-1180.
- Coovadia H.M., Rollins N.C., Bland R.M., Little K., Coutsooudis A., Bennish M.L., Newell M.L., 2007. Mother-to-child transmission of HIV-1 infection during exclusive breastfeeding in the first 6 months of life: an intervention cohort study. *Lancet* 369, 1107-1116.
- De Sa Filho D. J., Sucupira M. C., Casiero M. M., Sabino E .C., Diaz R. S., Janini L. M., 2006. Identification of two HIV type 1 circulating recombinant forms in Brazil. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 22, 1-13.
- Delwart, E.L., Shpaer, E.G., Louwagie, J., McCutchan, F.E., Grez, M., Rubsamen-Waigmann, H., Mullins, J.I., 1993. Genetic relationships determined by a DNA heteroduplex mobility assay: analysis of HIV-1 *env* genes. *Science* 262, 1257-1261.
- Epidemiological Bulletin, 2006. Boletim Epidemiologico AIDS/DST - Janeiro a Junho de 2006. Publication by the Brazilian Ministry of Health.
- Fawzi W., Msamanga G., Renjifo B., Spiegelman D., Urassa E., Hashemi L., Antelman G., Essex M., Hunter D., 2001. Predictors of intrauterine and intrapartum transmission of HIV-1 among Tanzanian Women. *AIDS* 15, 1157-1165.
- Goldstein P.J., Smit R., Stevens M., Sever J.L., 2000. Association between HIV in pregnancy and antiretroviral therapy, including protease inhibitors and low birth weight infants. *Infect Dis Obstet Gynecol* 8, 94-98.

- Gutierrez M., Soriano V., Bravo R., Vallejo A., Gonzalez-Lahoz J., 1994. Seroreversion in patients with end-stage HIV infection. *Vox Sang.* 67, 238-239.
- Hainaut M., Peltier C.A., Goetghebuer T., Van der Linden D., Marissens D., Zisis G., Levy J., 2005. Seroreversion in children infected with HIV type 1 who are treated in the first months of life is not a rare event. *Clin. Infect. Dis.* 41,1820-1821.
- Heyndrickx, L., Janssens, W., Zekeng, L., Musonda, R., Anagonou, S., Auwera, G. Van der, Coppens, S., Vereecken, K., Witte, K.D., Rampelbergh, R.V., Kahindo, M., Morison, L., McCutchan, F.E., Carr, J.K., Albert, J., Essex, M., Goudsmit, J., Asjö, B., Salminen, M., Buvé, A., Study Group on Heterogeneity of HIV Epidemics in African Cities, Groen, G. van der., 2000. Simplified strategy for detection of recombinant human immunodeficiency virus type 1 group M isolates by *gag/env* heteroduplex mobility assay. Study Group on Heterogeneity of HIV Epidemics in African Cities. *J. Virol.* 74, 363-370.
- Kamara, P., Melendez-Guerrero, L., Arroyo, M., Weiss, H., Jolly, P., 2005. Maternal plasma viral load and neutralizing/enhancing antibodies in vertical transmission of HIV: a non-randomized prospective study. *Virol. J.* 24, 2-15.
- Lagro M., Liche A., Mumba T., Ntebeka R., van Roosmalen J., 2006. Postpartum care attendance at a rural district hospital in Zambia. *Trop. Doct.* 36, 205-208.
- Lepage P., Van de Perre P., Simonon A., Msellati P., Hitimana D.G., Dabis F., 1992. Transient seroreversion in children born to human immunodeficiency virus 1-infected mothers. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 11, 892-894.
- Long E.M., Martin H.L., Kreiss J.K., Rainwater S.M., Lavreys L., Jackson D.J., Rakwar J., Mandaliya K., Overbaugh J., 2000. Gender differences in HIV-1 diversity at time of infection. *Nat. Med.* 6, 23-25.

- Murray M. C., Embree J.E., Ramdahin S.G., Anzala A.O., Njenga S., Plummer F.A., 2000. Effect of human immunodeficiency virus (HIV) type 1 viral genotype on mother-to-child transmission of HIV-1. *J. Infect. Dis.* 181, 746-749.
- Nabukera S.K., Witte K., Muchunguzi C., Bajunirwe F., Batwala V.K., Mulogo E.M., Farr C., Barry S., Salihu H.M., 2006. Use of postpartum health services in rural Uganda: knowledge, attitudes, and barriers. *J. Community Health.* 31, 84-93.
- Newell, M.L., 2006. Current issues in the prevention of mother to child transmission of HIV-1 infection. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 100, 1-5.
- Pereira, G.A., Stefani, M.M.A., Araujo Filho, J.A., Souza, L.C., Stefani, G.P., Martelli, C.M., 2004. Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and *Mycobacterium leprae* co-infection: HIV-1 subtypes and clinical, immunologic, and histopathologic profiles in a Brazilian cohort. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 71, 679-684.
- Pereira, G.A., Stefani, M.M.A., Martelli, C.M., Turchi, M.D., Siqueira, E.M., Carneiro, M.A., Martins, R.M., 2006. Human immunodeficiency virus type 1 and hepatitis C virus co-infection and viral subtypes at an HIV testing center in Brazil. *J. Med. Virol.* 78, 719-723.
- Schulte J., Dominguez K., Sukalac T., Bohannon B., Fowler M.G.; Pediatric Spectrum of HIV Disease Consortium, 2007. Declines in low birth weight and preterm birth among infants who were born to HIV-infected women during an era of increased use of maternal antiretroviral drugs: Pediatric Spectrum of HIV Disease, 1989-2004. *Pediatrics.* 119, 900-906.
- Stefani, M.M., Pereira, G.A., Martelli, C.M., Shindo, N., Galvao-Castro, B., 2000. Evidence of HIV-1 genetic diversity among pregnant women with AIDS or infected with HIV-1 in Central Brazil. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 23, 205-207.

- Stefani, M.M., Pereira G.A., Lins, J.A.B., Alcântara K.C., Silveira, A.A., Viegas, A.A., May, N.C., Mussi, A. H., 2007. Molecular screening shows extensive HIV-1 genetic diversity in Central West Brazil. *J. Clin. Virol.* 39, 205-209.
- Suksomboon N., Poolsup N., Ket-Aim S., 2007. Systematic review of the efficacy of antiretroviral therapies for reducing the risk of mother-to-child transmission of HIV infection. *J Clin Pharm Ther.* 32, 293-311.
- Szyld E.G., Warley E.M., Freimanis L., Gonin R., Cahn P.E., Calvet G.A., Duarte G., Melo V.H., Read J.S., NISDI Perinatal Study Group. 2007. Maternal antiretroviral drugs during pregnancy and infant low birth weight and preterm birth. *AIDS* 20, 2345-2353.
- Thorne C., Patel D., Newell M.L., 2004. Increased risk of adverse pregnancy outcomes in HIV-infected women treated with highly active antiretroviral therapy in Europe. *AIDS* 18, 2337-2339.
- UNAIDS/WHO – AIDS epidemic update December 2004. World Health Organization.
- Young, N.L., Shaffer, N., Chaowanachan, T., Chotpitayasunondh, T., Vonparapar, N., Mock, P.A., Waranawat, N., Chokephaibulkit, K., Chuachoowong, R., Wasinrapee, P., Mastro, T.D., Simonds, R.J., 2000. Early diagnosis of HIV-1-infected infants in Thailand using RNA and DNA PCR assays sensitive to non B subtypes. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 24, 401-407.

Table I: Summary of main characteristics of HIV infected mothers and exposed infants from Central Brazil (n=41).

Mothers	HIV	AIDS	Total
	(n=22)	(n=19)	%
Age (years) median	23.5	26	-
(range)	(15-44)	(16-35)	
Exposure category			
heterosexual	22	15	90
parenteral	-	4	10
IDU	-	3	7
transfusion	-	1	3
HIV diagnosis			
during pregnancy	18	12	73
before pregnancy	4	7	27
ARV during pregnancy	16	15	75
AZT monotherapy	3	2	12
AZT + other ARV	7	9	39
no ARV	6	4	24
Prophylaxis duration (weeks) median	14	10	-
(range)	(2-30)	(1-38)	
ARV at labor delivery	21	17	93
Parity			
Multiparous	16	12	66
(range)	(2-7)	(2-5)	
Gestational age (weeks) median	39	38	-
(range)	(34-41)	(30-40)	
Females	11	11	54
Weight (g) median	3220	2740	-
(range)	(2395 – 3660)	(1530-3905)	
Oral AZT	20	19	95
Breastfeeding (days)	2	-	-
(range)	(4-11)		
Seroreversion	18	13	-
median (months) (range)	16 (11-24)	13 (9-16)	

IDU- intravenous drug user; ARV- antiretroviral.

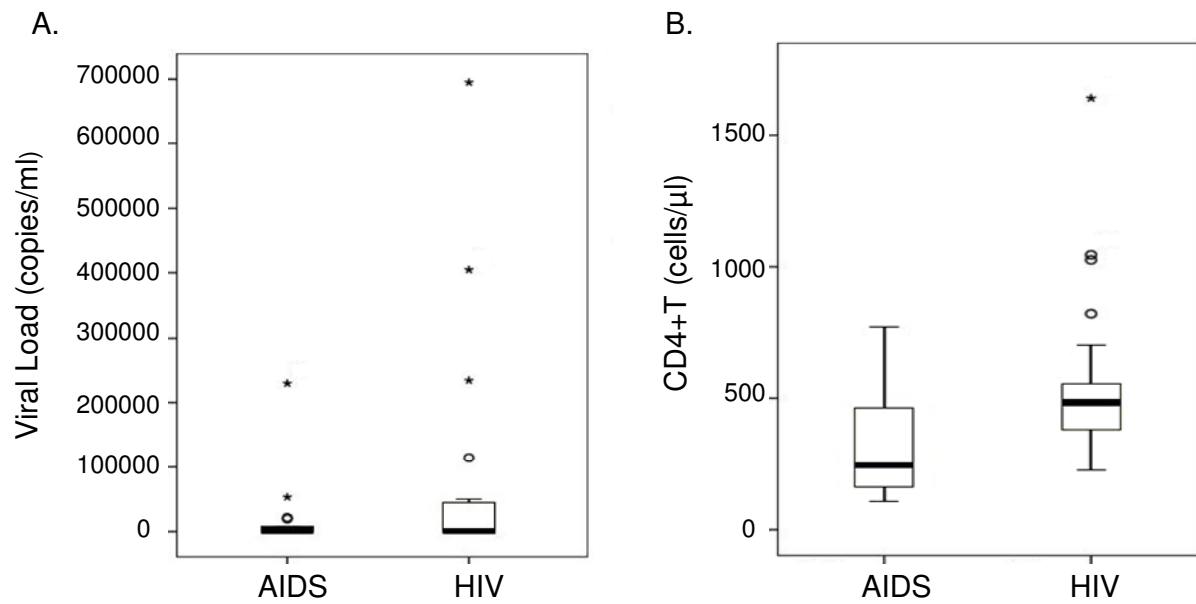


Figure 1: Box plot distributions of maternal viral loads (A) and CD4⁺ T cell counts (B) at delivery stratified by clinical status: HIV positive and AIDS cases. The top and the bottom of the box are the 25th and 75th percentiles; thus the length of the box is the interquartile range (IQR). The line through the middle of the box is the median. The upper bar is the largest observation: $\leq 75^{\text{th}}$ percentile plus 1.5x IQR. The lower bar is the smallest observation: $\geq 25^{\text{th}}$ percentile minus 1.5x IQR. Circles are outlier values and asterisks represent extreme values.

Table II: Main characteristics from pairs of HIV positive or AIDS mothers and infants: who seroreverted up to 12 months (n=10), lost to follow up (n=8), neonatal death (n=1) and vertical transmission (n=1).

Mothers				Children				
Age	Clinical status	CD4 cells/ μ l	VL copies/ml	Sex	GA (weeks)	Weight (g)	CD4 cells/ μ l median	SR months
18*	AIDS	114	229 592	M	36	2230	2395	9
20**	HIV	542	694 942	F	39	3480	2320	12
22	AIDS	365	7682	M	38	2740	1715	12
22	HIV	1640	<400	M	37	3130	2820	12
23#	HIV	429	< 400	M	39	3225	3335	12
24	HIV	701	< 400	F	39	3040	2233	11
26*	AIDS	685	< 400	F	37	2450	1325	12
31#	AIDS	249	<400	F	38	3670	1460	12
33	AIDS	558	< 400	F	38	2530	1295	12
35	AIDS	156	<400	M	39	3905	2385	12
16	AIDS	767	<400	M	38	3240	2785	na
17	HIV	360	<400	M	37	3340	1890	na
19	AIDS	449	<400	F	40	3000	2840	na
21	AIDS	478	1472	M	38	2785	1322	na
21	AIDS	136	7285	F	37	2580	2220	na
24	HIV	1026	<400	M	38	2810	1702	na
25	HIV	451	1643	F	38	3660	2660	na
25	AIDS	245	1303	M	37	3415	3080	na
27#	AIDS	114	2428	F	38	2350	-	death
44	HIV	432	37 767	F	39	2640	2395	vt

GA- Gestational Age; SR- Seroreversion; VL- Viral Load; * -vaginal delivery; **- vaginal delivery and breastfed; # -mother treated with protease inhibitor; na- not available due to loss to follow up; vt- vertical transmission.

Table III: Main characteristics from pairs of HIV positive or AIDS mothers and infants who seroreverted between 13-24 months of life (n=21).

Mothers				Children				
Age	Clinical status	CD4 cells/ μ l	VL copies/ml	Sex	GA (weeks)	Weight (g)	CD4 cells/ μ l median	SR (months)
15	HIV	364	< 400	F	37	2395	2245	24
18	HIV	819	444	M	40	3425	2665	17
20**	HIV	1045	50 464	F	na	3050	2337	24
21	HIV	380	4435	F	39	3215	1625	13
22	HIV	540	234 210	F	37	3245	1625	14
22	HIV	530	< 400	M	39	3095	1095	13
23	HIV	225	404 444	M	34	2440	767	19
24	HIV	na	44 671	M	41	3440	2255	17
24	AIDS	213	< 400	M	38	3160	2330	16
24	HIV	257	6468	M	39	3305	2090	18
24	HIV	433	< 400	M	39	3270	2220	17
25*	AIDS	194	21 564	F	35	2230	2770	15
26	HIV	494	176	F	40	3550	2125	15
26	AIDS	490	< 400	F	30	1530	1675	15
27	AIDS	184	19 629	F	39	2965	1510	15
27#	AIDS	107	53 212	F	40	3090	2770	15
27	HIV	484	11 807	F	40	2595	2240	13
27	HIV	354	114 777	F	38	3275	1635	18
27	HIV	555	< 400	M	38	3100	950	23
29	AIDS	169	2503	F	39	2600	3815	13
34	AIDS	434	1553	M	37	2045	2135	14

GA- Gestational Age; SR- Seroreversion; VL- Viral Load; * -vaginal delivery; **- vaginal delivery and breastfed; # -mother treated with protease inhibitor; na- not available.

6. MANUSCRITO 2: HIV-1 MOTHER-TO-CHILD TRANSMISSION AND DRUG RESISTANCE AMONG PREGNANT WOMEN WITH HIGH ACCESS TO DIAGNOSIS AND PROPHYLACTIC MEASURES

KEILA CORREIA DE ALCÂNTARA¹; JANAÍNA BACELAR ACCIOLI LINS²; MALY DE ALBUQUERQUE²; LETÍCIA MARA AIRES²; LUDIMILA PAULA VAZ CARDOSO¹; ANA LÚCIA MINUZZI³; MARIANE MARTINS DE ARAÚJO STEFANI^{1,†}

Affiliation:

1. Tropical Pathology and Public Health Institute/ Federal University of Goias, Brazil.
2. Anuar Auad Hospital, HAA/HDT/SUS
3. Institute of Diagnoses and Prevention –IDP/APAE

Keywords: HIV-1; Mother-to-child transmission; Subtype; Drug resistance

Abbreviations: HIV-1, human immunodeficiency virus type 1; MTCT, mother-to-child transmission; ARV, antiretroviral; PPPW, Program for the Protection of Pregnant Women; HAART, highly active antiretroviral therapy; NRTI, nucleoside reverse-transcriptase inhibitors; NNRTI, nonnucleoside reverse-transcriptase inhibitor; protease inhibitor; PR, protease; RT, reverse transcriptase; cDNA, complementary DNA; CPR, Calibrated Population Resistance; IAS-USA, International AIDS Society-USA; CI, confidence Interval; AZT, zidovudine; MDR, multidrugresistant. * Corresponding author. Tel.: +55 62 3209 61 11; fax: +55 62 3209 63 63. *E-mail address:* mariane.stefani@pq.cnpq.br (M.M.A. Stefani).

Abstract

Background: In central western Brazil/Goias State a high-coverage public health prenatal program (70.000 women/year) represents a unique opportunity for diagnosing young women and implementing preventive strategies to HIV-1 mother-to-child transmission (MTCT).

Objectives: To investigate MTCT among a cohort of HIV-1 infected mothers/exposed infants from this setting.

Methods: 142 mothers/their 149 infants (2008-2010) were analyzed according to maternal viral loads, CD4⁺ cell counts, HIV-1 *pol* sequences; infants' HIV-1 RNA tests (30, 120 days), sequential anti-HIV-1/2 serology. HIV-1 subtypes were assigned by REGA; transmitted drug resistance was identified by the Calibrated Population Resistance tool, secondary resistance by Stanford HIV-1 Drug Resistance/International AIDS Society databases.

Results: Mothers (median age=27 years; 25/142 adolescents) were diagnosed during prenatal care (2008-2010) or previously (1994-2007). Recent cases were younger, mostly asymptomatic; undetectable viremia and MTCT prophylaxis predominated in formerly diagnosed. Recent cases had higher subtype C prevalence. One naive patient had transmitted resistance; ten ARV-experienced patients had secondary resistance: 6 from MTCT prophylaxis, 4 under HAART. Among HIV-1 MTCT cases (3/149;2.01%), late disclosure of diagnosis, vaginal delivery, breastfeeding, lack of oral AZT were observed; 2 of 3 infants harbored subtype C; drug resistance mutations were not detected; 2 of 3 transmitting-mothers had viremia <1000copies/ml. In exposed-uninfected infants the median time to seroreversion was 12 months.

Conclusions: In this study delayed disclosure of diagnosis, partial/no preventive measure, drug resistance among asymptomatic women under prophylaxis and vertical transmission in low viremic mothers are of concern. The expansion and MTCT of subtype C corroborates surveillance of HIV-1 diversity in this region.

Background

HIV-1 mother-to-child-transmission (MTCT) is a multifactorial event in which high maternal viral load and low CD4⁺ cell counts, mode of delivery, use of antiretroviral (ARV) therapy and prematurity play a role.¹ Preventive strategies including prophylactic or therapeutic ARV use, cesarian section and breastfeeding proscription can reduce MTCT from 25% up to 1%.^{2,3} However ARV treatment can promote the selection and transmission of resistant mutants and compromise prevention.^{4,5}

Brazil was the first developing country to implement a countrywide public health program to prevent HIV-1 MTCT, however it still occurs.^{6,7} Routine prenatal HIV-1 screening represents a unique circumstance for early diagnosis and prevention of MTCT. Nevertheless, missing opportunities can jeopardize preventive measures.⁸

In Goiás State, central western Brazil, a special public health prenatal program (“Program for the Protection of Pregnant Women/PPPW”) implemented in 2003 screens ~70.000 pregnant women/year from ~240 municipalities. Screening includes HIV-1 infection, hepatitis B and C, Human T Lymphotropic Virus infection, syphilis, toxoplasmosis, rubella, Chagas disease and Cytomegalovirus infection. Recently a survey among 28,561 pregnant women screened by PPPW showed an HIV-1 prevalence of 0.09% (95% CI 0.06%–0.14%).⁹

Objectives

This study among pairs of HIV-1 infected mothers and exposed infants from central western Brazil describes MTCT and related factors (prophylaxis, resistance mutations). HIV-1 subtypes and seroreversion in exposed-uninfected children are also reported.

Study design

Patients

During the study period (June/2008-June/2010), 146.897 pregnant women were screened by the PPPW/Goias and 148 out of 198 cases with confirmed HIV-1 infection (~70%) were enrolled (“Institute of Diagnoses and Prevention –IDP/APAE”,Goiania, central western Brazil). In this cohort both recently and formerly diagnosed women were enrolled since screening includes all pregnant women regardless of previous HIV-1 diagnosis. Participants were enrolled at any time during pregnancy or up to 30 days postpartum. Mother-infant pairs were followed up (one year) at the main regional public hospital for HIV-1 care (Anuar Auad Hospital, HAA/HDT/SUS). Epidemiological data were collected in standardized forms by individual interviews; clinical and obstetric data were obtained from abstractions of the medical records (HAA/HDT/SUS). This research protocol was approved by the institutional review board (“Comite de Etica e Pesquisa HAAHDT/SUS”, protocol #003/2008) and all women provided informed consent for enrollment of themselves and their newborns.

Highly-active-antiretroviral-therapy (HAART) was defined as a combination of three or more ARV drugs, usually two nucleoside reverse-transcriptase inhibitors (NRTIs) combined with either a nonnucleoside reverse-transcriptase inhibitor (NNRTI) unboosted/boosted (with ritonavir) protease inhibitor (PI). The standard HAART regimen used for MTCT prophylaxis consisted of two NRTIs (ZDV/3TC – Combivir ®) and one PI (LPV/r – Kaletra ®).¹⁰

Immunological and virological profiles

CD4⁺ cell counts (FACSCalibur, Becton & Dickson, San Jose, CA, USA) and HIV-1 RNA tests (Amplicor HIV-1 Monitor test, version 1.5; Roche, USA) were performed in maternal blood (last trimester pregnancy-30 days postpartum) and in infants (30, 120 days of life). Definition of MTCT diagnosis: two positive HIV-1 RNA tests in different samples after 30 days of life. Exclusion of MTCT: two negative HIV-1 RNA tests at 30/120 days of life. Exposed-uninfected newborns were followed by anti-HIV-1/2 IgG ELISA (Wiener Laboratories, Argentina) each 3-4 months throughout the first 12 months or until seroreversion.

HIV-1 subtypes and resistance analysis in *pol* gene

Plasma RNA (mothers/infected children) was extracted, retrotranscribed into complementary DNA (cDNA) and the entire HIV-1 protease (PR) and reverse transcriptase (RT) fragment (~750-bp) were amplified by nested polymerase chain reaction followed by direct sequencing, as described.¹¹ HIV-1 subtypes were identified using REGA tool version 2.0.¹²

Transmitted drug resistance was identified by the Calibrated Population Resistance tool (CPR),¹³ secondary drug resistance by the Stanford Surveillance Drug Resistance Mutation/International AIDS Society-USA (IAS-USA) major mutation list (Accessed: August/2011). GenBank accession numbers of the sequences presented in this study are JN114115, JN114116, JN114118, JN114120, JN114124, JN114126, JN114127, JN114129, JN114130, JN114132-JN114138, JN114140-JN114145, JN114147, JN114149-JN114153, JN114155, JN114159, JN114162, JN114164, JN114168, JN1141, JN114170, JN114171, JN114173-JN114176, JN114178-JN114180, JN114182-JN114188, JN114190-JN114195, JN114199, JN114201, JN1142, JN114203, JN114206, JN114207, JN114209, JN114210,

JN114217,JN114222,JN114225,JN114227JN114229,JN114235;JN662426,JN662427,
JN662429, JN662431,JN662434,JN662435.

Statistical analyses

Descriptive analyses (frequency, medians, averages, standard deviations) (Epi Info™ Version 3.5.1;CDC/WHO, 2008) and univariate analyses were performed. Fisher Exact test, Kruskal Wallis or Mann Whitney tests (95% CI) were calculated (*p-value* <0.05).

Results

Characteristics of Pregnant Women Infected with HIV-1

A total of 148 pairs of HIV-1 infected mothers/exposed infants was enrolled: six women were enrolled twice due to consecutive pregnancies, one mother gave birth to twins. Therefore this prospective cohort consisted of 142 different mothers that delivered a total of 149 live born infants; no miscarriage or stillbirth was reported.

The median maternal age was 27 years (range 15-41 years; sd=5.53), adolescents (15-19 years old) represented 17.6% (25/142). Heterosexual transmission was reported by all participants; however 10.6 % (15/142) referred blood transfusion, 2.1% (3/142) were also reported intravenous drug use. Mothers had low educational level/income: 4.9% (7/142) were illiterate, 45.8% (65/142) had <8 years of education, 23.9% (34/142) had a formal job with salary.

The great majority of participants (83.8%; 119/142) were diagnosed for HIV-1 infection during prenatal care: 65 from 2008-2010 at a median gestational age of 20 weeks (recently diagnosed group) and 54 were originally diagnosed from 1994-2007 (formerly diagnosed group) (median time since diagnosis=4 years; 1–14 years range). Among

recent cases three women were diagnosed during labor (HIV1/2 rapid tests); for other three participants the diagnosis was disclosed 10 days postpartum. In this cohort only 16.2% (23/142) of previously diagnosed participants received diagnosis of HIV-1 infection independently of prenatal care.

Comparisons between recently and formerly diagnosed women (Table 1) showed that recent cases were younger ($p<0.05$), most were asymptomatic ($p<0.05$). Formerly diagnosed mothers had higher rate of undetectable viral loads (61.4% vs 38.6%) ($p<0.05$) and most (72.7% vs 58.5%) had access to early ARV prophylaxis ($p<0.05$). High access to intravenous ZDV during labor (>90%) and cesarian section predominated in both groups, however the frequency of vaginal delivery was higher among recent cases ($p<0.05$).

Among adolescent pregnant sub-group ($n=25$), most (14/25) were multiparous; 12/25 were diagnosed during a previous prenatal care. Around 25% (6/25) of adolescents were already symptomatic. All adolescents received ARV prophylaxis/treatment and most initiated prophylaxis early in pregnancy. No HIV-1 MTCT case was observed among adolescents.

HIV-1 *pol* gene diversity, transmitted and secondary drug resistance

Pol was sequenced in 58.4% (83/142) participants: 40 patients were recent diagnoses and 43 were formerly diagnosed (Table 1). Interestingly prevalence of HIV-1 subtype C was higher among recent cases (22.5% vs 4.6%) ($p<0.05$). Overall HIV-1 subtype B predominated, followed by BF1 recombinants; similar frequency of subtype F1 (~5%) was observed in both groups.

Only 1 out of 17 ARV-naive patients presented transmitted resistance: M46L PI mutation. In the ARV-experienced group, (57 from HAART prophylaxis; 9 under HAART therapy), ten patients (15.2%) presented secondary drug resistance: six from the prophylaxis group and four under HAART (Table 2). Single class resistance mutations were observed in the 3 recent cases under prophylaxis: PI (n=1), NRTI (n=1) and NNRTI (n=1). In the prophylaxis group, 3 patients had previous diagnosis/prophylaxis and presented dual class mutations: PI/NRTI (n=1) and NRTI/NNRTI (n=2). In the HAART therapy group (n=4) NRTI mutation (n=1), NRTI/NNRTI mutations (n=2) and multidrug resistance (MDR) (n=1) were detected.

Main characteristics of HIV-1 exposed infants

Most HIV-1 exposed infants were males and less than 10% were premature (<37 weeks) (Table 3). Around 10% (6/95) infants, born to recently diagnosed mothers didn't take oral AZT and were breastfed (~10 days).

In this cohort the rate of HIV-1 MTCT was 2.01% (3/149) and associated with late disclosure of maternal diagnosis, vaginal delivery, breastfeeding and lack of oral ZDV (Table 3). Interestingly 2 out of 3 MTCT cases harbored HIV-1 subtype C; one was subtype B ($p<0.05$). None of the transmitting mothers/infected infants had drug resistance mutations in *pol*.

Almost half (69/146) HIV-1 exposed-uninfected infants were followed up until seroreversion at a median age of 12 months (1-18 months range). Maternal viremia, clinical condition, birth weight, gestational age had no impact on the time to seroreversion. Seventy seven HIV-1 exposed-uninfected children did not comply to extended serological follow up after the exclusion of MTCT by molecular tests.

Discussion

This prospective cohort study discloses important features of HIV-1 infected pregnant women and exposed infants from inland central western Brazil. The study group was enrolled in partnership with a high coverage public health prenatal program emphasizing its challenge to attain both early diagnosis of HIV-1 among young women and implementation of full prophylactic interventions. Additionally, this study represented a unique chance to evaluate HIV-1 MTCT in a developing country setting considered to offer high access to HIV-1 diagnosis, treatment and MTCT prophylaxis. Altogether, the profile of pregnant women in this cohort from inland Brazil reflects the current hallmark features of the HIV-1 epidemic in the country: interiorization, heterosexualization, juvenilization and impoverishment.

In our study we have detected drug resistance mutations in almost 10% pregnant women submitted to prophylaxis and in patients under continuous HAART. These results raise concerns regarding the efficacy of future MTCT prophylaxis/therapy for these patients. The prevalent NRTI M184V mutation observed is responsible for resistance to 3TC and increases susceptibility to ZDV/d4T.^{14,15} Two women under HAART had the NRTI T215Y mutation that removes ZDV and d4T incorporated in the DNA when associated with M184V mutation. One MDR patient under HAART had thymidine analogue resistance mutations (TAMs) in codons 67, 70 and 215. The accumulation of TAMs may lead to cross-resistance between NRTIs.¹⁶ In this study none of the HIV-1 transmitting mothers presented resistance mutations. Since these analyses were performed by bulk sequencing which detects viral populations representing >20%, we cannot exclude the possibility of mutations in minority viral populations.¹⁷

The rate of HIV-1 MTCT observed here (~2%) is similar to rates reported in other Brazilian studies, which also included women with partial access to prophylactic measures.¹⁸⁻²³ Viral load during pregnancy/delivery is considered the main risk factor for MTCT.²⁴⁻²⁷ However in this study, MTCT occurred in the context of low maternal viral loads, short/no prophylaxis, vaginal delivery, breastfeeding and lack of oral AZT. Our cohort was recruited in an area of very high prenatal coverage including screening for HIV-1, however recently diagnosed women, including 2 out of 3 cases of transmitting mothers, missed opportunities to fully implement preventive measures. Missed opportunities (defined as instances in which prevention of HIV-1 transmission might had been achieved by the implementation of already proven effective approaches) contribute to transmissions.^{28,29} A previous regional study showed 40.8% vertical transmission without prophylaxis and 1% under adequate prophylaxis.²⁹ Altogether our findings indicate that a more aggressive strategy for earlier prenatal care/diagnosis and longer prophylaxis/better adherence are required to reach undetectable viremia at delivery, considered one of the cornerstones of prevention of MTCT.

The small number of infected children in this study is an acknowledged limitation, indicating that multicentric cohort studies are necessary to investigate risk factors associated with vertical transmission. Since most participants were either under HAART/prophylaxis and therefore had low/undetectable viremia, cDNA was amplifiable and HIV-1 *pol* was sequenced in around 60% of the mothers. Despite this technical limitation it is noteworthy that higher prevalence of subtype C was observed among recent cases (13.2%) compared to formerly diagnosed mothers and to previous regional surveys (~2.0%) which have also included pregnant women^{18,30-32}. It is also remarkable that two (18.2%) of the 11 mothers infected with HIV-1 subtype C transmitted the virus while only one (1.4%) of the 72 mothers infected with “non”-

subtype C transmitted the virus. The role of different HIV-1 subtypes in vertical transmission is still debatable.³³⁻³⁵ Overall our findings indicate the interiorization of HIV-1 subtype C in inland Brazil.

In conclusion the epidemiological and molecular features of HIV-1 infection among pregnant women and newborns from inland Brazil described here may help define timely strategies for earlier diagnosis/prophylaxis during prenatal care which are important to progress towards an HIV-free generation. The circulation of HIV-1 subtype C among pregnant women and newborns in an area where subtype B predominates emphasizes the need of continued HIV-1 molecular surveillance studies including male patients, in central western Brazil.

Conflict of interest declaration

All authors had no conflicts.

Acknowledgements

This study was supported by UNESCO AIDS/STD National Program, Brazilian Ministry of Health (Grant #310-06) and MS/MCT/CNPq – SCTIE-DECIT/CT-Saúde (GRANT #022/2007). Alcântara KC was supported by a scholarship from FAPEG (grant#200910267000696) and Cardoso LPV (grant# 141820/2006-3) was supported by scholarship from CNPq. Stefani MMA is a recipient of a fellowship from The CNPq (grant # 304869/2008-2). We are thankful to the medical staff of HDT/HAA/SUS and IDP for support during recruitment.

REFERENCES

1. Newell ML. Current issues in the prevention of mother-to-child transmission of HIV-1 infection. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2006; **100(1)**:1-5. Review.
2. 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. *N Engl J Med* 1994; **331**:1173-1180.
3. CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Enhanced perinatal surveillance—participating areas in the United States and dependent areas, 2000-2003. *HIV/AIDS Surveillance Suppl Rep* 2008; **13**:1–35.
4. Henry M, Thuret I, Solas C, Genot S, Colson P, Tamalet C. Vertical transmission of multidrug-resistant Q151M human immunodeficiency virus type 1 strains. *Pediatr Infect Dis J* 2008; **27(3)**:278-80.
5. Martinson NA, Ekouevi DK, Dabis F, Morris L, Lupodwana P, Tonwe-Gold B et al. Transmission rates in consecutive pregnancies exposed to single-dose nevirapine in Soweto, South Africa and Abidjan, Cote d'Ivoire. *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr* 2007; **45(2)**: 206-209.
6. Veloso VG, Vasconcelos AL, Grinsztejn B. Prevenção da transmissão vertical do HIV no Brasil. *Bol Epidemiol Aids*.1999; **12(3)**:16-25.
7. Brazil. Ministry of Health. National Department of Department of STD, Aids e Viral Hepatites. *Boletim Epidemiológico Aids e DST – Ano VII, n1º* Brasília, 2011.
8. Whitmore SK, Patel-Larson A, Espinoza L, Ruffo NM, Rao S. Missed opportunities to prevent perinatal human immunodeficiency virus transmission

- in 15 jurisdictions in the United States during 2005-2008. *Women Health*. 2010; **50(5)**:414-25.
9. Costa ZB, Machado GC, Avelino MM, Gomes FC, do Filho JV, Minuzzi AL, et al. Prevalence and risk factors for Hepatitis C and HIV-1 infections among pregnant women in Central Brazil. *Infect. Dis*. 2009; **9**: 116.
 10. Brazil. Ministry of Health. National Department of STD, Aids e Viral Hepatitis. Recomendações para profilaxia da transmissão vertical do HIV e terapia antirretroviral em gestantes. *Treatment guide* 2010, 46.
 11. Cardoso LP, Queiroz BB, Stefani MM. HIV-1 pol phylogenetic diversity and antiretroviral resistance mutations in treatment naïve patients from Central West Brazil. *J Clin Virol* 2009; **46 (2)**:134-9.
 12. Oliveira T, Deforche K, Cassol S, Salminen M, Paraskevis D, Seebregts C, et al. An Automated Genotyping System for Analysis of HIV-1 and other Microbial Sequences. *Bioinformatics* 2005; **21**:3797-3800.
 13. Gifford RJ, Liu TF, Rhee SY, Kiuchi M, Hue S, Pillay D, et al. The calibrated population resistance tool: standardized genotypic estimation of transmitted HIV-1 drug resistance. *Bioinformatics* 2009; **20**:1-3.
 14. Clarke JR, Braganza R, Mirza A, Stainsby C, Ait-Khaled M, Wright A, Lyall H, Parker D, McClure MO, Weber JN, Taylor GP. Rapid development of genotypic resistance to lamivudine when combined with zidovudine in pregnancy. *J Med Virol* 1999; **59**:364–368.
 15. Mandelbrot L, Landreau-Mascaro A, Rekacewicz C, Berrebi A, Be´nifla JL, Agence Nationale de Recherches sur le SIDA (ANRS) 075 Study Group, et al. Lamivudine-zidovudine combination for prevention of maternal-infant transmission of HIV-1. *JAMA* 2001; **285**:2083–2093.

16. Clavel F, Hance AJ. HIV drug resistance. *N Engl J Med* 2004; 350: 1023–1035.
17. Metzner KJ, Giulieri SG, Knoepfel SA, Rauch P, Burgisser P, Yerly S. Minority quasispecies of drug-resistant HIV-1 that lead to early therapy failure in treatment-naive and -adherent patients. *Clin. Infect. Dis* 2009; **48(2)**:239-247.
18. Alcântara KC, Pereira GA, Albuquerque M, Stefani MM. Seroreversion in children born to HIV-positive and AIDS mothers from Central West Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2009; **103(6)**:620-6.
19. Amaral E, Assis-Gomes F, Milanez H, Cecatti JG, Vilela MM, Silva JLP. 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.
20. Tornatore M, Gonçalves CV, Mendoza-Sassi RA, Silveira JM, D'ávila NE, Maas CG, et al. HIV-1 vertical transmission in Rio Grande, Southern Brazil. *Int J STD AIDS* 2010; **21(5)**:351-5.
21. Gonçalves VL, Troiani C, Ribeiro AA, Spir PR, Gushiken EK, Vieira RB, et al. Vertical transmission of HIV-1 in the western region of the State of São Paulo. *Rev Soc Bras Med Trop* 2011; **44(1)**:4-7.
22. Kakehasi FM, Pinto JA, Romanelli RM, Carneiro M, Cardoso CS, Tavares Mdo C et al. Determinants and trends in perinatal human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) transmission in the metropolitan area of Belo Horizonte, Brazil: 1998 - 2005. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2008; **103(4)**:351-7.
23. Succi RCM and Brazilian Pediatric Society study group to evaluate HIV-1 mother-to-child transmission. 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(3)**: S379 – S389.

24. European Collaborative Study, Boer K, England K, Godfried MH, Thorne C. Mode of delivery in HIV-infected pregnant women and prevention of mother-to-child transmission: changing practices in Western Europe. *HIV Med* 2010; **11(6)**:368-78.
25. Warszawski J, Tubiana R, Le Chenadec J, Blanche S, Teglas JP, Dollfus C et al. Mother-to-child HIV transmission despite antiretroviral therapy in the ANRS French Perinatal Cohort. *AIDS* 2008; **22(2)**:289-99.
26. Townsend CL, Cortina-Borja M, Peckham CS, de RA, Lyall H, Tookey PA. Low rates of mother-to-child transmission of HIV following effective pregnancy interventions in the United Kingdom and Ireland, 2000–2006. *AIDS* 2008. **22**: 973–981.
27. Tubiana R, Le Chenadec J, Rouzioux C, Mandelbrot L, Hamrene K, Dollfus C, Faye A, Delaugerre C, Blanche S, Warszawski J. Factors associated with mother-to-child transmission of HIV-1 despite a maternal viral load <500 copies/ml at delivery: a case-control study nested in the French perinatal cohort (EPF-ANRS CO1). *Clin Infect Dis* 2010; **50(4)**:585-96.
28. D'Ippolito M, Read JS, Korelitz J, Joao EC, Mussi-Pinhata M, Rocha N: Missed opportunities for prevention of mother-to-child transmission of human immunodeficiency virus type 1 in Latin America and the Caribbean: the NISDI perinatal study. *Pediatr Infect Dis J* 2007; **26(7)**:649-653.
29. Turchi MD, Duarte LS, Martelli CMT. Mother-to-child transmission of HIV: risk factors and missed opportunities for prevention among pregnant women attending health services in Goiânia, Goiás State, Brazil. *Cad Saúde Pública* 2007. **23(S3)**: S390-S401.

30. Stefani MM, Pereira GA, Lins JA, Alcantara KC, Silveira AA, Viegas AA, et al. Molecular screening shows extensive HIV-1 genetic diversity in Central West Brazil. *J Clin Virol* 2007; **39(3)**:205-9.
31. Cardoso LPV and Stefani MMA. High Level of Multidrug Resistance Mutations in HIV Type 1 pol Gene and Resistance-Associated Mutations to Enfuvirtide (T-20) among Antiretroviral-Experienced Patients from Central Brazil. *Aids Res Hum Retroviruses* 2009; **25(10)**: 943-950.
32. Stefani MMA, Pereira GA, Martelli CM, Shindo N, Galvao-Castro B. Evidence of HIV-1 genetic diversity among pregnant women with AIDS or infected with HIV-1 in Central Brazil. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2000; **23**: 205-207.
33. Murray MC, Embree JE, Ramdahin SG, Anzala AO, Njenga S, Plummer FA. Effect of human immunodeficiency virus (HIV) type 1 viral genotype on mother-to-child transmission of HIV-1. *J Infect Dis* 2000; **181(2)**:746-9.
34. Renjifo B, Gilbert P, Chaplin B, Msamanga G, Mwakagile D, Fawzi W, Essex M; Tanzanian Vitamin and HIV Study Group. Preferential in-utero transmission of HIV-1 subtype C as compared to HIV-1 subtype A or D. *AIDS* 2004; **18(12)**:1629-36.
35. Renjifo B, Fawzi W, Mwakagile D, Hunter D, Msamanga G, Spiegelman D, Garland M, Kagoma C, Kim A, Chaplin B, Hertzmark E, Essex M. Differences in perinatal transmission among human immunodeficiency virus type 1 genotypes. *J Hum Virol* 2001; **4(1)**:16-25.

Table 1: Main epidemiological, clinical and MTCT prophylaxis characteristics among newly diagnosed mothers for HIV-1 infection and mothers diagnosed before index pregnancy.

Variable	Mothers HIV-1 recently diagnosed (n=65)	Mothers HIV-1 previously diagnosed (n=77)	P*
Age (years)			
Median (range)	25 (15-39)	28 (17-41)	0.0004
Clinical status n/N (%)			
Asymptomatic (HIV)	49/62 ^a (79.0)	37/76 ^b (48.7)	0.0002
Symptomatic (AIDS)	13/62 (21.0)	39/76 (51.3)	
CD4 cells/mm³			
Median (range)	543 (162-1418) ^c	499 (91-1931) ^d	0.16
Plasma viral load (copies/mL)			
Median (n)	19,826 (35)	5,836 (27)	0.06
Range	492 – 750,00	455- 312,349	
Undetectable n (%)	22/57 ^e (38.6)	43/70 ^f (61.4)	0.01
ARV during pregnancy n (%)			
1 st or 2 nd trimester	38 (58.5)	56 (72.7)	0.04
3 rd trimester	14 (21.5)	08 (10.4)	
No ARV	13 (20.0)	13 (16.9)	
Maternal IV ZDV during labor n/N (%)			
Yes	56/62 ^g (90.3)	72/75 ^h (96.0)	0.16
No	06/62 (9.7)	03/75 (4.0)	
Mode of delivery			
Cesarian section n/N(%)	42/64 ⁱ (65.6)	62/76 ^j (81.6)	0.02
Vaginal n/N (%)	22/64 (34.4)	14/76 (18.4)	
HIV-1 Subtypes in <i>pol</i>[#] n/N (%)			
B	25/40 (62.5)	29/43 (67.5)	0.40
BF	04/40 (10.0)	09/43 (20.9)	0.14
C	09/40 (22.5)	02/43 (4.6)	0.02
F	02/40 (5.0)	02/43 (4.6)	0.66
CB	00 (0.0)	01/43 (2.3)	0.51

* The *P* values were determined by Fisher's exact test or Mann-Whitney, as appropriate [CI 95% (*p*<0.05)]; ARV=Antirretroviral; AZT=zidovudine; Missing data: *a*=03, *b*=01; *c*=08; *d*=06; *e*=08; *f*=07; *g*=03; *h*=2; *i*= 1; *j*=1; # Not amplified=59.

Table 2: Amino acid substitutions in the PR and RT resistance-related codons of mothers with secondary resistance to antiretroviral drugs.

GenBank accession number	Therapy/ Prophylaxis	Subtype PR/RT	Protease inhibitors (PI)		Reverse Transcriptase Inhibitors		Resistance Profile		
			Major mutations	Minor mutations	NRTI	NNRTI	Low	Intermediate	High
JN114124	HAART Therapy	B ^{PR} /B ^{RT}	-	-	M184V	-	-	-	3TC / FTC
JN114124	HAART Therapy	F ^{PR} /B ^{RT}	-	-	A62V, M184V	K103N, P225H	ETR	-	3TC/FTC e DLV/EFV/NVP
JN114132	HAART Therapy	F ^{PR} /B ^{RT}	-	-	M184V, T215Y	K103N, P225H	AZT/D4T/DDI	ABC	3TC/FTC e DLV/EFV/NVP
JN114143	HAART Therapy	B ^{PR} /B ^{RT}	D30N, N88D, L90M	A71T	D67N, K70R, M184V, T215Y, K219DE	L100I, H221Y	FPV _r TDF ETR	ATV _r /IDV _r /SQV _r ABC/D4T/DDI DLV/EFV/NVP	NFV 3TC/AZT/FTC
JN114118	HAART Prophylaxis*	B ^{PR} /B ^{RT}	M46L, I50L, V82A	A71V	M184V	-	FPV _r /SQV _r	IDV _r /LPV _r	ATV _r / NFV
JN114145	HAART Prophylaxis*	C ^{PR} /C ^{RT}	-	-	M184V	K103N	-	-	3TC/FTC DLV/EFV/NVP
JN114173	HAART Prophylaxis	B ^{PR} /B ^{RT}	I85V	-	-	-	-	-	
JN114190	HAART Prophylaxis	F ^{PR} /B ^{RT}	-	-	A62V, T69A, M184M	-	ABC	-	3TC/ FTC
JN114207	HAART Prophylaxis	B ^{PR} /B ^{RT}	-	-	-	V106I, V179D, Y188L	ETR	DLV	EFV / NVP
JN114227	HAART Prophylaxis*	B ^{PR} /F ^{RT}	-	-	M184V	E138A	-	-	3TC / FTC

*Patient with former diagnosis which received mother-to-child prophylaxis at previously pregnancy.

PI: protease inhibitor; NRTI: nucleoside reverse transcriptase inhibitors; NNRTI: non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors. ATV: atazanavir; AZT: zidovudine; DDI: didanosina; DLV: delavirdine; d4T: stavudine; EFV: efavirenz; ETR: etravirine; FPV: fosamprenavir; IDV: indinavir; LPV: lopinavir; NFV: nelfinavir; NVP: nevirapine and SQV: saquinavir.

Table 3: Main characteristics of HIV-1 infected mothers/exposed infants (n=149) and of three cases of HIV-1 MTCT.

	All n (%)	CASE 1	CASE 2	CASE 3
Infant features	149 (100)			
Gender		F	F	F
F	76 (51)			
M	73 (49)			
Gestational age (weeks)		38	36	38
Median (range)	38 (33 – 42)			
Birth weight (g)		3095	2600	2430
Median	2970			
(range)	(1548–4710)			
Mode of delivery		Cesarian section	Vaginal	Vaginal
Cesarian	110 (73.8)			
Vaginal	39 (26.2)			
Oral ZDV		Yes	No	Yes
Yes	143 (96.0)			
No	06 (4.0)			
Breastfeeding		No	Yes (10 days)	No
Yes	06 (4.0)			
No	143 (96.0)			
CD4 T cell counts (cell/mm³)		2175	NA*	937
Median	2812			
(range)	(855–6500)			
Age at HIV-1 diagnosis (days)	NA	30	10	30
Viral load at diagnosis (copies/mL)	NA	34,499	121,468	127,069
Seroreversion (months)[#]		NA	NA	NA
Median (range)	12 (1 – 18)			
Maternal features	142 (100)			
Clinical status^a		AIDS	HIV	AIDS
Asymptomatic (HIV)	86 (62.3)			
Symptomatic (AIDS)	52 (37.7)			
CD4 T cell counts^b (cell/mm³)		0.75	NA*	0.23
Median	525			
(range)	(91-1931)			
Plasma viral load^c (copies/mL)		862	2840	Undetectable
Median	10209			
(range)	(455-750,000)			
Undetectable	64			
ARV during pregnancy		3 rd trimester	No ARV	3 rd trimester
1 st ou 2 nd trimester	94 (66.2)			
3 rd trimester	22 (15.5)			
No ARV	26 (18.3)			
ZDV in labor^d		Yes	No	Yes
Yes	128 (93.4)			
No	09 (6.6)			

ARV: antiretroviral; F=female; ZDV: zidovudine; IV: intravenous; NA: not applicable; NA*: not available; [#] 69 children followed up until seroreversion; missing data: a=4; b=14; c=15; d=5.

7. MANUSCRITO 3: HIV-1 SUBTYPE C PHYLOGEOGRAPY AMONG PREGNANT WOMEN FROM GOIAS STATE, CENTRAL WESTERN BRAZIL

Alcântara, K.C.¹

Reis, M.N.G.¹

Cardoso, LPV¹

Bello G.³

Stefani, MMA¹

Affiliation:

1. Tropical Pathology and Public Health Institute/ Federal University of Goiás, Brazil.
2. Anuar Auad Hospital/Hospital of Tropical Diseases
3. Oswaldo Cruz Institute

Running Title: HIV-1 subtype C; phylogeography; pregnant women.

Correspondence: Mariane Martins de Araújo Stefani. Address: Universidade Federal de Goiás/ Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública. Rua 235 s/n Setor Universitário, 74605-050, Goiânia-Goiás/Brazil. Fax: 55 62 3209 63 63 Phone: 55 62 3209 61 11. email: mariane.stefani@pq.cnpq.br

ABSTRACT

Background: The molecular epidemiology of HIV-1 in Brazil is complex and heterogeneous in which several subtypes co-circulate with some important regional differences. **Objective:** To evaluate HIV-1 molecular epidemiology among pregnant women from Goiás State in central western Brazil. **Material and methods:** HIV-1 infected pregnant women were recruited in Goiania/GO (central western), from June/2008-June/2010 at main regional reference public health centers for HIV-1 diagnosis/patients' care (Instituto de Diagnóstico e Prevenção/IDP and Hospital Anuar Auad/HDT/SUS). Plasma viral loads, CD4⁺ T cell counts and HIV-1 subtyping were assessed during pregnancy. *Pol* gene was retrotranscribed from plasma HIV-1 RNA, sequenced and genotyped after direct nested PCR. HIV-1 subtypes were assigned by REGA software and phylogenetic analyses. **Results:** The median age of 172 pregnant women was 26 years (15-41 years range); 58.7% (101/172) were diagnosed during current prenatal care, 63.4% was asymptomatic. Around half (89/172) were from over 50 different interior cities within Goiás State. HIV-1 *pol* sequences (131/172) showed subtype B (64.9%), subtype C (11.4%) and subtype F1 (7.6%). Recombinant PR/RT viruses represented 15.3% (20/131): 17/20 B/F1 (three, "CRF29_BF-like") and 3 (2.3%) C/B (two, "CRF31_BC-like"). Subtype C prevalence increased from 4.8% (2000-2007) to 17.1% (2008-2010) ($p < 0.05$) and BF1 mosaics ranged from 41.7% to 6.6% from 1994-2010 ($p < 0.05$). All HIV⁺ subtype C pregnant women came from inland municipalities of Goiás state crossed by highways that connect south/southern to north, northeast and Mato Grosso (west) suggesting the participation of long distance truck drivers. Phylogenetic analyses showed that HIV-1 subtype C from this cohort formed clusters ($aLTR \geq 0.85$) with sequences from Southern states and Sao Paulo. **Conclusion:** Different heterosexual transmission chains associated with south/southeast migration/transportation towards central/north/northeast probably involving truck

drivers seem to play a role in the introduction and dissemination of subtype C in the interior of Brazil.

INTRODUCTION

Brazil, the largest country in Latin America, presents a complex and heterogeneous molecular epidemiology of HIV-1 in which several subtypes co-circulate with some important regional differences.¹⁻⁵ Subtype C which predominates globally is prevalent only in south Brazil and has been expanding in the neighboring southeast region and is expected to increase its participation in the global epidemic.² Subtype B, the predominant in the western world, prevails in the rest of Brazil. Subtype F1 which has been reported in central Africa and Eastern Europe also circulates in Brazil and in other South American countries. More recently the Brazilian epidemic has been characterized by a significant rate of HIV-1 BF1 and BC circulating recombinant forms (CRF) and unique recombinant forms (URF).^{6,7} Previous HIV-1 molecular epidemiology studies in Goias State, central western Brazil which have enrolled mainly patients from the big metropolitan area have shown predominance of subtype B, followed by several different patterns of BF1 recombinants, subtype F1 and sporadic cases of subtype C.⁸⁻¹¹ Although recent studies have suggested an increase in subtype C, most of them have been carried out either in large metropolitan areas or in interior cities in the southern region. So far the impact of subtype C in small interior cities away from the south and southeast has not been evaluated.^{2,3,12}

Childbearing age women are vulnerable to HIV-1 infection and represent almost 50% of the estimated 33.3 million individuals that are currently living with HIV/AIDS worldwide.¹³ Women infected with HIV-1 can transmit the infection to their sexual partners and also to their infants during pregnancy, delivery and post partum by breastfeeding.¹⁴⁻¹⁶ Although controversial, some studies indicate that HIV-1 genetic

diversity seems to play a role in mother-to-child-transmission (MTCT).¹⁷⁻¹⁹ In Brazil, recent study reported the actual predominance of clade C among HIV infected young females in the South region.^{12,20}

Our study aimed to evaluate HIV-1 molecular epidemiology among pregnant women from Goiás State in central western Brazil. Moreover, phylogeography analysis was performed to investigate the geographical origin of the HIV-1 subtype C sequences circulating in the inland central western Goiás State.

METHODS

Study Population and design.

Pregnant women with confirmed diagnosis of HIV-1 infection were enrolled from 2008-2010 at two main regional public health reference institutions for HIV-1 diagnosis/patients care (“Instituto de Diagnóstico e Prevenção/IDP/APAE” and “Hospital Anuar Auad/HDT/SUS”) in Goiânia city (1,256.514 inhabitants), capital of Goiás State (8,849.105 inhabitants; 11.918 registered AIDS cases until June 2010). During this study period 217.590 live births were recorded by the public health database (DATASUS) in Goiás State and 146,897 (67,5%) pregnant women were screened by a public health “Program for the Protection of Pregnant Women” (“Programa de Proteção a Gestante”, PPG/Goiania/GO). This prenatal program screens around 70.000 pregnant women/year covering public health centers in all 240 municipalities of Goiás State. Screening includes HIV-1 infection, hepatitis B and C, HTLV infection, syphilis, toxoplasmosis, rubella, Chagas Disease, CMV infection.

HIV-1 *pol* genetic analyses.

Plasma RNA was extracted, retrotranscribed into complementary DNA (cDNA) and the entire HIV-1 protease (PR) and reverse transcriptase (RT) fragment (~750-bp) were amplified by nested polymerase chain reaction followed by direct sequencing, as described.²¹ HIV-1 subtypes were identified using REGA tool version 2.0.²²

Phylogenetic analysis of subtype C sequences

For the phylogenetic analysis the new subtype C PR/RT sequences from the state of Goias identified in this study were combined with 140 subtype C PR/RT sequences isolated in different states from South (Rio Grande do Sul/Porto Alegre = 54, Santa Catarina = 41, and Parana = 19) Southeast (Sao Paulo = 19) and Central West (Goias = 7) Brazilian regions, that were available at the Los Alamos HIV Database (<http://www.hiv.lanl.gov/content/index>). Brazilian subtype C PR/RT sequences were analyzed together with 15 subtype C reference sequences of African origin, including five sequences from Burundi that were described among the ones most closely related to the Brazilian clade.²³ The final alignment of 951 nt long (covering nucleotides 2253-3272 relative to HXB2 clone) is available from the authors upon request. Phylogenetic tree was inferred by the maximum likelihood (ML) method under the GTR+I+ Γ_4 nucleotide substitution model, selected using the jModeltest program.²⁴ ML tree was reconstructed with program PhyML²⁵ using an online web server.²⁶ Heuristic tree search was performed using the SPR branch-swapping algorithm and the reliability of the obtained topology was estimated with the approximate likelihood-ratio test (*aLRT*)²⁷ based on a Shimodaira-Hasegawa-like procedure.

Statistical analyses.

Descriptive analyses of frequency, medians, averages and standard deviations for numeric variables were performed using Epi Info™ Version 3.5.1 (CDC/WHO, 2008).

Fisher Exact test, Kruskal Wallis or Mann Whitney tests (95% CI) were calculated (*p*-value <0.05).

Results

Main socio-demographic and clinical characteristics of pregnant women

During the two years study period (2008-2010) around 150.000 pregnant women from over 240 municipalities of Goias State/central western Brazil were screened by a public health prenatal program. Our study population included 172 out of 198 confirmed cases (86.9%) of HIV-1 infection among pregnant women in that period. Approximately 50% of HIV-1 infected patients (89/172) were from over 50 different interior cities within Goias State ranging from small cities (Israelandia- 2888 inhabitants) to median size cities (Anapolis-324,303 inhabitants). In this group 44.2% (76/172) of the patients lived in the great metropolitan area of the State capital (Goiânia and Aparecida de Goiania which account 1,699.492 inhabitants). Seven participants were from different Brazilian States: Mato Grosso (n=3), Federal District (n=2), Tocantins (n=1) and Rio Grande do Sul (n=1).

The median age of pregnant women was 26 years (15-41 years range), almost 50% had no or low formal education and 19.2% (33/172) had a formal job with salary. Heterosexual transmission was the reported risk category for all participants but blood transfusion and intravenous drug use were also related. At enrollment 44.8% (77/172) referred a stable sexual partner, 19.8% (34/172) reported having had a sexual partner infected with HIV-1. For 58.7% (101/172) of participants HIV-1 diagnosis was disclosed during prenatal care. Most pregnant women (63.4%) was asymptomatic, the medians of CD4⁺ T cell counts was 525 cells/mm³ (82 – 1931 cells/mm³ range) and

viral loads were undetectable in 37.8% (n=65). Table 1 summarizes the socio-demographic, clinical and laboratory characteristics of this group.

Molecular epidemiology mapping of HIV-1 among pregnant women from Goiás State.

A total of 131/172 HIV-1 *pol* sequences from pregnant women were obtained and subtypes defined: subtype B predominated (64.9%, 85/131), followed by 11.4% subtype C viruses (n=15) and 7.6% subtype F1 (n=10) (Figure 1a). Recombinant viruses in RT/PR fragments represented 15.3% (20/131): 17/20 were B/F1 (isolates BRGO4120, BRGO4024, BRGO4016 were “CRF29_BF-like”) and 3 viruses (2.3%) were C/B recombinants (isolates BRGO4179 and BRGO 4156 were “CRF31_BC-like”) (Figure 1b). Patients that referred other risk categories besides heterosexual risk (intravenous drug users and recipients of blood transfusion) had subtype B, recombinant BF1, and subtype F1 viruses and none had subtype C infection. HIV-1 subtype C was identified in the patient from Rio Grande do Sul State; subtype B and BF1 were detected among 3 patients from Mato Grosso do Sul State and subtype B and one BC recombinant were detected among patients from the Federal District.

The molecular mapping of HIV-1 among pregnant women coming from over fifty different cities within Goiás State is shown in Figure 2. Interestingly in this study group all pregnant women infected with subtype C came from interior cities mainly located around the Federal District. However patients infected with subtype C coming from the southeast, north and central parts of Goiás State were also observed.

To investigate the temporal trend of HIV-1 genetic diversity among these pregnant women all *pol* sequences were separated by subtypes according of the date of diagnosis which ranged from 1994-2010 (Figure 3). This analysis showed that while the prevalence of HIV-1 subtype B remained constant overtime (~60%), subtype C was not

detected in early 90's and its prevalence increased from 4.8% from 2000-2007 to 17.1% (n=13) among patients diagnosed from 2008-2010 ($p<0.05$). In this population the frequency of BF mosaics ranged from 41.7% (5/12) to 6.6% (5/76) from 1994-2010 ($p<0.05$).

The main characteristics of pregnant women infected with HIV-1 subtype C included 20% symptomatic cases (3/15), viral loads were undetectable in one third and for the remaining 11 patients the median viral load was 4085.5 copies/mL (754 – 10,978 copies/mL range). Eight out of fifteen (53.3%) were under MTCT prophylaxis, the other 46.6% (7/15) were naïve. BC recombinants (n=3) were present among asymptomatic, recently diagnosed (2008-2010) young women (17-21 years). Two of them came from the Federal District and a neighboring city and one referred sexual partner who was an intravenous drug user. The third case of BC infection was from a city close to the capital Goiania (Trindade- religious touristic city) was diagnosed in 2008 when she was 15 years old during the first of three reported pregnancies.

Phylogeography of Subtype C in Goias, central western, Brazil

Phylogeography analysis was performed to investigate the geographical origin of the HIV-1 subtype C sequences circulating in the inland central western Goias State. For this analysis we have excluded one HIV-1 subtype C sequence due to shorter fragment sequenced (RT only). The remaining recently identified 14 subtype C PR/RT sequences from this study were combined with subtype C sequences previously isolated in Goias (n=6, just one was from a male patient the others were from female patients) and in other Brazilian states (n=133), and with 15 subtype C reference sequences of African origin.

The ML phylogenetic tree shown in Figure 4 revealed that all sequences from Goiás branched within the Brazilian monophyletic clade, confirming that the HIV-1 subtype C epidemic in this state is the result of dissemination of the local subtype C Brazilian lineage. The twenty subtype C sequences from Goiás appeared distributed in at least 14 independent lineages that were intermixed among sequences from other Brazilian states. Most subtype C sequences from Goiás formed well supported clusters ($aLTR \geq 0.85$) with sequences from Southern states, while one lineage segregates with high support ($aLTR = 0.9$) with a sequence from Sao Paulo (Figure 3). The majority of subtype C lineages from Goiás were composed by only one sequence. We detected, however, one highly supported ($aLTR = 0.89$) monophyletic clade (called GO-I) that was composed by four sequences isolated in Goiás between 2003 and 2010 (Figure 3). Two other clades composed by two and three sequences from Goiás were also detected, but supported by low $aLTR$ values (< 0.8) (Figure 3).

DISCUSSION

This HIV-1 molecular epidemiology study among pregnant women infected by heterosexual intercourse from both the metropolitan and interior cities of Goiás State showed an important expansion of subtype C infections. Our data have also shown that the dissemination and expansion of subtype C was verified in the interior of the State while it remains low in the great metropolitan area where the capital is located. Our phylogenetic analysis revealed that the HIV-1 subtype C epidemic among young women from the inland central western state of Goiás results from the dissemination of the monophyletic Brazilian subtype C lineage that has also spread through the south and southeast Brazilian regions. Our analysis also showed that this subtype C epidemic results from multiple different introductions as we identified at least 14 independent introductions of the Brazilian subtype C clade in this geographical area. As expected,

most subtype C strains detected in inland Goiás seem to have originated from the Southern Brazilian states (Rio Grande do Sul, Santa Catarina and Parana), where this subtype displays a high prevalence (20-80%).^{1,5,12,20,28-35} However one subtype C sequence detected in this study was closely related to a subtype C sequence from the State of Sao Paulo, which has a strong socio-economic connection with Goiás. A recent study from the state of São Paulo described a significant temporal increase in the proportion of HIV-1 subtype C strains (around 8%) among adult antiretroviral-naive patients recruited from 2008-2009.⁴ Altogether these findings suggest that following the increase in subtype C prevalence, Sao Paulo, the most populated and industrialized area in South America may probably represent a secondary hub of subtype C dissemination into other neighboring and distant geographic areas including the state of Goiás.

Our phylogenetic analysis also showed that most subtype C lineages from Goiás were composed by only one sequence. It is unclear whether these lineages correspond to massive introductions of subtype C strains into Goiás during the last years, or if they represent old subtype C strains that previously failed to become disseminated and established in the region and that are now expanding by male to female transmission. We have also identified one well supported monophyletic lineage (GO-I) that was composed by four sequences from Goiás. All sequences of clade GO-I were retrieved from women infected through heterosexual intercourse that reside in neighboring cities located in the southeast of the Goiás state. This finding indicates that this clade probably corresponds to a local heterosexual transmission network of HIV-1 subtype C in that area. Of note, the four sequences of clade GO-I were isolated from pregnant women recruited over a period of seven years (2003-2010) pointing to a longstanding presence of subtype C in the state of Goiás. In fact, the first demonstration of HIV-1 subtype C in Goiás State dates the year 2000 in a pregnant woman from south Brazil.³⁶ Our findings

of expansion of subtype C contrast with previous results, including recent ones from 2008-2009, among that showed a low prevalence of subtype C among males and pregnant women.^{8,9,10,11} Nevertheless these previous studies have enrolled mainly patients from the great metropolitan area where the capital is located. In the current study all subtype C infections were identified in pregnant women living in interior cities from Goiás State. Moreover the absence of HIV-1 subtype C infections in the great metropolitan area indicates that it remains a minor variant. The spread and expansion of subtype C, preferably in the interior may be linked with the strong migration flow over the last decades from the south towards central-western interior cities. This migration was mainly motivated by the search for new and larger agricultural and cattle raising areas. However interestingly and intriguingly, in our study most cases of HIV-1 subtype C infections were detected in women living in neighbor municipalities of the Federal District, where Brasília the country capital is located. This area is known to be populated mostly by northern migrants, where subtype C reports are rare (Cerqueira et al. 2003; Véras et al. 2007)^{37,38}. A recent survey in the recently created Palmas city, capital of Tocantins state, north Brazil showed the circulation of subtype C which was also described in Para State (Machado et al. 2009)³⁹. Overall these studies confirm the interiorization of subtype C in Brazil.

Another plausible possibility would be multiple subtype C introductions from south/southeast into inland Brazil by long distance truck drivers. The central geographical location of Goiás state makes it an almost mandatory passage hub of industrialized goods/food from the more populated southern regions to the less populated and industrialized north/northeast regions. Interestingly we have also shown that the geographic distribution of subtype C in interior cities overlaps the major highways that cross Goiás State towards the north/northeast regions and other western states. The hypothesis of subtype C dissemination by long distance truck drivers is

compatible with their known high risk sexual behavior to acquire HIV-1 infection/other sexually transmitted diseases (STD) such as low/inconsistent condom use^{40,41}, migratory occupation associated with promiscuity including sex with different commercial sex workers⁴² little or no access to health services, lack of information about STD/AIDS and their prevention. In our study one woman harboring subtype C from the interior of Goiás (Mozarlandia) referred a sexual partner who was a long distance truck driver. The identification of a pregnant woman infected with HIV-1 subtype C in a very small interior city (Israelândia, < 3000 inhabitants, northwestern part of the State) corroborates the existence of multiple introduction routes in this area.

The phylogenetic analysis showed that multiple introductions of HIV-1 subtype C in inland Goiás connected with the epidemic in the south/ southeast Brazil are occurring. Additionally transmission chains in interior cities seem to differ from the great metropolitan area of the capital. The presence of B/C mosaics among pregnant women from central western also indicates that B and C epidemics have been intermixed for some time in the area. It is noteworthy that two *pol* subtype B/C recombinant structures show a breakpoint compatible to CRF31_BC, indicating the dissemination and circulation of this variant, that was described among patients from Rio Grande do Sul, in central western region. Second generation CRF31_BC, mosaics among clade C genomes have been recently demonstrated and may also be circulating in Goiás^{43,44}. The expansion of the subtype C and ongoing diversity being generated by recombination is an important issue in the surveillance of the dynamic of the epidemic in Brazil. Our results indicate that the potential impact of clade C cocirculation should be monitored in other geographic regions away from its epicenter in south Brazil representing a chance to follow the evolution of locally circulating strains during its expansion.

We conclude that different heterosexual transmission chains associated with south/southeast migration/ transportation towards central/north/northeast probably involving truck drivers seem to play a role in the introduction and dissemination of subtype C in the interior of Brazil.

References

1. Soares EA, Santos RP, Pellegrini JA, et al. Epidemiologic and molecular characterization of human immunodeficiency virus type 1 in southern Brazil. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2003;34:520–526.
2. Soares EA, Martinez AM, Souza TM, et al. HIV-1 subtype C dissemination in southern Brazil. *AIDS*. 2005;19(Suppl. 4):S81–86.
3. Dias CF, Nunes CC, Freitas IO, et al. High prevalence and association of HIV-1 non-B subtype with specific sexual transmission risk among antiretroviral naïve patients in Porto Alegre, RS, Brazil. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*. 2009; 51(4):191-196.
4. Brigido LF, Ferreira JL, Almeida VC, et al. Southern Brazil HIV type 1 C expansion into the state of Sao Paulo, Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2011; 27:339-44.
5. Toledo PV, Carvalho DS, Rossi SG, et al. Genetic diversity of human immunodeficiency virus-1 isolates in Parana, Brazil. *Braz J Infect Dis*. 2010. ; 14:230-6.
6. Passaes CP, Bello G, Lorete RS, et al.: Genetic characterization of HIV-1 BC recombinants and evolutionary history of the CRF31_BC in southern Brazil. *Infect Genet Evol*. 2009;9:474–82.
7. Passaes CP, Guimarães ML, Bello G, et al. Near Full-Length Genome Characterization of HIV Type 1 Unique BC Recombinant Forms from Southern Brazil. *Aids Res Hum Retroviruses*. 2009; 25(12): 1339-44.
8. Cardoso LP, Queiroz BB, Stefani MM. HIV-1 pol phylogenetic diversity and antiretroviral resistance mutations in treatment naïve patients from Central West Brazil. *J Clin Virol*. 2009; 46 (2):134-9.
9. Alcântara KC, Pereira GA, Albuquerque M, et al. Seroreversion in children born to HIV-positive and AIDS mothers from Central West Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2009; 103(6):620-6.
10. Stefani MM, Pereira GA, Lins JA, et al. Molecular screening shows extensive HIV-1 genetic diversity in Central West Brazil. *J Clin Virol*. 2007; 39(3):205-9.
11. Cardoso LPV, Pereira GAS, Viegas AA, et al. HIV-1 Primary and Secondary Antiretroviral Drug Resistance and Genetic Diversity Among Pregnant Women From Central Brazil. *J Med Virol*. 2010;82:351–57.
12. Rodrigues RS, Manenti S, Romão PR, et al. Young pregnant women living with HIV/AIDS in Criciúma, Southern Brazil, are infected almost exclusively with HIV type 1 clade C. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2010; 26:351-7.
13. Joint United Nations Programme on HIV/AIDS (UNAIDS) and World Health Organization (WHO): AIDS epidemic update. Geneva, Switzerland 2010.
14. Jourdain G, Ngo-Giang-Huong N, Le Coeur S, et al. Intrapartum exposure to nevirapine and subsequent maternal responses to nevirapine-based antiretroviral therapy. *N Engl J Med*. 2004;351(3):229-40.

15. Coovadia H. Current issues in prevention of mother-to-child transmission of HIV-1. *Curr. Opin. HIV. AIDS*. 2009; 4:319-24.
16. Tubiana R, Le Chenadec J, Rouzioux C, et al. Factors associated with mother-to-child transmission of HIV-1 despite a maternal viral load <500 copies/ml at delivery: a case-control study nested in the French perinatal cohort (EPF-ANRS CO1). *Clin Infect Dis*. 2010; 50(4):585-96.
17. Renjifo B, Gilbert P, Chaplin B, Msamanga G, Mwakagile D, Fawzi W, Essex M; Tanzanian Vitamin and HIV Study Group. Preferential in-utero transmission of HIV-1 subtype C as compared to HIV-1 subtype A or D. *AIDS* 2004; **18(12)**:1629-36.
18. Renjifo B, Fawzi W, Mwakagile D, Hunter D, Msamanga G, Spiegelman D, Garland M, Kagoma C, Kim A, Chaplin B, Hertzmark E, Essex M. Differences in perinatal transmission among human immunodeficiency virus type 1 genotypes. *J Hum Virol* 2001; 4(1):16-25.
19. Zhang H, Tully DC, Hoffmann FG, et al. Restricted Genetic Diversity of HIV-1 Subtype C Envelope Glycoprotein from Perinatally Infected Zambian Infants. *PLoS ONE*. 2010; 5(2): e9294.
20. Graf T, Passaes CP, Ferreira LG et al. HIV-1 genetic diversity and drug resistance among treatment naive patients from Southern Brazil: an association of HIV-1 subtypes with exposure categories. *J Clin Virol*. 2011;51:186-91.
21. Cardoso LP, Queiroz BB, Stefani MM. HIV-1 pol phylogenetic diversity and antiretroviral resistance mutations in treatment naive patients from Central West Brazil. *J Clin Virol*. 2009; 46 (2):134-9.
22. Oliveira T, Deforche K, Cassol S, et al. An Automated Genotyping System for Analysis of HIV-1 and other Microbial Sequences. *Bioinformatics*. 2005; 21:3797-3800.
23. Bello G, Passaes CP, Guimaraes ML, et al. Origin and evolutionary history of HIV-1 subtype C in Brazil. *AIDS*. 2008; 22:1993-2000.
24. Posada D. jModelTest: phylogenetic model averaging. *Mol Biol Evol*. 2008;25:1253-6.
25. Guindon S and Gascuel O. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst Biol*. 2003; 52:696-704.
26. Guindon S, Lethiec F, Duroux P, et al. PHYML Online--a web server for fast maximum likelihood-based phylogenetic inference. *Nucleic Acids Res*. 2005; 33:W557-9.
27. Anisimova M and Gascuela O. Approximate likelihood-ratio test for branches: A fast, accurate, and powerful alternative. *Syst Biol*. 2006;55:539-52.
28. Brigido LF, Nunes CC, Oliveira CM et al. HIV type 1 subtype C and CB Pol recombinants prevail at the cities with the highest AIDS prevalence rate in Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2007; 23:1579-86.
29. Ferreira JL, Thomaz M, Rodrigues R, et al. Molecular characterisation of newly identified HIV-1 infections in Curitiba, Brazil: preponderance of clade C among males with recent infections. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2008;103:800-8.
30. Locateli D, Stoco PH, Queiroz AT et al. Molecular epidemiology of HIV-1 in Santa Catarina State confirms increases of subtype C in Southern Brazil. *J Med Virol*. 2007;79:1455-63.
31. Raboni SM, Almeida SM, Rotta I et al. Molecular epidemiology of HIV-1 clades in Southern Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2010; 105:1044-9.
32. Rodrigues R, Scherer LC, Oliveira CM, et al. Low prevalence of primary antiretroviral resistance mutations and predominance of HIV-1 clade C at polymerase gene in newly diagnosed individuals from south Brazil. *Virus Res*. 2006;116:201-7.

33. Santos AF, Schrago CG, Martinez AM, et al. Epidemiologic and evolutionary trends of HIV-1 CRF31_BC-related strains in southern Brazil. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2007;45:328-33.
34. Silva MM, Telles FQ, da Cunha CA, et al. HIV subtype, epidemiological and mutational correlations in patients from Parana, Brazil. *Braz J Infect Dis.* 2010; 14:495-501.
35. Simon D, Beria JU, Tietzmann DC, et al. Prevalence of HIV-1 subtypes in patients of an urban center in Southern Brazil. *Rev Saude Publica.* 2010.
36. Stefani MMA, Pereira GA, Martelli CM, et al. Evidence of HIV-1 genetic diversity among pregnant women with AIDS or infected with HIV-1 in Central Brazil. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2000; 23: 205-207.
37. Cerqueira DM, Amorim RM, Silva RR, et al. Antiretroviral resistance and genetic diversity of Human Immunodeficiency Virus Type 1 isolates from the Federal District, Central Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2004;99(8):877-82.
38. Vêras NM, Vêras VS, Ramalho ED, et al. HIV type 1 genetic variability in central Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2007; 23(12):1481-90.
39. Machado LF, Ishak MO, Vallinoto AC et al. Molecular epidemiology of HIV type 1 in northern Brazil: identification of subtypes C and D and the introduction of CRF02_AG in the Amazon region of Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2009;25(10):961-6.
40. Stratford D, Ellerbrock TV, Akins JK et al. Highway cowboys, old hands and Christian truckers: Risk behavior for Human Immunodeficiency Virus infection among long haul truckers in Florida. *Social Science and Medicine.* 2000; 50: 737-749.
41. Sugihantono A, Slidell M, Syaifudin A, et al. Syphilis and HIV prevalence among commercial sex workers in central Java, Indonesia: Risktaking behavior and attitude that may potentiate a wider epidemic. *AIDS Patient Care and STDs.* 2003; 17; 595-600.
42. Bloom DE & Lyons JV. Institute for Population and Social Research, Mahidol University, Bangkok. Behavior pattern of Thai long haul truck drivers. 1993. In D. E. Bloom & J. V. Lyons (Eds.), *Economic implications of AIDS in Asia* (pp. 80-81). New Delhi: UNDP Regional Bureau for Asia and the Pacific.
43. Ferreira AS, Cardoso LP, Stefani MM. Moderate prevalence of transmitted drug resistance and high HIV-1 genetic diversity in patients from Mato Grosso State, Central Western Brazil. *J Med Virol.* 2011; 83(8):1301-7. doi: 10.1002/jmv.22128.
44. da Silveira AA, Cardoso LP, Francisco RB, et al. HIV Type 1 Molecular Epidemiology in pol and gp41 Genes Among Naive Patients from Mato Grosso do Sul State, Central Western Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 201. [Epub ahead of print]

Table 1: Main social-demographic and clinical characteristics of pregnant women from Goiás State central western, Brazil (n=172).

Variable	n	%
Age (years)		
Median (range; sd)	26 (15 – 41, 5.7)	
Origin		
Goiania (capital) and metropolitan area	76	44.2
Interior of Goiás State	89	51.7
Other states	07	4.1
Formal education^a		
Illiterate	11	7.6
<8 years of formal education	65	44.8
≥8 years	69	47.6
Exposure		
Heterosexual transmission	172	100
Heterosexual + blood transfusion	16	9.3
Heterosexual+ IDU	2	1.2
Data of diagnosis		
1994-1999	15	8.7
2000-2007	56	32.6
2008-2010	101	58.7
Clinical status^b		
Asymptomatic	109	63.4
Symptomatic	53	30.8
CD4 cells/mm^{3c}	525 (82 – 1931; 305.8)	
Median (range)		
Plasma viral load (copies/mL)^d		
Median	10,978 (102)	-
Range	(405 - 750,000)	-
Undetectable	65	37.8

IDU: Intravenous Drug user; missing data: *a*=27; *b*=9, *c*=36, *d*=5.

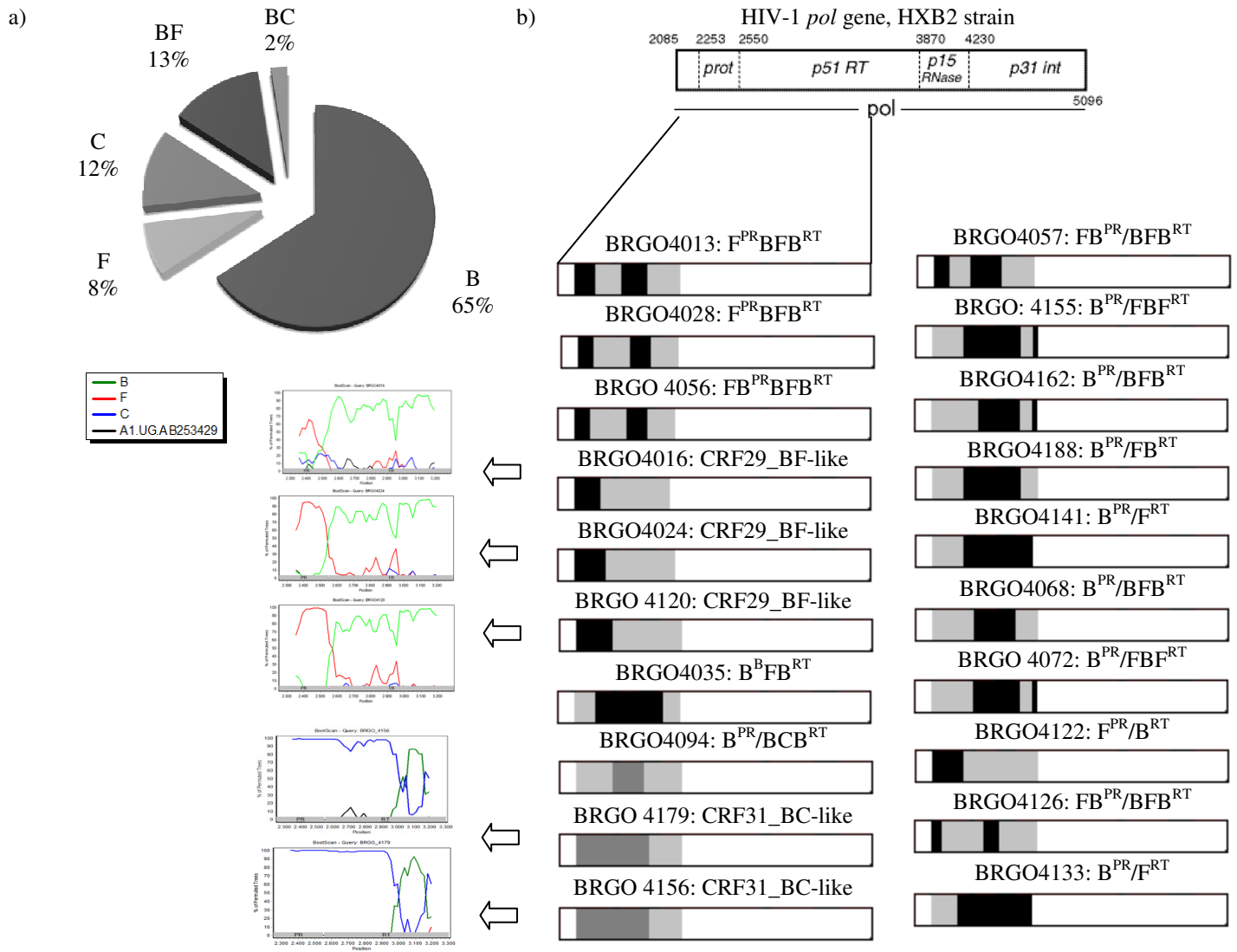


Figure 1: a) Prevalence of HIV-1 subtypes PR/RT among pregnant women from Goiás State/central western Brazil (n=131); b) Schematic drawing showing breakpoint map (according to HXB2 reference) of mosaics viruses found in the study. (n=20). Subtype B; Subtype F; Subtype C. Bootsclanning patterns corresponding to the CRFs29_BF-like (n=3) and CRFs31_BC-like (n=2) are showing in left.

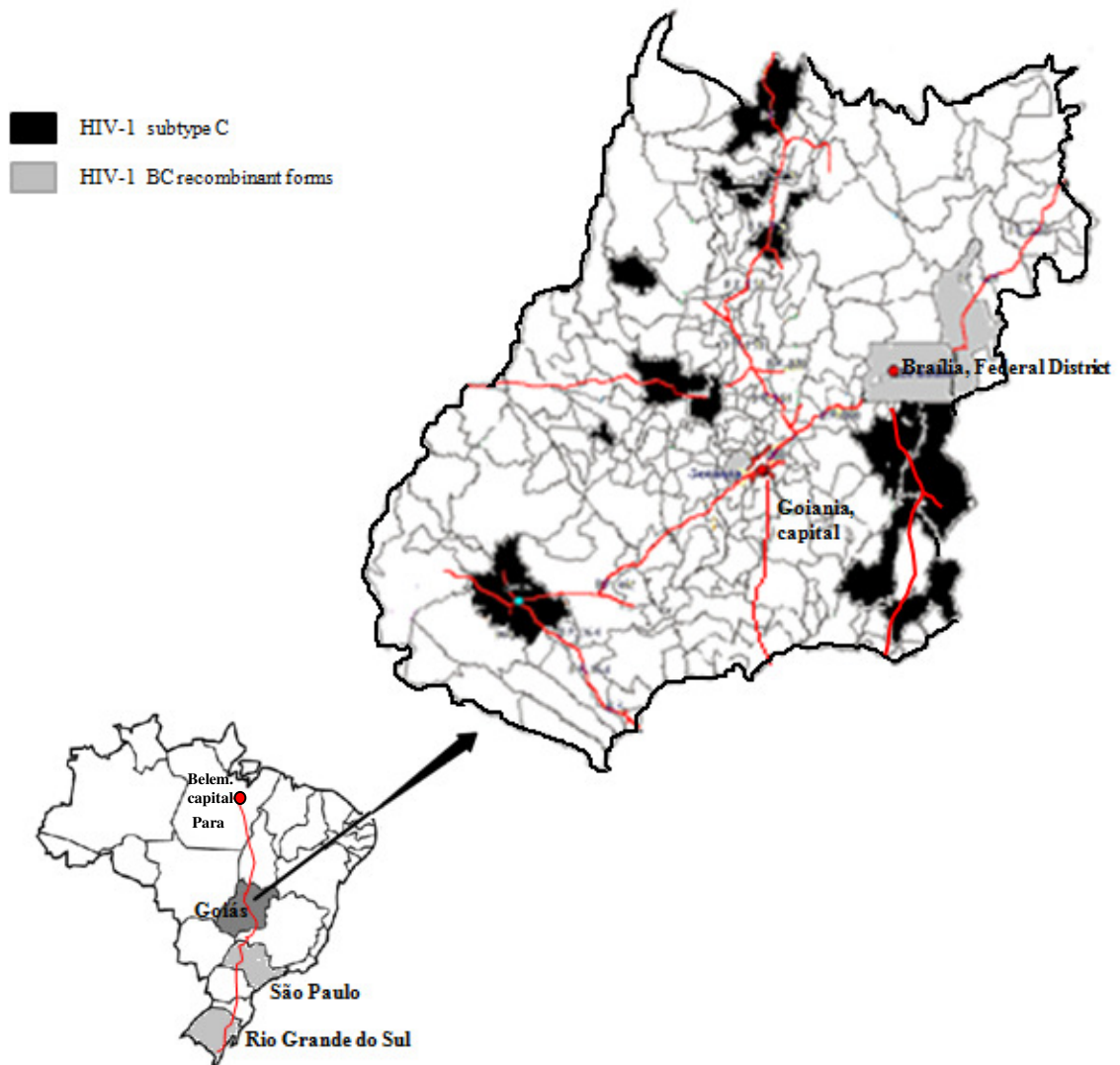


Figure 2: Molecular mapping of HIV-1 subtype C among pregnant women within interior cities from Goiás State and the main roads of national integration in Brazil (red lines).

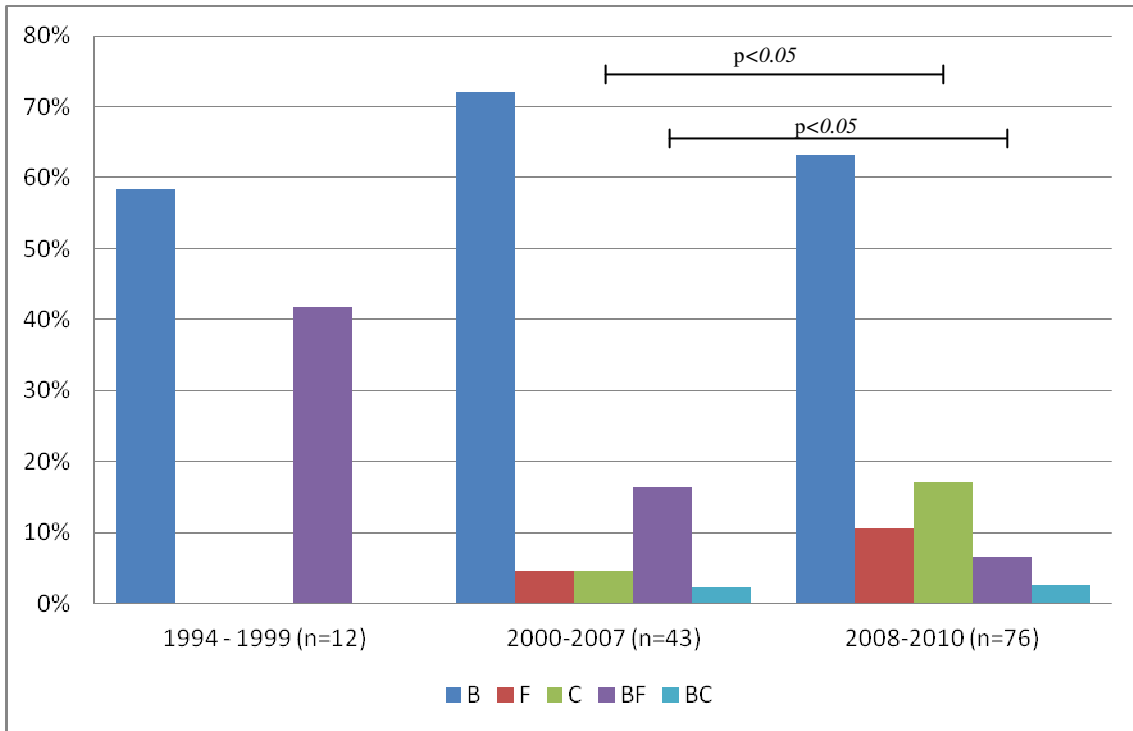


Figure 3: Temporal distribution of HIV-1 subtypes among infected pregnant women from Goiás State (n=131).

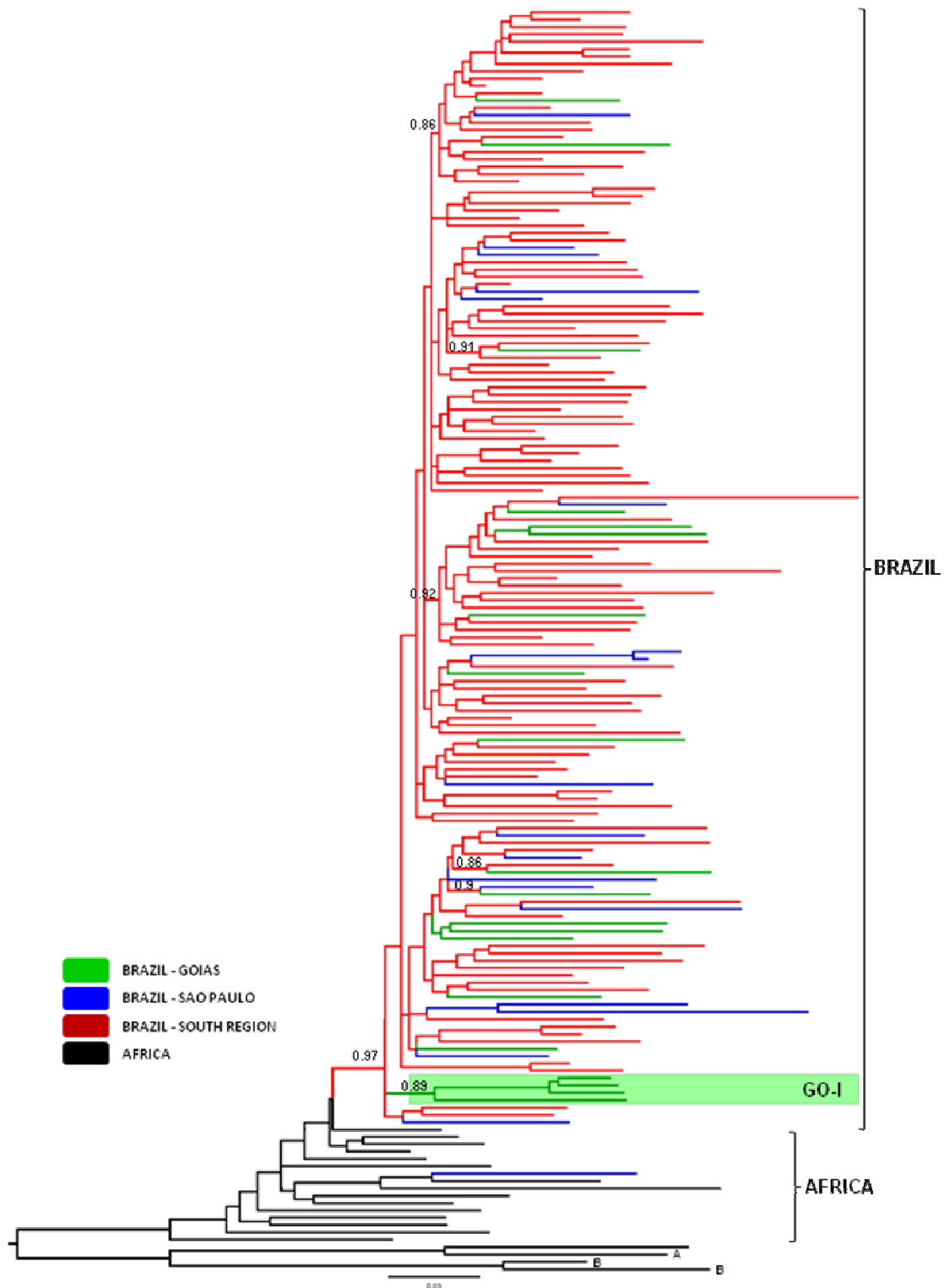


Figure 4. ML tree of the *pol* (PR/RT) gene of HIV-1 subtype C sequences circulating in Brazil. The color of a branch represents the geographic region from where the subtype C strain originated, according to the legend given in the figure. Brackets indicate the monophyletic clade formed by subtype C sequences sampled from Brazil, and the position of subtype C sequences of African origin. Boxes highlight the three sub-clusters composed by two or more subtype C sequences from Goias. The aLTR support values are indicated only at key nodes. Horizontal branch lengths are drawn to scale with the bar at the bottom indicating 0.05 nucleotide substitutions per site. The tree was rooted using HIV-1 subtype A and B reference sequences.

8. DISCUSSÃO

Os artigos apresentados nesta tese abordaram aspectos imunológicos, clínicos e moleculares e fatores associados à TMI em gestantes infectadas pelo HIV-1/filhos recrutados no Estado de Goiás. Duas coortes recrutadas em períodos distintos foram incluídas (2000/2001 e 2008-2010). A coorte prospectiva de pares de mães infectadas pelo HIV-1 e filhos expostos recrutada mais recentemente foi altamente representativa do total de gestantes infectadas pelo HIV-1 no Estado de Goiás avaliado naquele período. Esta alta representatividade foi conseguida mediante parceria com o programa estadual de assistência à saúde da gestante (“Programa de Proteção à Gestante”). A ampla cobertura deste programa em todo o Estado e a estratégia de recrutamento nos principais centros de referência permitiu incluir no estudo em torno de 80% do total de gestantes infectadas. Os resultados desta coorte 2008-2010 mostraram que o rastreamento sorológico durante o pré-natal representa uma janela de oportunidade imperdível para a obtenção do diagnóstico precoce do HIV-1 entre mulheres jovens bem como para a completa implementação das medidas profiláticas para a transmissão vertical do HIV-1. Nesta coorte analisamos gestantes infectadas pelo HIV-1 provenientes de mais de cinquenta municípios do interior do Estado de Goiás nos permitindo caracterizar o que está ocorrendo com a epidemia de aids no interior do Brasil em regiões distantes do epicentro da epidemia.

No período de recrutamento da primeira coorte utilizávamos a técnica de HMA no Laboratório de Imunologia da Aids e da Hanseníase/IPTSP/UFG quando foram realizados os estudos pioneiros sobre a epidemiologia molecular do HIV-1 no Centro-Oeste brasileiro. A técnica de HMA é uma técnica de triagem molecular que apresenta limitações para identificar recombinantes intersubtipos em regiões de grande diversidade genética do HIV-1. Entretanto, na nossa experiência com isolados de pacientes do Centro-Oeste, a subtipagem do HIV-1 pela técnica de HMA nas regiões *env* e *gag* identificou corretamente a presença de recombinantes intersubtipos BF1 como a segunda forma genética mais prevalente nesta região (Stefani et al. 2007), dados estes que foram confirmados por sequenciamento de *pol*. Além disso, estes estudos identificaram a presença esporádica dos subtipos F1 e C num contexto de predomínio do subtipo B. Nossos estudos utilizando a técnica de HMA descreveram marcante diversidade genética do HIV-1 entre gestantes HIV/aids de Goiânia (Stefani et al. 2000; Alcântara et al. 2009) refletindo o perfil molecular do HIV-1 observado em outras regiões do país. Desta forma, analisando retrospectivamente, a técnica de HMA

representou uma alternativa metodológica confiável que foi usada com sucesso antes de termos acesso a seqüenciador automatizado, semelhantemente ao que ocorreu em outros grupos de pesquisa do Brasil e em outros países em desenvolvimento (Morgado et al. 1998; Couto-Fernandez JC 1999; Heyndrickx et al. 2000; Gadelha et al. 2003; Monteiro et al. 2009).

A implantação do sequenciamento automatizado de genes/fragmentos gênicos do HIV-1 representou um importante avanço para o grupo de pesquisa do IPTSP/UFG uma vez que representa uma técnica mais acurada para estudar a diversidade genética e a presença de mutações associadas à resistência aos ARVs. A partir da aquisição do seqüenciador, treinamento em sequenciamento e análises e transferência de tecnologia para a UFG, sequências dos genes *pol* e *env* têm sido utilizadas para mapeamento de mutações de resistência e dos subtipos genéticos do HIV-1. As primeiras sequências de fragmentos do gene *pol* de pacientes do Centro-Oeste depositadas no GenBank (Cardoso & Stefani 2009, Cardoso et al. 2009, Cardoso et al. 2010) confirmaram a grande diversidade genética do HIV-1 em gestantes recrutadas mais recentemente entre 2008-2010. Portanto, ambas as metodologias utilizadas nos diferentes grupos de estudo identificaram a presença dos subtipos B, F1 e C e recombinantes principalmente BF1 em diferentes regiões genômicas do HIV-1 de gestantes do Estado de Goiás.

No nosso estudo a taxa de TMI foi de aproximadamente 2% nas duas coortes recrutadas em dois períodos distintos, representando um caso entre 41 crianças expostas da coorte 1 (2000-2001) e 3 casos entre 149 crianças expostas na coorte 2 (2008-2010). Um estudo multicêntrico retrospectivo nas 5 macro regiões do Brasil (20 estados e o Distrito Federal) estimou uma taxa de TMI de 8.6% no ano 2000 e 7.1% em 2001 (Succi et al. 2007). Estudo retrospectivo no Estado de São Paulo mostrou que a taxa de transmissão vertical do HIV-1 caiu de 16% em 1995 para 2.4% em 2002, concomitante com aumento de mais de 70% no uso de AZT intraparto (Matida et al. 2005). Outros estudos brasileiros, inclusive em nossa mesma região antes da implantação do Programa de Proteção à Gestante, mostraram taxas superiores à encontrada em nosso estudo (Senise 2006; Turchi et al 2007; Tornatore 2010; Gonçalves 2011) que está dentro da meta do governo brasileiro que é reduzir a transmissão vertical do HIV-1 para menos de 2% em todo país, até 2015. No geral, a taxa de TMI do HIV-1 no Brasil é de 6,8% e a região Centro-Oeste apresenta a menor taxa de transmissão vertical (~1,0%), superando, inclusive, as regiões mais industrializadas como o Sul e o Sudeste (http://www.aids.gov.br/noticia/2011/diminui_taxa_de_transmissao_vertical_do_virus_

da_aids). Como a principal medida para a redução das taxas de TMI é o diagnóstico precoce da infecção materna para que ocorra a introdução de medidas profiláticas que possibilitem o efetivo controle da infecção materna e a redução da TMI e sabendo que na região Centro-Oeste 98% das gestantes faz pelo menos uma consulta no pré-natal (http://www.aids.gov.br/noticia/2011/diminui_taxa_de_transmissao_vertical_do_virus_da_aids), acreditamos que o diferencial para o Estado Goiás no cenário na transmissão vertical do HIV-1 é o amplo e efetivo programa público de pré-natal. Este programa de proteção à gestante permite o diagnóstico da infecção pelo HIV-1 entre as gestantes e a introdução de medidas profiláticas adequadas para a TMI, reduzindo, com isso, os casos de TMI. O programa de proteção a gestante é um programa do governo estadual que tem dado certo e deve ser tomado como exemplo para as outras regiões do país.

O pequeno número de crianças infectadas pelo HIV-1 por transmissão vertical nestes estudos é uma limitação reconhecida e indica que no atual cenário brasileiro estudos multicêntricos são necessários para investigar os fatores de risco em um número representativo de casos de transmissão vertical. O diagnóstico materno tardio, a profilaxia parcial da TMI, parto vaginal e amamentação foram os principais aspectos associados com a TMI em nosso estudo. Embora nossa coorte tenha sido recrutada em uma área com alta cobertura no pré-natal e a taxa de TMI tenha sido abaixo da média nacional, a mesma ainda ficou acima da esperada e reportada para o Centro-Oeste. O que pode ter contribuído para a taxa de TMI ainda observada neste estudo é o fato de que as gestantes recém diagnosticadas, incluindo os três casos de TMI, iniciaram o pré-natal mais tardiamente do que aquelas com diagnóstico prévio à gestação. Conseqüentemente, as gestantes recém diagnosticadas não tiveram acesso/perderam a oportunidade de receberem o programa completo de profilaxia. A perda de oportunidade (definida como o momento no qual a prevenção para a transmissão do HIV-1 deveria ter ocorrido através da implementação de medidas efetivas já comprovadas) contribuiu para a transmissão vertical e o diagnóstico tardio é considerado um dos principais fatores associados à perda de oportunidade para a prevenção da TMI (Abrams 2007; Ginsburg 2007). Estudo multicêntrico realizado entre 2002 e 2007 na América Latina, incluindo o Brasil e Caribe, os quais oferecem profilaxia com ARVs e medidas alternativas para amamentação (leite em pó), estimou que a perda de oportunidade contribuiu com 62% dos casos de TMI (D'Ippolito et al. 2007). No Brasil, apesar da implementação da profilaxia para a TMI desde 1996, aproximadamente 20% das gestantes infectadas pelo HIV-1 perdem alguma oportunidade para a profilaxia completa (Souza Jr et al 2004;

Brasil 2010b). No Estado de Goiás, outro estudo anterior com pares de mães infectadas e filhos expostos mostrou redução de 97,5% do risco de TMI mediante completa profilaxia (Turchi et al. 2007). Assim, acreditamos que apesar da ampla cobertura pré-natal no Estado de Goiás, a perda de oportunidade para a completa implementação das medidas profiláticas para TMI possa estar contribuindo para que as taxas de transmissão permaneçam acima de 0,5% [taxa estimada de TMI em locais com acesso completo à profilaxia (D'Ippolito et al. 2007)].

A TMI do HIV-1 é considerada um evento multifatorial e os fatores que determinam a transmissão são apenas parcialmente conhecidos. No entanto, fatores maternos como genética, carga viral, contagem de células T CD4⁺ e bolsa rota superior a 4 horas têm sido fortemente associados com o aumento do risco de transmissão. A alta viremia materna no parto tem sido considerada o principal fator de risco para a TMI. O curto período de exposição ao HAART durante a gestação está associado com a alta viremia no momento do parto e aumenta o risco para a TMI do HIV-1 (Warszawski et al. 2008). No entanto, alguns estudos mostram que a TMI do HIV-1 pode ocorrer mesmo no contexto de baixa viremia e ausência de aleitamento materno (European collaborative study 2010). Este tipo de TMI pode ocorrer devido a um risco residual atribuído a viremia materna ao longo da gestação e não no momento do parto (Tubiana et al. 2010). Em nosso estudo dois casos de TMI ocorreram entre mães com carga viral < 1000 cópias/mL indicando que outros fatores desempenharam papel importante na transmissão do HIV-1.

Outro fator que contribui para TMI do HIV-1 é a infecção do neonato por vírus com mutações associadas à resistência aos ARVs (Henry et al. 2008). Para as pacientes da coorte 2, foi investigada a presença de mutações de resistência. Uma entre 17 pacientes *naive* apresentou mutação de resistência transmitida a PI (M46L). Em estudo anterior, realizado na mesma região com gestantes recrutadas em 2003, não foi observada a presença de mutações de resistência transmitida (Cardoso et al. 2010). Entretanto, estudos recentes têm mostrado aumento na prevalência de resistência primária no Brasil (Sucupira et al. 2007; Eyer-Silva et al. 2008; Cardoso et al. 2009) que é compatível com o alto nível de exposição aos ARVs. É interessante mencionar que a mutação encontrada nesta paciente costuma ser menos freqüente do que as mutações para os inibidores da TR, devido a alta barreira genética e a introdução mais recente dessa classe de ARV no Brasil (Wu et al. 2003). Esta mutação pode comprometer a eficácia da profilaxia ARV composta por uma IP e dois NRTIs. O

impacto de mutações de resistência transmitida em pacientes virgens de tratamento, em tratamento ou futura profilaxia merece ser avaliado.

Aproximadamente 10% das gestantes da coorte 2 submetidas a profilaxia ou que estavam em tratamento apresentaram mutações de resistência secundária. A mutação mais prevalente foi a M184V para NRTI e esta mutação é responsável pela resistência ao 3TC e aumenta a suscetibilidade ao AZT/d4T (Clarke et al. 1999; Mandelbrot et al. 2001). Outra mutação observada foi a T215Y que remove o AZT e d4T já incorporado à cadeia de DNA na presença da M184V. Neste caso, poderia ter ocorrido comprometimento da profilaxia, uma vez que o AZT faz parte do protocolo de profilaxia da TMI. Além disso, uma paciente sob HAART tinha mutações de resistência análogas à timidina (TAMs) nos códons 67, 70 e 215. O acúmulo das TAMs pode levar a resistência cruzada entre os NRTIs representando um obstáculo significativo para as terapias de resgate ou profilaxia (Clavel & Hance 2004). Neste estudo nenhuma das mães transmissoras do HIV-1 (coorte 2) apresentou vírus com mutação de resistência. No entanto, é importante notar que a técnica de sequenciamento que sequencia população viral total só detecta populações virais que representam pelo menos 20% da população viral. Portanto, não podemos excluir a possibilidade da presença de mutações de resistência em populações virais minoritárias (Metzner et al. 2009).

No geral, nossos resultados indicam que apesar da alta cobertura do pré-natal em Goiás é necessário aprimorar os meios para o diagnóstico precoce e completa implementação das medidas preventivas. Uma estratégia mais efetiva para o diagnóstico precoce é requerida para alcançar a meta de carga viral indetectável o mais precocemente possível durante a gestação. Uma estratégia efetiva deveria ser a garantia da sorologia anti-HIV-1 para toda mulher, pelo menos uma vez ao ano durante a consulta ginecológica, enfatizando, inclusive a importância do teste para as adolescentes. No entanto, é importante salientar que mesmo alcançando a meta da completa implementação das medidas profiláticas, a realização dos testes de resistência para as gestantes, principalmente, aquelas que estão sob HAART seria de grande importância para otimizar o regime profilático e com isso, reduzir as chances de TMI.

O diagnóstico de transmissão vertical por sorologia requer o acompanhamento das crianças expostas e não infectadas até a sororreversão, que pode levar até 24 meses. Os vários fatores que influenciam o tempo para a negatificação da sorologia devido aos anticorpos adquiridos por via transplacentária incluem os níveis de anticorpos maternos,

eficiência de transferência placentária e a taxa de catabolismo dos anticorpos após o nascimento (Scott et al. 2007). Entretanto os fatores determinantes para a sororreversão não foram ainda totalmente elucidados. No nosso estudo com a coorte recrutada entre 2000-2001 observamos menor tempo para sororreversão (13 meses) entre as crianças nascidas de mães sintomáticas com baixa contagem de células CD4⁺ e este tempo variou entre 9-16 meses (Alcântara et al, 2009). Para a coorte avaliada entre 2008 e 2010, a viremia materna, a condição clínica, o peso do neonato e a idade gestacional não influenciaram no tempo de sororreversão. Porém, observamos um caso de sororreversão com 1 mês de idade em criança exposta não infectada filha de mãe sintomática. A alta carga viral materna pode influenciar a baixa produção ou baixa transferência de anticorpos maternos de gestantes HIV/aids para filhos, mas os determinantes da transferência placentária ou de produção de anticorpos reduzida entre mulheres HIV/aids não são ainda conhecidos (Farquhar et al. 2005; Scott et al. 2007). Mais recentemente o acompanhamento da sororreversão das crianças expostas ao HIV-1 e não infectadas tem sido dificultado após a exclusão de transmissão vertical confirmada pelo segundo resultado negativo do teste molecular. Após o diagnóstico de ausência de transmissão vertical as mães se sentem desmotivadas e não comparecem para fazer o acompanhamento sorológico prolongado até a sororreversão. Por isso, neste estudo, menos da metade das crianças expostas ao HIV-1 e não infectadas foram acompanhadas até a sororreversão não nos permitindo avaliar numa amostra mais significativa o impacto da imunossupressão materna que compromete a resposta imune humoral e celular, com o tempo para sororreversão. Não podemos excluir a possibilidade de que outros fatores maternos e neonatais também contribuam para um menor tempo para a sororreversão.

Na coorte recrutada entre 2008-2010 identificamos uma proporção mais alta de HIV-1 subtipo C entre gestantes recém-diagnosticadas e provavelmente mais recentemente infectadas. A tendência de aumento do subtipo C na categoria heterossexual mostra uma possível mudança temporal na epidemiologia molecular do HIV-1 no Centro-Oeste brasileiro. A presença do subtipo C na região Centro-Oeste foi primeiramente descrita em 2000 em uma gestante com vínculo epidemiológico com a região Sul (Stefani et al. 2000). Outros estudos prévios em pacientes infectados pelo HIV-1 incluindo gestantes de Goiás mostraram desde ausência do subtipo C como uma baixa proporção variando de 1-3,9% (Stefani et al. 2007; Cardoso et Stefani 2009; Cardoso et al. 2010). Esta proporção é semelhante a encontrada entre as gestantes de

nossa coorte diagnosticadas na década de 90 até 2007 (4,8%). No entanto, entre as gestantes diagnosticadas entre 2008 e 2010, a proporção do subtipo C e formas recombinantes BC foi significativamente maior (~15%) e os mosaicos BF mostraram significativa redução das proporções entre as pacientes diagnosticadas na década de 90 (41.7%) e aquelas diagnosticadas entre 2008 e 2010 (6,6%). Estes resultados refletem a história da epidemia no Brasil fundada pelo subtipo B (1960) que, posteriormente, com a entrada do subtipo F1 (1970), proporcionou eventos de recombinação e o surgimento dos mosaicos BF1 (Salemi et al. 2005; Bello et al. 2006). Inicialmente, houve crescimento exponencial destes subtipos em uma rede de transmissão preferencialmente homossexual e entre UDI. Com a introdução do subtipo C no sul do país no início dos anos 80 (Bello et al. 2008), o surgimento do CRF31_BC estimado para a mesma década (Passaes et al. 2009_a) e a heterossexualização da epidemia, a expansão do subtipo C e dos mosaicos BC parece ter ganhado força em detrimento de uma rede de transmissão favorável (Bello et al. 2006).

Um estudo recente mostrou uma diminuição da taxa de expansão do subtipo C e do CRF31_BC no sul do país (Bello et al. 2009) onde a epidemia já era estabelecida e dominada pelo Subtipo C. Podemos dizer que em nossa região vem ocorrendo a diminuição da expansão do subtipo B e aumento da expansão do subtipo C no interior da região Centro-Oeste onde ainda não havia uma epidemia estabelecida e dominada por um determinado subtipo. Assim, o subtipo C encontra rota de transmissão favorável e pode estabelecer nas regiões ainda “virgens” da infecção e gerar naquela região o que conhecemos como o efeito fundador.

Recentemente nosso grupo de pesquisa descreveu a circulação do subtipo C, em baixa prevalência, em pacientes do sexo masculino e feminino dos Estados do Centro-Oeste brasileiro: Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e no estado do Tocantins no Norte do país (Cardoso et al. 2009; Carvalho et al. 2011; Ferreira et al. 2011; da Silveira et al. 2011). A transmissão heterossexual referida pela totalidade das mulheres infectadas indica a necessidade de dados da epidemiologia molecular do HIV-1 entre pacientes do sexo masculino que referem categoria heterossexual e que moram na região. A maioria das gestantes investigadas ou não tem parceiro fixo ou é promíscua o que dificulta o estudo de seus parceiros transmissores. Interessante que entre todos estes estudos prévios, homens infectados com subtipo C representaram a minoria. No estudo de Goiás (Cardoso et al. 2009; Cardoso & Stefani 2009) um total de 4 casos de subtipo C foram identificados sendo apenas um em um homossexual, os demais foram

identificados em mulheres. No estudo realizado em Mato Grosso entre os 92 pacientes estudados, 5 apresentaram subtipo C sendo dois deles entre homens da categoria heterossexual (Ferreira et al. 2011). Nos estudos realizados em Mato Grosso do Sul, entre 69 isolados identificamos 6 casos de infecção por subtipo C, sendo dois deles entre presidiários masculinos (Cardoso et al. 2011; da Silveira et al. 2011). No entanto, nossos resultados nos permitem enfatizar a necessidade de investigar a diversidade genética do HIV-1 em homens heterossexuais e homens que fazem sexo com homens do interior do Estado de Goiás, ou seja, em vias de transmissão distintas para que possamos entender a origem e as possíveis rotas de transmissão do subtipo C nesta região.

Chama a atenção o fato de que as gestantes infectadas pelo subtipo C serem provenientes principalmente de cidades do interior e não da grande área metropolitana junto a capital Goiânia. Uma vez que o epicentro da epidemia pelo subtipo C no Brasil é a região Sul com disseminação mais recente na região Sudeste (Soares et al. 2005; Brígido et al. 2011) análises filogenéticas foram realizadas com o intuito de tentar entender a origem do subtipo C circulando no Centro-Oeste. Análises filogenéticas das sequências do nosso estudo mostraram que o subtipo C formou um grupo monofilético com amostras obtidas de pacientes da região Sul. Estes dados corroboram a teoria de que o subtipo C se disseminou no país a partir de uma única introdução com sucesso, ou a partir de um pequeno número de vírus geneticamente relacionados (Bello et al. 2008). No Estado de São Paulo foi descrita uma tendência de aumento do subtipo C em pacientes *naive* (Brígido et al. 2011). O Estado de São Paulo é mais próximo de Goiás e tem importante conexão sócio-econômica com Goiás, o que também parece contribuir para a disseminação do subtipo C no interior do Brasil.

A prevalência do subtipo C nos Estados do Sul, notadamente Rio Grande do Sul e Santa Catarina é alta e tem aumentado nos últimos anos (Soares et al. 2005, Diaz et al. 2009; Rodrigues et al. 2010). Estudos recentes em pacientes de Santa Catarina indicam uma alta prevalência do subtipo C (Brígido et al. 2007; Rodrigues et al. 2010; Graf et al. 2011). No nosso estudo a maioria das sequências subtipo C se associou com sequências da região Sul. Análises de filodinâmica comparativa mostraram que o subtipo C do HIV-1 no Brasil está se disseminando em uma taxa duas vezes mais rápida que o subtipo C do HIV-1 da África do Sul (Salemi et al. 2005). Estes dados sugerem diferença na eficiência de rotas de transmissão distintas na África do Sul e no Brasil. Não se sabe se o subtipo C do Brasil é uma cepa nova mais infecciosa ou se o vírus está

se disseminando mais rápido devido a uma rota de transmissão mais favorável. É de conhecimento que o subtipo C parecer ser menos patogênico e, conseqüentemente, leva a menor cronicidade. Com isso, o indivíduo permanece por mais tempo assintomático o que favorece a transmissão. De qualquer forma, nossos resultados mostrando expansão do subtipo C na categoria heterossexual no interior de Goiás alertam sobre o crescimento desta epidemia numa área geográfica previamente dominada pelo subtipo B.

O estado de Goiás representa uma nova fronteira agrícola que também atraiu imigrantes da região Sul do país. Entretanto, os casos de infecção pelo subtipo C identificados em gestantes do interior estavam distribuídos em municípios próximos ao Distrito Federal. Investigação sobre de epidemiologia molecular do HIV-1 no Distrito Federal não relatou a presença do subtipo C (Cerqueira et al. 2003; Vêras et al. 2007). O entorno do Distrito Federal é povoado principalmente por migrantes nordestinos e não sulistas. Ressaltamos aqui o fato de que uma gestante infectada pelo subtipo C foi identificada na pequena cidade de Israelândia, localizada no Noroeste goiano e contando com menos de 3000 habitantes. Uma hipótese coerente com a distribuição geográfica dos casos de subtipo C no interior de Goiás é a de múltiplas introduções a partir do sul e do sudeste por caminhoneiros infectados pelo subtipo C do HIV-1. Digno de nota é o fato de que as principais rodovias que cruzam o interior do Estado ligando o sul/sudeste rumo ao norte (BR153), nordeste (BR020) e Mato Grosso (BR070 e BR364) a oeste apresentam uma nítida sobreposição com a distribuição geográfica dos casos de subtipo C. Embora seja difícil comprovar a importância de rotas de migração/transporte na diversidade genética do HIV-1 nesta região devemos destacar a possibilidade de disseminação via sexo eventual com caminhoneiros infectados do sul. Esta hipótese é compatível com a baixa taxa de subtipo C na grande área metropolitana e entre homens da região. Se esta for a rota de disseminação relevante na região, a estratégia de estudo da diversidade genética em homens será outra e deverá priorizar os caminhoneiros em detrimento dos homens que habitam a região.

Chama a atenção também a alta proporção de vírus mosaicos entre gestantes sendo a maioria BF1 na maior parte oriunda de gestantes do interior do estado e os casos de recombinantes BC descritos em cidades do interior do Estado. Recentemente na epidemia brasileira tem sido registrado um aumento na prevalência dos recombinantes intersubtipos (Passaes et a. 2009_b; Guimarães et al. 2010). Podemos especular que o aumento da prevalência do subtipo C em área dominada anteriormente

pelo subtipo B deverá favorecer o surgimento e expansão de recombinantes BC. Observamos diversos mosaicos apresentando diferentes padrões o que sugere eventos de recombinação independentes. Monitoramento da diversidade genética nos próximos anos poderá indicar se esta tendência de expansão do subtipo C está de fato ocorrendo na epidemia do Centro-Oeste brasileiro. Estudos de sequenciamento de genoma completo poderão indicar a presença de CRFs já descritas no Sul–Sudeste brasileiro ou de novas CRFs circulando no Centro-Oeste.

Assim, os resultados apresentados nesta tese de doutorado mostram a real situação da epidemia do HIV-1 entre as gestantes no interior do Estado de Goiás, centro-oeste brasileiro, mais de 20 anos depois do início da epidemia no país. A alta representatividade do nosso grupo de estudo em relação ao total de gestantes infectadas pelo HIV-1 no Estado reforça como é importante o programa de rastreamento sorológico no pré-natal e que, como já mencionado, deveria ser implantado em todas as regiões do país. Apesar de funcionar bem, infelizmente, a maioria das gestantes ainda tem a elucidação diagnóstica no final da gestação impedindo a completa profilaxia da TMI. Baseando-nos nestes fatos, percebemos a real necessidade de campanhas para o diagnóstico do HIV-1 em mulheres antes mesmo da concepção, para que tenham a chance de ter uma gestação consciente de seu estado sorológico e lhes seja assegurado o direito à completa profilaxia.

Além do diagnóstico “tardio”, o fato de nossos resultados terem demonstrado a presença de resistência entre as gestantes, inclusive adolescentes, reforça que a vertente de um teste de genotipagem preconizado pelo Ministério da Saúde apenas após três meses do início da profilaxia para mulheres com viremia ainda detectável durante a gestação parece inviável. Por estes motivos e pelo fato das elevadas taxas de resistência secundária, uma vez que o Brasil oferece o acesso aos ARV a todo paciente com aids e mulheres grávidas praticamente desde o início da epidemia, nos parece pertinente que o Brasil ofereça o teste de genotipagem para todos antes do início da TARV. O custo-benefício pode ser interessante já que a terapia seria adequada desde o princípio, diminuindo com isso os custos com internações e medicamentos para aqueles pacientes em falha terapêutica.

Os resultados do presente estudo indicam múltiplas introduções e a disseminação do subtipo C na categoria heterossexual e sua interiorização no Brasil, desde sua introdução no Sul provavelmente na década de 90. A disseminação do subtipo

C do HIV-1 em cidades do interior do Estado de Goiás permite ao ministério da Saúde visualizar como a epidemia da aids avança em nosso país, ampliando o campo de observação além dos grandes centros metropolitanos. A hipótese lançada da disseminação do subtipo C em mulheres via caminhoneiros infectados provindos do Sul do país mostra um grupo de comportamento de risco interessante para a intervenção em campanhas educativas. Além disso, este potencial avanço da epidemia pelo subtipo C no interior do Brasil deve ser considerado em campanhas educativas e de vacinação. No Brasil, esta tendência deve ser monitorada para definir estratégias de prevenção mais eficazes contra o avanço deste subtipo que predomina em escala global. Neste contexto, estudos regionais de vigilância epidemiológica e da diversidade genética do HIV-1 são importantes ferramentas para o monitoramento do comportamento da epidemia causada por diferentes subtipos.

Enfim, este estudo da epidemiologia molecular do HIV-1 em gestantes no Centro-Oeste brasileiro com certeza contribuirá para a tomada de decisões por parte do ministério da saúde para se repensar as políticas de diagnóstico e prevenção em áreas distantes dos grandes centros metropolitanos.

9. CONCLUSÕES e RECOMENDAÇÕES

- ✓ O pré-natal representou janela de oportunidade única para o diagnóstico precoce e intervenção profilática contra TMI do HIV-1. Entretanto os casos de TMI refletiram perdas de oportunidade de prevenção e indicam que estratégias mais agressivas devem ser usadas para o pré-natal e diagnóstico precoces.
- ✓ A presença de adolescentes com AIDS e múltiparas indica comprometimento imunológico e necessidade de terapia antirretroviral precoces e a necessidade de campanhas educativas para esta faixa etária.
- ✓ A detecção de resistência aos ARVs (12%) entre as adolescentes pode comprometer a introdução de futuras medidas de tratamento e profilaxia para a TMI do vírus. **Acreditamos que o teste de genotipagem para resistência deve ser oferecido para toda gestante infectada pelo HIV-1 antes mesmo de iniciar a profilaxia.**
- ✓ A TMI ocorreu em 2,0% dos casos (n=4). A perda de oportunidade para implementação do protocolo completo da profilaxia esteve relacionada principalmente com o diagnóstico tardio da infecção pelo HIV-1 entre estas gestantes. **Assim, há necessidade da implantação de campanhas para que mulheres sejam diagnosticadas antes mesmo da gestação.**
- ✓ Observamos um aumento na prevalência do subtipo C identificado em gestantes do interior de Goiás indicando sua interiorização e disseminação pela via heterossexual.
- ✓ A origem do subtipo C do HIV-1 que está circulando em mulheres no interior do Estado de Goiás tem associação com a epidemia no Sul e Sudeste do Brasil, principalmente do sul.
- ✓ O subtipo C identificado no interior de Goiás é resultado de múltiplas introduções, não sendo possível traçar a rota de disseminação local deste subtipo na categoria heterossexual.
- ✓ As características desta coorte de gestantes de Goiás refletem as características atuais da epidemia no Brasil:
 - Heterossexualização: ~100% das gestantes relataram a transmissão heterossexual do HIV-1.
 - Juvenilização: a mediana de idade do grupo estudado foi de 26 anos e 15% eram adolescentes múltiparas.

- Pauperização: o grupo estudado apresentou baixa escolaridade e baixo nível sócio econômico.
- Interiorização: diagnóstico de infecção pelo HIV-1 em gestantes de pequenos municípios de Goiás (<3000 habitantes).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alcântara KC, Pereira GA, Albuquerque M, Stefani MM 2009. Seroreversion in children born to HIV-positive and AIDS mothers from Central West Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 103(6):620-6.

Abrams EJ, Weedon J, Bertolli J 2001. Aging cohort of perinatally human immunodeficiency virus-infected children in New York City. *Pediatr Infect Dis J.* 20:511-7.

Alkhatib G, Combadiere C, Broder CC, Feng Y, Kennedy PE, Murphy PM, Berger E.A 1996. CC CKR5: a RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1. *Science* 272(5270): 1955-1958.

Alter G, Martin MP, Teigen N, Carr WH, Suscovich TJ, Schneidewind A, Streeck H, Waring M, Meier A, Brander C, Lifson J D, Allen TM, Carrington M, Altfeld M 2007. Differential natural killer cell-mediated inhibition of HIV-1 replication based on distinct KIR/HLA subtypes. *J.Exp.Med.* 204: 3027-3036.

Alter G & Moody MA 2010. The humoral response to HIV-1: new insights, renewed focus. *J. Infect. Dis.* 202 Suppl 2:S315-S322.

Altfeld M, Fadda L, Frleta D, and Bhardwaj N 2011. DCs and NK cells: critical effectors in the immune response to HIV-1. *Nat.Rev.Immunol.* 11: 176-186.

Amaral E, Ssis-Gomes F, Milanez H, Cecatti JG, Vilela MM and Pinto E Silva JL 2007. Timely implementation of interventions to reduce vertical HIV transmission: a successful experience in Brazil. *Rev. Panam. Salud Publica* 21(6): 357-364.

Ancuta P, Autissier P, Wurcel A, Zaman T, Stone D and Gabuzda D 2006. CD16+ monocyte-derived macrophages activate resting T cells for HIV infection by producing CCR3 and CCR4 ligands. *J.Immunol.* 176: 5760-5771.

Arien KK, Verhasselt B 2008. HIV Nef: role in pathogenesis and viral fitness.

Curr.HIV.Res. 6: 200-208.

Autran B, Descours B, Vettand-Fenoel V and Rouzioux C 2011. Elite controllers as a model of functional cure. *Curr.Opin.HIV.AIDS* 6: 181-187.

Bailes E, Gao F, Bibollet-Ruche F, Courgnaud V, Peeters M, Marx PA, Hahn BH, Sharp PM 2003. Hybrid origin of SIV in chimpanzees. *Science* 300(5626): 1713.

Bailey JR, Lassen KG, Yang HC, Quinn TC, Ray SC, Blankson JN, Siliciano RF 2006. Neutralizing antibodies do not mediate suppression of human immunodeficiency virus type 1 in elite suppressors or selection of plasma virus variants in patients on highly active antiretroviral therapy. *J. Virol.* 80(10):4758-4770.

Baker JV, Peng G, Rapkin J, Abrams DI, Silverberg M J, MacArthur RD, Cavert WP, Henry WK, Neaton JD 2008. CD4+ count and risk of non-AIDS diseases following initial treatment for HIV infection. *AIDS* 22: 841-848.

Bangsberg DR, Perry S, Charlebois ED, Clark R A, Roberston M, Zolopa AR, Moss A 2001. Non-adherence to highly active antiretroviral therapy predicts progression to AIDS. *AIDS* 15(9): 1181-1183.

Barbour JD, Sriram U, Caillier SJ, Levy JA, Hecht FM and Oksenberg JR 2007. Synergy or independence? Deciphering the interaction of HLA Class I and NK cell KIR alleles in early HIV-1 disease progression. *PLoS.Pathog.* 3: e43.

Barre-Sinoussi F 1996. HIV as the cause of AIDS. *Lancet* 348(9019): 31-35.

Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, Dauguet C, xler-Blin C, Vezinet-Brun F, Rouzioux C, Rozenbaum W and Montagnier L 1983. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 220(4599): 868-871.

Bartlett JG and Moore R 1999. A comprehensive plan for managed care of patients infected with human immunodeficiency virus. *Clin. Infect. Dis.* 29(1):50-55.

Bassichetto KC, Bergamaschi DP, Oliveira SM, Deienno MC, Bortolato R, de Rezende HV, Arthur T 2008. Elevated risk for HIV-1 infection in adolescents and young adults in Sao Paulo, Brazil. *PLoS. One.* 3(1):e1423.

Bassols AMS, De Boni R, Pechansky F 2010. Alcohol, drugs, and risky sexual behavior are related to HIV infection in female adolescents. *Rev Bras de Psiquiatria* 2010 32(4): 361-368.

Battegay M, Nuesch R, Hirschel B, Kaufmann GR 2006. Immunological recovery and antiretroviral therapy in HIV-1 infection. *Lancet Infect.Dis.* 6: 280-287.

Bauer GR, Colgrove RC, LaRussa PS, Pitt J, Welles SL 2006. Antiretroviral resistance in viral isolates from HIV-1-transmitting mothers and their infants. *AIDS* 20(13): 1707-1712.

Bebenek K, Abbotts J, Roberts JD, Wilson SH, Kunkel TA. 1989. Specificity and mechanism of error-prone replication by human immunodeficiency virus-1 reverse transcriptase. *J. Biol. Chem.* 264(28): 16948-16956.

Beignon AS, McKenna K, Skoberne M, Manches O, DaSilva I, Kavanagh DG, Larsson M, Gorelick RJ, Lifson JD, Bhardwaj N. 2005. Endocytosis of HIV-1 activates plasmacytoid dendritic cells via Toll-like receptor-viral RNA interactions. *J.Clin.Invest* 115: 3265-3275.

Bello G, Guimarães ML, Morgado MG. 2006. Evolutionary history of HIV-1 subtype B and F infections in Brazil. *AIDS.* 20(5):763-8.

Bello G, Passaes CP, Guimaraes ML, Lorete RS, Matos Almeida SE, Medeiros R M, Alencastro PR, Morgado MG 2008. Origin and evolutionary history of HIV-1 subtype C in Brazil. *AIDS* 22(15): 1993-2000.

Bello G, Guimarães ML, Passaes CP, Matos Almeida SE, Veloso VG, Morgado MG. 2009. Short communication: Evidences of recent decline in the expansion rate of the HIV type 1 subtype C and CRF31_BC epidemics in southern Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 25(11):1065-9.

Benlahrech A, Gotch F, Kelleher P, Patterson S. 2011. Loss of NK Stimulatory Capacity by Plasmacytoid and Monocyte-Derived DC but Not Myeloid DC in HIV-1 Infected Patients. *Plos one* 6(3): 1-11.

Bennett RP, Diner E, Sowden MP, Lees JA, Wedekind JE, Smith HC. 2006. APOBEC-1 and AID are nucleo-cytoplasmic trafficking proteins but APOBEC3G cannot traffic. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 350: 214-219.

Bergamaschi A, David A, Le RE, Nisole S, Barre-Sinoussi, F, Pancino G. 2009. The CDK inhibitor p21Cip1/WAF1 is induced by FcγR activation and restricts the replication of human immunodeficiency virus type 1 and related primate lentiviruses in human macrophages. *J.Virol.* 83: 12253-12265.

Blanchard A, Montagnier L, Gougeon ML 1997. Influence of microbial infections on the progression of HIV disease. *Trends Microbiol.* 5(8): 326-331.

Bonaparte MI, Barker E 2003. Inability of natural killer cells to destroy autologous HIV-infected T lymphocytes. *AIDS* 17: 487-494.

Bongertz, V 2001. Vertical human immunodeficiency virus type 1 – HIV-1 – transmission – A review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 96(1): 1-14.

Bosire R, Guthrie BL, Lohman-Payne B, Mabuka J, Majiwa M, Wariua G, Mbori-Ngacha D, Richardson B, John-Stewart G, Farquhar C 2007. Longitudinal comparison of chemokines in breastmilk early postpartum among HIV-1-infected and uninfected Kenyan women. *Breastfeed Med.* 2: 129-138.

Brackenridge S, Evans EJ, Toebes M, Goonetilleke N, Liu MK, di GK, Schumacher TN 2011. An Early HIV Mutation within an HLA-B*57-Restricted T Cell Epitope Abrogates Binding to the Killer Inhibitory Receptor 3DL1. *J. Virol.* 85(11):5415-5422.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretária de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de DST e Aids. [Base de dados na internet]. Recomendações para Terapia Anti-retroviral em Adultos Infectados pelo HIV. [Citado em 31/05/2011]. Disponível em:

http://www.aids.gov.br/sites/default/files/consensoAdulto005c_2008montado.pdf

Brasil. Ministério da Saúde. Departamento Nacional de DST, Aids e Hepatites Virais. [base de dados na internet]. Boletim Epidemiológico Aids e DST – Ano VI, nº1. 2009. [Citado em 31/05/2011]. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/publicacao/boletim-epidemiologico-aids-2009>

Brasil. Ministério da Saúde. Departamento Nacional de DST, Aids e Hepatites Virais. [base de dados na internet]. Boletim Epidemiológico Aids e DST – Ano VII, nº1. 2010a. [citado em 30/09/2011]. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/publicacao/boletim-epidemiologico-2010>

Brasil. Ministério da Saúde. Departamento Nacional de DST, Aids e Hepatites Virais. [base de dados na internet]. Recomendações para Profilaxia da transmissão vertical do HIV e terapia antirretroviral em gestantes. Guia de Tratamento, série manuais nº46. 2010b. [citado em 31/05/2011]. Disponível em: http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/recomendacoes_profilaxia_hiv_antiretroviral_gestantes.pdf

Brenchley JM, Price DA, Schacker TW, Asher TE, Silvestri G, Rao S, Kazzaz Z, Bornstein E, Lambotte O, Altmann D, Blazar BR, Rodriguez B, Teixeira-Johnson L, Landay A, Martin JN, Hecht FM, Picker LJ, Lederman MM, Deeks SG, Douek DC 2006. Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nat.Med.* 12: 1365-1371.

Brenchley JM, Schacker TW, Ruff LE, Price DA, Taylor JH, Beilman GJ, Nguyen PL 2004. CD4+ T cell depletion during all stages of HIV disease occurs predominantly in the gastrointestinal tract. *J. Exp. Med.* 200, no. 6:749-759.

Brigido LFM; Ferreira JLP; Almeida VC; Rocha SQ, Ragazzo TG; Estevan DL; Rodrigues R for the São Paulo HIV-1 Salvage Group. 2011. Southern Brazil HIV type 1 C expansion into the state of São Paulo, Brazil. *Aids Res Hum Retroviruses*; 27 (3): 339-344.

Brindeiro RM, Diaz RS, Sabino EC, Morgado MG, Pires IL, Brigido L, Dantas MC

2003. Brazilian Network for HIV Drug Resistance Surveillance (HIV-BResNet): a survey of chronically infected individuals. *AIDS* 17(7):1063-1069.

Bryson YJ, Luzuriaga K, Sullivan JL, Wara DW 1992. Proposed definitions for in utero versus intrapartum transmission of HIV-1. *N. Engl. J. Med.* 327 (17):1246-1247.

Bukrinsky MI, Sharova N, Dempsey MP, Stanwick TL, Bukrinskaya AG, Haggerty, S, Stevenson M 1992. Active nuclear import of human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 89(14): 6580-6584.

Burns DN, Mofenson LM 1999. Paediatric HIV-1 infection. *Lancet* 354 Suppl 2, SIII-SII6.

Burton DR, Stanfield RL, Wilson IA 2005. Antibody vs. HIV in a clash of evolutionary titans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 102(42):14943-14948.

Cao H, Walker BD. 2000. Immunopathogenesis of HIV-1 infection. *Clin. Dermatol.* 18(4): 401-410.

Cardoso LP, Pereira GA, Viegas AA, Schmaltz LE, Stefani MM 2010. HIV-1 primary and secondary antiretroviral drug resistance and genetic diversity among pregnant women from central Brazil. *J. Med. Virol.* 82(3): 351-357.

Cardoso LP, Queiroz BB, Stefani MM 2009. HIV-1 *pol* phylogenetic diversity and antiretroviral resistance mutations in treatment naive patients from Central West Brazil. *J. Clin. Virol.* 46(2): 134-139.

Carter CC, Onafuwa-Nuga A, McNamara LA, Riddell J, Bixby D, Savona MR, Collins KL 2010. HIV-1 infects multipotent progenitor cells causing cell death and establishing latent cellular reservoirs. *Nat.Med.* 16: 446-451.

Carvalho BC, Cardoso LP, Damasceno S, Stefani MM 2011. Moderate Prevalence of Transmitted Drug Resistance and Interiorization of HIV Type 1 Subtype C in the Inland North State of Tocantins, Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2011 Apr 27.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention 1987. Classification system for human immunodeficiency virus (HIV) infection in children under 13 years of age. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.*36;225-230: 235-236

CDC. Centers for Disease Control and Prevention 1994. Revised classification system for human immunodeficiency virus (HIV) infection in children under 13 years of age. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.*43:1-10.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention 2008a. [série na internet]. AIDS defining conditions. [citado em 28/12/2010]; 57(RR10); Disponível em: <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/rr5710a2.htm>

CDC. Centers for Disease Control and Prevention 2008b. [série na internet]. Comparison of the Revised World Health Organization and CDC Surveillance Case Definitions and Staging Systems for HIV Infection. [citado em 28/12/2010]; 57(RR10); 10-11. Disponível em: <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/rr5710a3.htm>.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention 2008c. Enhanced perinatal surveillance—participating areas in the united states and dependent areas, 2000-2003. *HIV/AIDS Surveillance Suppl Rep.*;13:1–35.

Chen H, Li C, Huang J, Cung T, Seiss K, Beamon J, Carrington MF, Porter LC, Burke PS, Yang Y, Ryan BJ, Liu R, Weiss RH, Pereyra F, Cress WD, Brass AL, Rosenberg ES, Walker BD, Yu XG, Lichtenfeld M 2011. CD4+ T cells from elite controllers resist HIV-1 infection by selective upregulation of p21. *J.Clin.Invest* 121: 1549-1560.

Chersich MF, Urban MF, Venter FW, Wessels T, Krause A, Gray GE, Luchters S, Viljoen DL 2006. Efavirenz use during pregnancy and for women of child-bearing potential. *AIDS Res. Ther.* 3: 11.

Clarke JR, Braganza R, Mirza A, Stainsby C, Ait-Khaled M, Wright A, Lyall H, Parker D, McClure MO, Weber JN, Taylor GP 1999. Rapid development of genotypic resistance to lamivudine when combined with zidovudine in pregnancy. *J Med Virol.* 59:364–368.

Clumeck N, Sonnet J, Taelman H, Mascart-Lemone F, De BM, Vandepierre P, Dasnoy J,

Marcelis L, Lamy M, Jonas C, 1984. Acquired immunodeficiency syndrome in African patients. *N. Engl. J. Med.* 310(8):492-497.

Coffin J, Haase A, Levy JA, Montagnier L, Oroszlan S, Teich N, Temin H, Toyoshima K, Varmus H, Vogt P 1986. What to call the AIDS virus? *Nature* 321: 10.

Coiras M, Lopez-Huertas MR, Perez-Olmeda M, Alcamí J 2009. Understanding HIV-1 latency provides clues for the eradication of long-term reservoirs. *Nat.Rev.Microbiol.* 7: 798-812.

Connor EM, Sperling RS, Gelber R, Kiselev P, Scott G, O'Sullivan MJ, VanDyke R., Bey M, Shearer W, Jacobson R, Jimenez E, Coombs R, Elkins M, Moya J, Stratton P & Balsley J 1994. Reduction of maternal-infant transmission of human immunodeficiency virus type 1 with zidovudine treatment. *N Engl J Med* ; 331:1173-1180.

Connor RI, Ho DD 1992. Etiology of AIDS: biology of human retroviruses. In: Devita VT. editor. AIDS etiology, diagnosis, treatment and prevention. Philadelphia: J.B. Lippincott Company p.13-85.

Cooper DA, Merigan TC 1996. Clinical treatment. *AIDS* 10 Suppl A, S133-S134.

Cooper ER, Charurat M, Mofenson L, Hanson IC, Pitt J, Diaz C, Hayani K 2002. Combination antiretroviral strategies for the treatment of pregnant HIV-1-infected women and prevention of perinatal HIV-1 transmission. *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr.* 29(5):484-494.

Coovadia H 2009. Current issues in prevention of mother-to-child transmission of HIV-1. *Curr. Opin. HIV. AIDS* (4):319-324.

Costa NM, Albuquerque MD, Lins JB, Alvares-Junior JT, Stefani MM 2011. [Resposta de testes de hipersensibilidade tardia utilizando PPD e outros antígenos em crianças e adolescentes saudáveis e infectados pelo HIV-1 e vacinados com BCG.]. *Rev Soc Bras Med Trop.* Aug 26. pii: S0037-86822011005000054.

Costa ZB, Machado GC, Avelino MM, Gomes FC, do Filho JV, Minuzzi AL, Turchi

MD, Stefani MM, de Souza WV, Martelli CM 2009. Prevalence and risk factors for Hepatitis C and HIV-1 infections among pregnant women in Central Brazil. *BMC. Infect. Dis.* 9: 116.

Couto-Fernandez JC, Morgado MG, Bongertz V, Tanuri A, Andrade T, Brites C, Galvão-Castro B. 1999. HIV-1 subtyping in Salvador, Bahia, Brazil: a city with African sociodemographic characteristics. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 22(3):288-93

Covington DL, Conner SD, Doi PA, Swinson J, Daniels EM. 2004. Risk of birth defects associated with nelfinavir exposure during pregnancy. *Obstet. Gynecol.* 103(6): 1181-1189.

Cruz MLS, Cardoso CA, João EC, Gomes IM, Abreu TF, Oliveira RH, Machado ES, Dias IR, Rubini NM, Succi RM 2010. Pregnancy in HIV vertically infected adolescents and young women: a new generation of HIV-exposed infants. *AIDS* 24:1-5

da Silveira AA, Cardoso LP, Francisco RB, de Araújo Stefani MM. 2011. HIV Type 1 Molecular Epidemiology in pol and gp41 Genes Among Naive Patients from Mato Grosso do Sul State, Central Western Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses.* Jul 26. [Epub ahead of print]

de Bethune MP 2010. Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs), their discovery, development, and use in the treatment of HIV-1 infection: a review of the last 20 years (1989-2009). *Antiviral Res.* 85(1): 75-90.

de Clercq E 2009. The history of antiretrovirals: key discoveries over the past 25 years. *Rev. Med. Virol.* 19(5): 287-299.

de Macedo Brigido, LF 2009. On the origin of South America HIV-1 C epidemic. *AIDS* 23(4): 543-544.

de Maria A, Fogli M, Costa P, Murdaca G, Puppo F, Mavilio D, Moretta A, Moretta L 2003. The impaired NK cell cytolytic function in viremic HIV-1 infection is associated with a reduced surface expression of natural cytotoxicity receptors (NKp46, NKp30 and NKp44). *Eur.J.Immunol.* 33: 2410-2418.

de Sa Filho DJ, Sucupira MC, Caseiro MM, Sabino EC, Diaz RS, Janini LM 2006. Identification of two HIV type 1 circulating recombinant forms in Brazil. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 22(1): 1-13.

de Witte L, Bobardt M, Chatterji U, Degeest G, David G, Geijtenbeek TB, Gallay P 2007. Syndecan-3 is a dendritic cell-specific attachment receptor for HIV-1. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 104: 19464-19469.

Deeks SG and Walker BD 2007. Human immunodeficiency virus controllers: mechanisms of durable virus control in the absence of antiretroviral therapy. *Immunity*. 27: 406-416.

Detels R, Munoz A, McFarlane G, Kingsley LA, Margolick JB, Giorgi J, Schragel L K, Phair JP 1998. Effectiveness of potent antiretroviral therapy on time to AIDS and death in men with known HIV infection duration. Multicenter AIDS Cohort Study Investigators. *JAMA* 280(17): 1497-1503.

Diaz RS. *Prática hospitalar*. Ano IX. Nº 53. [Livro na internet]. 2007 [citado em 28/12/2010]. Disponível em: <http://www.praticahospitalar.com.br/pratica2053/pdf/mat2010.pdf>

D'Ippolito M, Read JS, Korelitz J, Joao EC, Mussi-Pinhata M, Rocha N 2007: Missed opportunities for prevention of mother-to-child transmission of human immunodeficiency virus type 1 in Latin America and the Caribbean: the NISDI perinatal study. *Pediatr Infect Dis J*. 26(7):649-653.

Dorjgochoo T, Noel F, Deschamps MM, Theodore H, Dupont W, Wright P F, Fitzgerald DW, Vermund SH, Pape JW 2009. Risk factors for HIV infection among Haitian adolescents and young adults seeking counseling and testing in Port-au-Prince. *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr*. 52(4):498-508.

Dunfee RL, Thomas ER, Gorry PR, Wang J, Taylor J, Kunstman K, Wolinsky SM, Gabuzda D 2006. The HIV Env variant N283 enhances macrophage tropism and is associated with brain infection and dementia. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 103: 15160-

15165.

Eckert DM, Kim PS 2001. Design of Potent inhibitors of HIV entry form gp41 N-peptide region. *PNAS* 98(20):11187-11192.

Engsig FN, Gerstoft J, Kronborg G, Larsen CS, Pedersen G, Roge B, Jensen J, Nielsen LN, Obel N 2010. Long-term mortality in HIV patients virally suppressed for more than three years with incomplete CD4 recovery: a cohort study. *BMC.Infect.Dis.* 10: 318.

Epeldegui M, Thapa DR, De la CJ, Kitchen S, Zack JA, Martinez-Maza O. 2010. CD40 ligand (CD154) incorporated into HIV virions induces activation-induced cytidine deaminase (AID) expression in human B lymphocytes. *PLoS. One.* 5(7):e11448.

Eshleman SH, Hackett J Jr, Swanson P, Cunningham SP, Drews B, Brennan C, Devare SG, Zekeng L, Kaptue L, Marlowe N 2004. Performance of the Celera Diagnostics ViroSeq HIV-1 Genotyping System for sequence-based analysis of diverse human immunodeficiency virus type 1 strains. *J. Clin. Microbiol.* 42(6): 2711-2717.

European Collaborative Study, Boer K, England K, Godfried MH, Thorne C 2010. Mode of delivery in HIV-infected pregnant women and prevention of mother-to-child transmission: changing practices in Western Europe *HIV Med.* 11(6):368-78. Epub 2010 Jan 4.

Fackler OT, Alcover A, Schwartz O 2007. Modulation of the immunological synapse: a key to HIV-1 pathogenesis? *Nat.Rev.Immunol.* 7: 310-317.

Farquhar C, Nduati R, Haigwood N, Sutton W, Mbori-Ngacha D, Richardson B, John-Stewart G 2005. High maternal HIV-1 viral load during pregnancy is associated with reduced placental transfer of measles IgG antibody. *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr.* 40(4):494-497.

Fauci AS 1996. Host factors and the pathogenesis of HIV-induced disease. *Nature* 384(6609): 529-534.

Favre D, Mold J, Hunt PW, Kanwar B, Loke P, Seu L, Barbour JD, Lowe MM, Jayawardene A, Aweeka F, Huang Y, Douek DC, Brenchley JM, Martin JN, Hecht FM,

Deeks SG and McCune JM 2010. Tryptophan catabolism by indoleamine 2,3-dioxygenase 1 alters the balance of TH17 to regulatory T cells in HIV disease. *Sci.Transl.Med.* 2: 32ra36.

FDA. Food and drug administration. [homepage na internet]. Antiretroviral drugs used in the treatment of HIV infection. 2011 [atualizado em maio de 2011, citado em 10/06/2011]. Disponível em: <http://www.fda.gov/ForConsumers/ByAudience/ForPatientAdvocates/HIVandAIDSActivities/ucm118915.htm>

Feeney ME, Tang Y, Roosevelt KA, Leslie AJ, McIntosh K, Karthas N, Walker B D, Goulder P J 2004. Immune escape precedes breakthrough human immunodeficiency virus type 1 viremia and broadening of the cytotoxic T-lymphocyte response in an HLA-B27-positive long-term-nonprogressing child. *J. Virol.* 78(16):8927-8930.

Fenard D, Yonemoto W, de NC, Cavrois M, Williams SA, Greene WC 2005. Nef is physically recruited into the immunological synapse and potentiates T cell activation early after TCR engagement. *J.Immunol.* 175: 6050-6057.

Ferreira AS, Cardoso LP, Stefani MM 2011. Moderate prevalence of transmitted drug resistance and high HIV-1 genetic diversity in patients from Mato Grosso State, Central Western Brazil. *J Med Virol.* Aug;83(8):1301-7. doi: 10.1002/jmv.22128.

Fleming DT and Wasserheit JN 1999. From epidemiological synergy to public health policy and practice: the contribution of other sexually transmitted diseases to sexual transmission of HIV infection. *Sex Transm. Infect.* 75(1):3-17.

Fogli M, Costa P, Murdaca G, Setti M, Mingari MC, Moretta L, Moretta A, De MA 2004. Significant NK cell activation associated with decreased cytolytic function in peripheral blood of HIV-1-infected patients. *Eur.J.Immunol.* 34: 2313-2321.

Fontella R, Soares MA, Schrago CG 2009. The origin of South American HIV-1 subtype C: lack of evidence for a Mozambican ancestry. *AIDS* 23(14): 1926-1928.

Forthal DN, Landucci G, Phan TB, Becerra J 2005. Interactions between natural killer

cells and antibody Fc result in enhanced antibody neutralization of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 79(4):2042-2049.

Foster C, Judd A, Tookey P, Tudor-Williams G, Dunn D, Shingadia D, Butler K 2009. Young people in the United Kingdom and Ireland with perinatally acquired HIV: the pediatric legacy for adult services. *AIDS Patient. Care STDS.* 23 (3):159-166.

Fowke KR, Nagelkerke NJ, Kimani J, Simonsen JN, Anzala AO, Bwayo JJ, MacDonald KS, Ngugi EM, Plummer FA 1996. Resistance to HIV-1 infection among persistently seronegative prostitutes in Nairobi, Kenya. *Lancet* 348: 1347-1351.

Fraser AM, Brockert JE, Ward RH 1995. Association of young maternal age with adverse reproductive outcomes. *N. Engl. J. Med.* 332 (17):1113-1117.

Freed EO 2001. HIV-1 replication. *Somat Cell Mol Genet.* 26:13-33

Frenkel LM, Wagner LE 2nd, Atwood SM, Cummins TJ, Dewhurst S 1995. Specific, sensitive, and rapid assay for human immunodeficiency virus type 1 pol mutations associated with resistance to zidovudine and didanosine. *J Clin Microbiol.* 33(2):342-7.

Gadelha SR, Shindo N, Cruz JN, Morgado MG, Galvão-Castro B. 2003. Molecular epidemiology of human immunodeficiency virus-1 in the state of Ceará, Northeast, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* Jun;98(4):461-3.

Gallant JE 2007. Drug resistance after failure of initial antiretroviral therapy in resource-limited countries. *Clin. Infect. Dis.* 44(3):453-455.

Gallo RC, Salahuddin SZ, Popovic M, Shearer GM, Kaplan M, Haynes BF, Palker TJ, Redfield R, Oleske J, Safai B 1984. Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science* 224: 500-503.

Gao F, Bailes E, Robertson DL, Chen Y, Rodenburg CM, Michael SF, Cummins LB, Arthur LO, Peeters M, Shaw GM, Sharp PM, Hahn BH 1999. Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes troglodytes*. *Nature* 397(6718): 436-441.

Gavegnano C, Schinazi RF 2009. Antiretroviral therapy in macrophages: implication for HIV eradication. *Antivir. Chem. Chemother.* 20: 63-78.

Gavin PJ, Yogev R 2002. The role of protease inhibitor therapy in children with HIV infection. *Paediatr. Drugs* 4: 581-607.

Geskus RB, Prins M, Hubert JB, Miedema F, Berkhout B, Rouzioux C, Delfraissy J F Meyer L 2007. The HIV RNA setpoint theory revisited. *Retrovirology.* 4:65.

Ginsburg A, Hoblitzelle C, Sripipatana T, Wilfert C 2007. Provision of care following prevention of mother-to-child HIV transmission services in resource-limited settings. *AIDS.* 21, 2529– 2532.

Gonçalves VL, Troiani C, Ribeiro AA, Spir PR, Gushiken EK, Vieira RB, Prestes-Carneiro LE 2011. Vertical transmission of HIV-1 in the western region of the State of São Paulo. *Rev Soc Bras Med Trop.* 44(1): 4-7.

Goodenow M, Huet T, Saurin W, Kwok S, Sninsky J, Wain-Hobson S 1989. HIV-1 isolates are rapidly evolving quasispecies: evidence for viral mixtures and preferred nucleotide substitutions. *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr.* 2(4): 344-352.

Gortmaker SL, Hughes M, Cervia J, Brady M, Johnson GM, Seage GR, et al. For The Pediatric AIDS Clinical Trial Group 219 team 2001. Effect of combination therapy including proteaseinhibitors on mortality among children and adolescents infected with HIV-1. *N Engl J Med* 345: 1522–1528.

Gottlieb MS, Schroff R, Schanker HM, Weisman JD, Fan PT, Wolf RA, Saxon A 1981. Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. *N. Engl. J. Med.* 305(24): 1425-1431.

Goulder PJ, Edwards A, Phillips RE, McMichael AJ 1997. Identification of a novel HLA-B*2705-restricted cytotoxic T-lymphocyte epitope within a conserved region of HIV-1 Nef. *AIDS* 11(4): 536-538.

Gräf T, Passaes CP, Ferreira LG, Grisard EC, Morgado MG, Bello G, Pinto AR. HIV-1 genetic diversity and drug resistance among treatment naïve patients from Southern Brazil: an association of HIV-1 subtypes with exposure categories. 2011. *J Clin Virol.* 51(3):186-91.

Groot F, Geijtenbeek TB, Sanders RW, Baldwin CE, Sanchez-Hernandez M, Floris R, van KY, de Jong EC, Berkhout B 2005. Lactoferrin prevents dendritic cell-mediated human immunodeficiency virus type 1 transmission by blocking the DC-SIGN--gp120 interaction. *J. Virol.* 79: 3009-3015.

Grosch-Worner I, Schafer A, Obladen M, Maier RF, Seel K, Feiterna-Sperling C, Weigel R. 2000. An effective and safe protocol involving zidovudine and caesarean section to reduce vertical transmission of HIV-1. *AIDS* 14(18): 2903-11.

Guimarães ML, Eyer-Silva, WA, Couto-Fernandez JC, Morgado MG. 2008. Identification of two new CRF_BF in Rio de Janeiro State, Brazil. *AIDS* 22(3): 433-435.

Guimarães ML, Couto-Fernandez JC, Eyer-Silva Wde A, Teixeira SL, Chequer-Fernandez SL, Morgado MG. 2010. Analysis of HIV-1 BF pr/rt recombinant strains from Rio de Janeiro/Brazil reveals multiple unrelated mosaic structures. *Infect Genet Evol.* 10(7):1094-100.

Gulia J, Kumwenda N, Li Q, Taha TE 2007. HIV seroreversion time in HIV-1-uninfected children born to HIV-1-infected mothers in Malawi. *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr.* 46(3): 332-337.

Gulick RM, Meibohm A, Havlir D, Eron JJ, Mosley A, Chodakewitz JA, Isaacs R, Gonzalez C, McMahon D, Richman DD, Robertson M, Mellors JW 2003. Six-year follow-up of HIV-1-infected adults in a clinical trial of antiretroviral therapy with indinavir, zidovudine, and lamivudine. *AIDS* 17(16): 2345-2349.

Hammer SM, Eron JJ, Jr. Reiss P, Schooley RT, Thompson MA, Walmsley S, Cahn P, Fischl MA, Gatell JM, Hirsch MS, Jacobsen DM, Montaner JS, Richman DD, Yeni PG, Volberding PA 2008. Antiretroviral treatment of adult HIV infection: 2008 recommendations of the International AIDS Society-USA panel. *JAMA* 300(5): 555-

Harrer T, Harrer E, Kalams SA, Barbosa P, Trocha A, Johnson RP, Elbeik T 1996. Cytotoxic T lymphocytes in asymptomatic long-term nonprogressing HIV-1 infection. Breadth and specificity of the response and relation to in vivo viral quasispecies in a person with prolonged infection and low viral load. *J. Immunol.* 156(7): 2616-2623.

Harris RS, Liddament MT 2004. Retroviral restriction by APOBEC proteins. *Nat.Rev.Immunol.* 4: 868-877.

Haseltine WA, Wong-Staal F 1988. The molecular biology of the AIDS virus. *Sci.Am.* 259: 52-62.

Hazenberg MD, Otto SA, Cohen Stuart JW, Verschuren MC, Borleffs JC, Boucher CA, Coutinho RA, Lange JM, Rinke de Wit TF, Tsegaye A, van Dongen JJ, Hamann D, de Boer RJ, Miedema F 2000. Increased cell division but not thymic dysfunction rapidly affects the T-cell receptor excision circle content of the naive T cell population in HIV-1 infection. *Nat.Med.* 6: 1036-1042.

Hazenberg MD, Otto SA, van Benthem BH, Roos MT, Coutinho RA, Lange JM, Hamann D, Prins M, Miedema F 2003. Persistent immune activation in HIV-1 infection is associated with progression to AIDS. *AIDS* 17: 1881-1888.

Hazuda DJ, Felock P, Witmer M, Wolfe A, Stillmock K, Grobler JA, Espeseth A, Gabryelski L, Schleif W, Blau C, Miller MD 2000. Inhibitors of strand transfer that prevent integration and inhibit HIV-1 replication in cells. *Science* 287(5453): 646-650.

He J, Chen Y, Farzan M, Choe H, Ohagen A, Gartner S, Busciglio J 1997. CCR3 and CCR5 are co-receptors for HIV-1 infection of microglia. *Nature* 385, no. 6617:645-649.

Hein K, Dell R, Futterman D, Rotheram-Borus MJ, Shaffer N. Comparison of HIV+ and HIV- adolescents: risk factors and psychosocial determinants. *Pediatrics.* 1995;95(1):96-104.

Hemelaar J, Gouws E, Ghys PD, Osmanov S 2006. Global and regional distribution of

HIV-1 genetic subtypes and recombinants in 2004. *AIDS* 20(16): W13-W23.

Henry M, Thuret I, Solas C, Genot S, Colson P, Tamalet C 2008. Vertical transmission of multidrug-resistant Q151M human immunodeficiency virus type 1 strains. *Pediatr Infect Dis J.* Mar;27(3):278-80.

Heyndrickx L, Janssens W, Zekeng L, Musonda R, Anagonou S, Van der Auwera G, Coppens S, Vereecken K, De Witte K, Van Rempelbergh R, Kahindo M, Morison L, McCutchan FE, Carr JK, Albert J, Essex M, Goudsmit J, Asjö B, Salminen M, Buvé A, van Der Groen G. 2000. Simplified strategy for detection of recombinant human immunodeficiency virus type 1 group M isolates by gag/env heteroduplex mobility assay. Study Group on Heterogeneity of HIV Epidemics in African Cities. *J Virol.* 74(1):363-70.

Hirsch MS, Günthard HF, Schapiro JM, Brun-Vézinet F, Clotet B, Hammer SM, Johnson VA, Kuritzkes DR, Mellors JW, Pillay D, Yeni PG, Jacobsen DM, Richman DD 2008. Antiretroviral drug resistance testing in adult HIV-1 infection: 2008 recommendations of an International AIDS Society-USA panel. *Clin Infect Dis.* Jul 15;47(2):266-85.

Hirsch MS, Brun-Vezinet F, Clotet B, Conway B, Kuritzkes DR, D'Aquila RT, Demeter LM, Hammer SM, Johnson VA, Loveday C, Mellors JW, Jacobsen DM, Richman DD 2003. Antiretroviral drug resistance testing in adults infected with human immunodeficiency virus type 1: 2003 recommendations of an International AIDS Society-USA Panel. *Clin. Infect. Dis.* 37(1): 113-128.

HIV DATABASE [Base de dados na internet]. Los Alamos - HIV Sequence database. 2010a. [Citado em 10/06/2011]. Disponível em: <http://www.hiv-web.lanl.gov>.

HIV DATABASE [Base de dados na internet]. Korber BT: Numbering Positions in HIV Relative to HXB2CG. 2010b. [Citado em 10/06/2011]. Disponível em: <http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/REVIEWS/HXB2.html>

Hoare A, Wilson DP, Regan DG, Kaldor J, Law MG 2008. Using mathematical modelling to help explain the differential increase in HIV incidence in New South

Wales, Victoria and Queensland: importance of other sexually transmissible infections. *Sex Health*. Jun;5(2):169-87.

Hoffman RM, Black V, Technau K, van der Merwe KJ, Currier J, Coovadia A, Chersich M 2010. Effects of highly active antiretroviral therapy duration and regimen on risk for mother-to-child transmission of HIV in Johannesburg, South Africa. *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr.* 54(1): 35-41.

Horton RE, McLaren PJ, Fowke K, Kimani J, Ball TB 2010. Cohorts for the study of HIV-1-exposed but uninfected individuals: benefits and limitations. *J.Infect.Dis.* 202 Suppl 3: S377-S381.

Huet T, Cheynier R, Meyerhans A, Roelants G, Wain-Hobson S 1990. Genetic organization of a chimpanzee lentivirus related to HIV-1. *Nature* 345(6273), 356-359.

Hunt PW, Landay AL, Sinclair E, Martinson JA, Hatano H, Emu B, Norris PJ 2011. A low T regulatory cell response may contribute to both viral control and generalized immune activation in HIV controllers. *PLoS. One.* 6(1):e15924.

Immunopaedia. [Homepage na internet]. ARV mode of action -viral DNA integration. 2010 [atualizado em 2010, citado em 14/01/2011]. Disponível em: <http://www.immunopaedia.org/index.php?id=63>.

Inocencio LA, Pereira AA, Sucupira MC, Fernandez JC, Jorge CP, Souza DF, Fink HT, Diaz RS, Becker IM, Suffert TA, Arruda MB, Macedo O, Simao MB, Tanuri A 2009. Brazilian Network for HIV Drug Resistance Surveillance: a survey of individuals recently diagnosed with HIV. *J. Int. AIDS Soc.* 12(1): 20.

Iqbal SM, Ball TB, Levinson P, Maranan L, Jaoko W, Wachih C, Pak BJ, Podust VN, Broliden K, Hirbod T, Kaul R, Plummer FA 2009. Elevated elafin/trappin-2 in the female genital tract is associated with protection against HIV acquisition. *AIDS* 23:1669-1677.

Isitman G, Chung AW, Navis M, Kent SJ, Stratov I 2011. Pol as a target for antibody dependent cellular cytotoxicity responses in HIV-1 infection. *Virology* 412(1):110-116.

Jarmuz A, Chester A, Bayliss J, Gisbourne J, Dunham I, Scott J, Navaratnam N 2002. An anthropoid-specific locus of orphan C to U RNA-editing enzymes on chromosome 22. *Genomics* 79: 285-296.

Jefferis R, Lund J 2002. Interaction sites on human IgG-Fc for FcγR: current models. *Immunol. Lett.* 82(1-2):57-65.

Jolly MC, Sebire N, Harris J, Robinson S, Regan L 2000. Obstetric risks of pregnancy in women less than 18 years old. *Obstet. Gynecol.* 96(6):962-966.

Jourdain G, Ngo-Giang-Huong N, Le Coeur S, Bowonwatanuwong C, Kantipong P, Leechanachai P, Ariyadej S, Leenasirimakul P, Hammer S, Lallemand M; Perinatal HIV Prevention Trial Group 2004. Intrapartum exposure to nevirapine and subsequent maternal responses to nevirapine-based antiretroviral therapy. *N Engl J Med.* Jul 15;351(3):229-40.

Jourdain G, Mary JY, Coeur SL, Ngo-Giang-Huong N, Yuthavisuthi P, Limtrakul A, Traisathit P, McIntosh K, Lallemand M; Perinatal HIV Prevention Trial Group, Thailand. 2007. Risk factors for in utero or intrapartum mother-to-child transmission of human immunodeficiency virus type 1 in Thailand. *J Infect Dis.* Dec 1;196(11):1629-36.

Julg B, Williams KL, Reddy S, Bishop K, Qi Y, Carrington M, Goulder PJ, Ndung'u T, Walker BD 2010. Enhanced anti-HIV functional activity associated with Gag-specific CD8 T-cell responses. *J. Virol.* (84) 5540-5549.

Kakehasi FM, Tupinambas U, Cleto S, Aleixo A, Lin E, Melo VH, Aguiar RA, Pinto JA 2007. Persistence of genotypic resistance to nelfinavir among women exposed to prophylactic antiretroviral therapy during pregnancy. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 23(12):1515-1520.

Kamkamidze G, Sullivan T, Charbonneau T 2001. Occurrence of HIV-1 reverse transcriptase gene mutation at codon 215 in HIV-infected infants. *J. Clin. Virol.* 22(1):143-148.

Kao S, Miyagi E, Khan MA, Takeuchi H, Opi S, Goila-Gaur R, Strebel K 2004. Production of infectious human immunodeficiency virus type 1 does not require depletion of APOBEC3G from virus-producing cells. *Retrovirology*. 1: 27.

Karon JM, Buehler JW, Byers RH, Farizo KM, Green TA, Hanson DL, Rosenblum LS, Gail MH, Rosenberg PS, Brookmeyer R 1992. Projections of the number of persons diagnosed with AIDS and the number of immunosuppressed HIV-infected persons-United States, 1992-1994. *MMWR Recomm Rep* 41(RR-18): 1-29.

Katz IT, Shapiro R, Li D, Govindarajulu U, Thompson B, Watts DH, Hughes MD, Tuomala R 2010. Risk factors for detectable HIV-1 RNA at delivery among women receiving highly active antiretroviral therapy in the women and infants transmission study. *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr.* 54(1):27-34.

Katzenstein DA, Mbizvo M, Zijenah L, Gittens T, Munjoma M, Hill D, Madzime S, Maldonado Y 1999. Serum level of maternal human immunodeficiency virus (HIV) RNA, infant mortality, and vertical transmission of HIV in Zimbabwe. *J. Infect. Dis.* 179(6):1382-1387.

Kaufmann DE, Kavanagh DG, Pereyra F, Zaunders JJ, Mackey EW, Miura T, Palmer S, Brockman M, Rathod A, Piechocka-Trocha A, Baker B, Zhu B, Le GS, Waring MT, Ahern R, Moss K, Kelleher AD, Coffin JM, Freeman GJ, Rosenberg ES, Walker BD 2007. Upregulation of CTLA-4 by HIV-specific CD4+ T cells correlates with disease progression and defines a reversible immune dysfunction. *Nat.Immunol.* 8,:1246-1254.

Kelleher AD, Long C, Holmes EC, Allen RL, Wilson J, Conlon C, Workman C 2001. Clustered mutations in HIV-1 gag are consistently required for escape from HLA-B27-restricted cytotoxic T lymphocyte responses. *J. Exp. Med.* 193(3):375-386.

Kelly J, Beddall MH, Yu, D, Iyer SR, Marsh JW, Wu Y 2008. Human macrophages support persistent transcription from unintegrated HIV-1 DNA. *Virology* 372: 300-312.

Kimura M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 16(2):

111-120.

Kohlstaedt LA, Wang J, Friedman JM, Rice PA, Steitz TA 1992. Crystal structure at 3.5 Å resolution of HIV-1 reverse transcriptase complexed with an inhibitor. *Science* 256(5065): 1783-1790.

Kostrikis LG, Neumann AU, Thomsom B, Korber BT, McHardy P, Karanicolos R, Deutsch L, Huang Y, Lew JF, McIntosh K, Pollack H, Borkowsky W, Spiegel HM, Palumbo P, Oleske J, Bardeguez A, Luzuriaga K, Sullivan J, Wolinsky SM, Koup RA, Ho DD, Moore JP. 1999. A polymorphism in the regulatory region of the CC-chemokine receptor five gene influences perinatal transmission of HIV-1 to African-American infants. *J Virol* (73):10264-271.

Koup RA, Safrit JT, Cao Y, Andrews CA, McLeod G, Borkowsky W, Farthing C, Ho DD 1994. Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome. *J. Virol.* 68:4650-4655.

Kourtis AP, Lee FK, Abrams EJ, Jamieson DJ, Bulterys M. 2006. Mother-to-child transmission of HIV-1: timing and implications for prevention. *Lancet Infect Dis.* 6(11):726-32. Review.

Kourtis AP, Bulterys M 2010. Preface. Perinatal HIV infection. *Clin. Perinatol.* 37(4):xix-xxi.

Kourtis AP, Amedee AM, Bulterys M, Danner S, Van DR, O'Sullivan M J, Maupin R, Jamieson DJ 2011. Various viral compartments in HIV-1-infected mothers contribute to in utero transmission of HIV-1. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 27(4):421-427.

Kourtis AP, Bulterys M, Nesheim SR, Lee FK 2001. Understanding the timing of HIV transmission from mother to infant. *JAMA* 285(6):709-712.

Kozal MJ, Shah N, Shen N, Yang R, Fucini R, Merigan TC, Richman DD, Morris D, Hubbell E, Chee M, Gingeras TR 1996. Extensive polymorphisms observed in HIV-1 clade B protease gene using high-density oligonucleotide arrays. *Nat Med.* 2(7):753-9.

Kuby TK. 2007. Immunology. Freeman and Company, New York. Fig. 20.9a

Kumar S, Tamura K, Jakobsen IB, Nei M 2001. MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software. *Bioinformatics*. Dec;17(12):1244-5.

Lambert JS, Nogueira SA, Abreu T, Machado ES, Costa TP, Bondarovsky M, Andrade M, Halpern M, Barbosa R, Perez M 2003. A pilot study to evaluate the safety and feasibility of the administration of AZT/3TC fixed dose combination to HIV infected pregnant women and their infants in Rio de Janeiro, Brazil. *Sex Transm. Infect.* 79(6):448-452.

Lanier LL 2008. Evolutionary struggles between NK cells and viruses. *Nat.Rev.Immunol.* 8:259-268.

Larder BA, Kohli A, Kellam P, Kemp SD, Kronick M, Henfrey RD 1993. Quantitative detection of HIV-1 drug resistance mutations by automated DNA sequencing. *Nature* 365(6447):671-673.

Learn GH, Jr Korber BT, Foley B, Hahn BH, Wolinsky SM, Mullins JI 1996. Maintaining the integrity of human immunodeficiency virus sequence databases. *J. Virol.* 70(8):5720-5730.

Legrand FA, Nixon DF, Loo CP, Ono E, Chapman JM, Miyamoto M, Diaz RS, Santos AM, Succi RC, Abadi J, Rosenberg MG, de Moraes-Pinto MI, Kallas EG 2006. Strong HIV-1-specific T cell responses in HIV-1-exposed uninfected infants and neonates revealed after regulatory T cell removal. *PLoS.One.* 1: e102.

Leroy V, Newell ML, Dabis F, Peckham C, Van de PP, Bulterys M, Kind C 1998. International multicentre pooled analysis of late postnatal mother-to-child transmission of HIV-1 infection. Ghent International Working Group on Mother-to-Child Transmission of HIV. *Lancet* 352(9128):597-600.

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 2009. Polyclonal B cell differentiation and loss of gastrointestinal tract germinal centers in the earliest stages of HIV-1 infection. *PLoS.Med.* (6):e1000107.

Levy JA 1993. HIV pathogenesis and long-term survival. *AIDS* 7: 1401-1410.

Levy JA 1996. Infection by human immunodeficiency virus-CD4 is not enough. *N. Engl. J. Med.* 335(20):1528-1530.

Levy JA, Hoffman AD, Kramer SM, Landis JA, Shimabukuro JM, Oshiro LS 1984. Isolation of lymphocytopathic retroviruses from San Francisco patients with AIDS. *Science* 225(4664): 840-842.

Li J, Chen X, Huang J, Jiang S, Chen YH 2009. Identification of critical antibody-binding sites in the HIV-1 gp41 six-helix bundle core as potential targets for HIV-1 fusion inhibitors. *Immunobiology* 214(1):51-60.

Little SJ, Holte S, Routy JP, Daar ES, Markowitz M, Collier AC, Koup RA, Mellors JW, Connick E, Conway B, Kilby M, Wang L, Whitcomb JM, Hellmann NS, Richman DD 2002. Antiretroviral-drug resistance among patients recently infected with HIV. *N. Engl. J. Med.* 347(6): 385-394.

Lole KS, Bollinger RC, Paranjape RS, Gadkari D, Kulkarni SS, Novak NG, Ingersoll R, Sheppard HW, Ray SC 1999. Full-length human immunodeficiency virus type 1 genomes from subtype C-infected seroconverters in India, with evidence of intersubtype recombination. *J Virol.* Jan; 73(1):152-60.

Mac Donald KS, J Castillo, Embree J, Njenga S, Nagelkerke Nicolas JD, Ngatia I, Mohammed Z 1998. Class I MHC polymorphism and mother to child HIV-1 transmission in Kenya. *12th World AIDS Conf, Geneva, Switzerland, Abstract 31131.*

Machado ES, Afonso AO, Nissley DV, Lemey P, Cunha SM, Oliveira RH, Soares MA 2009. Emergence of primary NNRTI resistance mutations without antiretroviral selective pressure in a HAART-treated child. *PLoS. One.* 4(3):e4806.

Machado ES, Lambert JS, Afonso AO, Cunha SM, Oliveira RH, Tanuri A, Sill AM, Soares MA 2004. Overview of genotypic and clinical profiles of human immunodeficiency virus type 1-infected children in Rio de Janeiro, Brazil. *An. Acad. Bras. Cienc.* 76(4):727-741.

Madri M, Lukin J. Pittsburgh Supercomputing Center (PSC). [Homepage na internet]. Getting a grip on AIDS. 2000 [atualizado em jul de 2000, citado em 13/01/2011]. Disponível em: http://www.psc.edu/science/Madrid/getting_a_grip_on_aids.html

Mailliard, RB, Son YI, Redlinger R, Coates PT, Giermasz A, Morel PA, Storkus WJ, Kalinski P 2003. Dendritic cells mediate NK cell help for Th1 and CTL responses: two-signal requirement for the induction of NK cell helper function. *J.Immunol.* 171: 2366-2373.

Manches O, Munn D, Fallahi A, Lifson J, Chaperot L, Plumas J, Bhardwaj N 2008. HIV-activated human plasmacytoid DCs induce Tregs through an indoleamine 2,3-dioxygenase-dependent mechanism. *J.Clin.Invest* 118:3431-3439.

Mandelbrot L, Landreau-Mascaro A, Rekecewicz C, Berrebi A, Benifla JL, Burgard M, Lachassine E, Barret B, Chaix ML, Bongain A, Ciraru-Vigneron N, Crenn-Hebert C, Delfraissy JF, Rouzioux C, Mayaux MJ, Blanche S 2001. Lamivudine-zidovudine combination for prevention of maternal-infant transmission of HIV-1. *JAMA* 285(16):2083-2093.

Mangeat B, Turelli P, Caron G, Friedli M, Perrin L, Trono D 2003. Broad antiretroviral defence by human APOBEC3G through lethal editing of nascent reverse transcripts. *Nature* 424:99-103.

Marin M, Rose KM, Kozak SL, Kabat D 2003. HIV-1 Vif protein binds the editing enzyme APOBEC3G and induces its degradation. *Nat.Med.* 9:1398-1403.

Martin MP, Carrington M 2005. Immunogenetics of viral infections. *Curr. Opin. Immunol.* 17(5):510-516.

Martinez-Maza O, Crabb E, Mitsuyasu RT, Fahey JL, Giorgi JV 1987. Infection with the human immunodeficiency virus (HIV) is associated with an in vivo increase in B

lymphocyte activation and immaturity. *J.Immunol.* 138:3720-3724.

Martinson NA, Ekouevi DK, Dabis F, Morris L, Lupodwana P, Tonwe-Gold B, Dhlamini P, Becquet R, Steyn JG, Leroy V, Viho I, Gray GE, McIntyre JA 2007. Transmission rates in consecutive pregnancies exposed to single-dose nevirapine in Soweto, South Africa and Abidjan, Cote d'Ivoire. *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr.* 45(2):206-209.

Mas A, Espanol T, Heredia A, Pedraza MA, Hernandez M, Caragol I, Fernando M, Bertran JM, Alcamí J, Soriano V. 1999. CCR5 genotype and HIV-1 infection in perinatally-exposed infants. *J Infect* 38(1): 9-11.

McGee B, Smith N, Aweeka F 2006. HIV pharmacology: barriers to the eradication of HIV from the CNS. *HIV.Clin.Trials* 7:142-153.

Matida LH, da Silva MH, Tayra A, Succi RC, Gianna MC, Gonçalves A, de Carvalho HB, Hearst N. 2005. Prevention of mother-to-child transmission of HIV in São Paulo State, Brazil: an update. *AIDS* 19 (Suppl 4):S37-41.

McNeely TB, Dealy M, Dripps DJ, Orenstein JM, Eisenberg SP, Wahl SM 1995. Secretory leukocyte protease inhibitor: a human saliva protein exhibiting anti-human immunodeficiency virus 1 activity in vitro. *J.Clin.Invest* 96:456-464.

Metzner KJ, Giulieri SG, Knoepfel SA, Rauch P, Burgisser P, Yerly S, Gunthard HF, Cavassini M 2009. Minority quasispecies of drug-resistant HIV-1 that lead to early therapy failure in treatment-naive and -adherent patients. *Clin. Infect. Dis.* 48(2):239-247.

Migueles SA, Osborne CM, Royce C, Compton AA, Joshi RP, Weeks KA, Rood JE, Berkley AM, X Sacha JB, Cogliano-Shutta NA, Lloyd M, Roby G, Kwan R, McLaughlin M, Stallings S, Rehm C, O'Shea MA, Mican J, Packard BZ, Komoriya A, Palmer S, Wiegand AP, Maldarelli F, Coffin JM, Mellors JW, X Hallahan CW, Follman DA, Connors M 2008. Lytic Granule Loading of CD8+ T Cells Is Required for HIV-Infected Cell Elimination Associated with Immune Control. *Immunity* 29(6): 1009–1021.

Miller JH, Presnyak V, Smith HC 2007. The dimerization domain of HIV-1 viral infectivity factor Vif is required to block APOBEC3G incorporation with virions. *Retrovirology* 4(1):81.

Misrahi M, Teglas JP, N'Go N, Burgard M, Mayaux Marie-Jeanne, Rouzioux C, Delfraissy Jean-François, Blanche S 1998. CCR5 Chemokine receptor Variant in HIV-1 Mother-to-Child transmission and Disease Progression in Children. *JAMA* 279:277-80.

Mock PA, Shaffer N, Bhadrakom C, Siriwasin W, Shotpitayasunondh T, Chearskul S, Young NL, Roongpisuthipong A, Chinayon P, Kalish ML, Parekh B, Mastro TD 1999. Maternal viral load and timing of mother-to-child HIV transmission. *AIDS* 13(3): 407-14.

Montagnier L 2010. 25 years after HIV discovery: prospects for cure and vaccine. *Virology* 397(2):248-254.

Monteiro JP, Alcantara LC, de Oliveira T, Oliveira AM, Melo MA, Brites C, Galvão-Castro B. 2009. Genetic variability of human immunodeficiency virus-1 in Bahia state, Northeast, Brazil: high diversity of HIV genotypes. *J Med Virol.* 81(3):391-9.

Moore PL, Ranchohe N, Lambson BE, Gray ES, Cave E, Abrahams MR, Bandawe G 2009. Limited neutralizing antibody specificities drive neutralization escape in early HIV-1 subtype C infection. *PLoS. Pathog* 5(9):e1000598.

Morgado MG, Guimarães ML, Gripp CB, Costa CI, Neves I Jr, Veloso VG, Linhares-Carvalho MI, Castello-Branco LR, Bastos FI, Kuiken C, Castilho EA, Galvão-Castro B, Bongertz V. 1998. Molecular epidemiology of HIV-1 in Brazil: high prevalence of HIV-1 subtype B and identification of an HIV-1 subtype D infection in the city of Rio de Janeiro, Brazil. Evandro Chagas Hospital AIDS Clinical Research Group. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retroviro.* 15;18(5):488-94.

Mulder LC, Chakrabarti LA, Muesing MA 2002. Interaction of HIV-1 integrase with DNA repair protein hRad18. *J. Biol. Chem.* 277: 27489-27493.

Muller CA, Engler-Blum G, Gekeler V, Steiert I, Weiss E, Schmidt H 1989. Genetic

and serological heterogeneity of the supertypic HLA-B locus specificities Bw4 and Bw6. *Immunogenetics* 30(3):200-207.

Munerato P, Sucupira MC, Oliveros MP, Janini, LM, de Souza DF, Pereira AA, Inocencio LA, Diaz RS 2010. HIV type 1 antiretroviral resistance mutations in subtypes B, C, and F in the City of Sao Paulo, Brazil. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 26(3): 265-273.

Nakanjako D, Ssewanyana I, Mayanja-Kizza H, Kiragga A, Colebunders R, Manabe, YC, Nabatanzi R, Kanya MR, Cao H 2011. High T-cell immune activation and immune exhaustion among individuals with suboptimal CD4 recovery after 4 years of antiretroviral therapy in an African cohort. *BMC.Infect.Dis.* 11: 43.

Nduati R, Richardson BA, John G, Mbori-Ngacha D, Mwatha A, Ndinya-Achola J, Bwayo J, Onyango FE, Kreiss J 2001. Effect of breastfeeding on mortality among HIV-1 infected women: a randomised trial. *Lancet* 357(9269):1651-1655.

Neri F, Giolo G, Potesta M, Petrini S, Doria M 2011. CD4 downregulation by the human immunodeficiency virus type 1 Nef protein is dispensable for optimal output and functionality of viral particles in primary T cells. *J.Gen.Virol.* 92:141-150.

Newell ML 2006. Current issues in the prevention of mother-to-child transmission of HIV-1 infection. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 100(1):1-5. Review.

Nijhuis M, Boucher CB, Schipper P et al 1998. Stochastic processes strongly influence HIV-1 evolution during sub optimal protease-inhibitor therapy. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 95(24): 14441-14446.

Nishiyama Y, Karle S, Planque S, Taguchi H, Paul S 2007. Antibodies to the superantigenic site of HIV-1 gp120: hydrolytic and binding activities of the light chain subunit. *Mol. Immunol.* 44(10):2707-2718.

Odaka T, Yamamoto T 1966. Inheritance of susceptibility to Friend mouse leukemia virus. 3. Susceptibility of F1 and genotypes of F2 and backcross progeny. *Jpn.J.Exp.Med.* 36:23-31.

- Okie S 2006. Fighting HIV--lessons from Brazil. *N.Engl.J.Med.* 354, 1977-1981.
- Ometto L, Zanchetta M, Mainardi M, De Salvo GL, Garcia-Rodriguez MC, Gray L, Newell ML, Chieco-Bianchi L, De Rossi A 2000. Co-receptor usage of HIV-1 primary isolates, viral burden, and CCR5 genotype in mother-to-child HIV-1 transmission. *AIDS* 14(12): 1721-29.
- Opi S, Kao S, Goila-Gaur R, Khan MA, Miyagi E, Takeuchi H, Strebel K 2007. Human immunodeficiency virus type 1 Vif inhibits packaging and antiviral activity of a degradation-resistant APOBEC3G variant. *J.Virol.* 81:8236-8246.
- Pallikkuth S, Wanchu A, Bhatnagar A, Sachdeva RK, Sharma M 2007. Human immunodeficiency virus (HIV) gag antigen-specific T-helper and granule-dependent CD8 T-cell activities in exposed but uninfected heterosexual partners of HIV type 1-infected individuals in North India. *Clin.Vaccine Immunol.* 14:1196-1202.
- Pancera M, Majeed S, Ban YE, Chen L, Huang CC, Kong L, Kwon YD 2010. Structure of HIV-1 gp120 with gp41-interactive region reveals layered envelope architecture and basis of conformational mobility. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 107(3):1166-1171.
- Passaes CP, Bello G, Lorete RS, Matos Almeida SE, Junqueira DM, Veloso VG, Morgado MG, Guimarães ML. 2009_a. Genetic characterization of HIV-1 BC recombinants and evolutionary history of the CRF31_BC in Southern Brazil. *Infect Genet Evol.* 9(4):474-82.
- Passaes CP, Guimarães ML, Bello G, Morgado MG. 2009_b. Near full-length genome characterization of HIV type 1 unique BC recombinant forms from Southern Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 25(12):1339-44.
- Pechansky F, Von DL, Inciardi JA, Surratt H, De BR 2004. Risk factors for HIV transmission in drug users from Porto Alegre, Rio Grande do Sul State, Brazil. *Cad. Saude Publica* 20(6):1651-1660.
- Pedroso C, Queiroz AT, Alcantara LC, Drexler JF, Diaz RS, Weyll N, Brites C 2007.

High prevalence of primary antiretroviral resistance among HIV-1-infected adults and children in Bahia, a northeast state of Brazil. *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr.* 45(2): 251-253.

Peng C, Ho BK, Chang TW, Chang NT 1989. Role of human immunodeficiency virus type 1-specific protease in core protein maturation and viral infectivity. *J Virol* 63(6): 2550-2556.

Pereyra F, Palmer S, Miura T, Block BL, Wiegand A, Rothchild AC, Baker B 2009. Persistent low-level viremia in HIV-1 elite controllers and relationship to immunologic parameters. *J. Infect. Dis.* 200(6):984-990.

Piot P, Quinn TC, Taelman H, Feinsod FM, Minlangu KB, Wobin O, Mbendi N, Mazebo P, Ndangi K, Stevens W 1984. Acquired immunodeficiency syndrome in a heterosexual population in Zaire. *Lancet* 2:65-69.

Plantier JC, Leoz M, Dickerson JE, De OF, Cordonnier F, Lemee V, Damond F, Robertson DL, Simon F 2009. A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. *Nat. Med.* 15(8):871-872.

Pomerantz RJ, Horn DL 2003. Twenty years of therapy for HIV-1 infection. *Nature Med* 9:867-873.

Popovic M, Sarngadharan MG, Read E, Gallo RC 1984. Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. *Science* 224:497-500.

Portales P, Reynes J, Pinet V, Rouzier-Panis R, Baillat V, Clot J, Corbeau P 2003. Interferon-alpha restores HIV-induced alteration of natural killer cell perforin expression in vivo. *AIDS* 17: 495-504.

Pulsinelli GA, Temin HM 1991. Characterization of large deletions occurring during a single round of retrovirus vector replication: novel deletion mechanism involving errors in strand transfer. *J. Virol.* 65(9):4786-4797.

Rambaut A, Robertson DL, Pybus OG, Peeters M, Holmes EC 2001. Human immunodeficiency virus. Phylogeny and the origin of HIV-1. *Nature* 410(6832):1047-1048.

Read JS for The International Perinatal HIV Group 1999. The mode of Delivery and the risk of vertical transmission of Human Immunodeficiency Virus type 1. *N Eng J Med* 340(13): 977-987.

Renjifo B, Fawzi W, Mwakagile D, Hunter D, Msamanga G, Spiegelman D, Garland M, Kagoma C, Kim A, Chaplin B, Hertzmark E, Essex M 2001. Differences in perinatal transmission among human immunodeficiency virus type 1 genotypes. *J Hum Virol.* 4(1):16-25.

Renjifo B, Gilbert P, Chaplin B, Msamanga G, Mwakagile D, Fawzi W, Essex M; Tanzanian Vitamin and HIV Study Group 2004. Preferential in-utero transmission of HIV-1 subtype C as compared to HIV-1 subtype A or D. *AIDS.* 18(12):1629-36.

Rerks-Ngarm S, Pitisuttithum P, Nitayaphan S, Kaewkungwal J, Chiu J, Paris R, Prensri N 2009. Vaccination with ALVAC and AIDSVAX to prevent HIV-1 infection in Thailand. *N. Engl. J. Med.* 361(23):2209-2220.

Richman DD 2001. HIV chemotherapy. *Nature* 410(6831):995-1001.

Richman DD, Margolis DM, Delaney M, Greene WC, Hazuda D, Pomerantz RJ 2009. The challenge of finding a cure for HIV infection. *Science* 323:1304-1307.

Robertson DL, Anderson JP, BradaC JA, Carr JK, Foley B, Funkhouser RK, Gao F, Hahn BH, Kalish ML, Kuiken C, Learn GH, Leitner T, McCutchan F, Osmanov S, Peeters M, Pieniazek D, Salminen M, Sharp PM, Wolinsky S, Korber B 2000. HIV-1 nomenclature proposal. *Science* 288(5463):55-56.

Rodrigues R, Manenti S, Romao PR, de Paula Ferreira JL, Batista JP, Siqueira AF, de Macedo Brigido LF 2010. Young pregnant women living with HIV/AIDS in Criciuma, Southern Brazil, are infected almost exclusively with HIV type 1 clade C. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 26(3):351-357.

Rogers MF, Shaffer N 1999. Reducing The Risk of Maternal-infant Transmission of HIV by attacking the virus. *N Engl J Med* 341:441-442.

Rogozin IB, Basu MK., Jordan IK, Pavlov YI, Koonin EV 2005. APOBEC4, a new member of the AID/APOBEC family of polynucleotide (deoxy)cytidine deaminases predicted by computational analysis. *Cell Cycle* 4:1281-1285.

Ross TM, Cullen BR 1998. The ability of HIV type 1 to use CCR-3 as a coreceptor is controlled by envelope V1/V2 sequences acting in conjunction with a CCR-5 tropic V3 loop. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95(13):7682-7686.

Rucker J, Samson M, Doranz BJ, Libert F, Berson JF, Yi Y, Smyth RJ, Collman RG, Broder CC, Vassart G, Doms RW, Parmentier M 1996. Regions in beta-chemokine receptors CCR5 and CCR2b that determine HIV-1 cofactor specificity. *Cell* 87(3):437-446.

Sabado RL, O'Brien M, Subedi A, Qin L, Hu N, Taylor E, Dibben O, Stacey A, Fellay J, Shianna KV, Siegal F, Shodell M, Shah K, Larsson M, Lifson J, Nadas A, Marmor M, Hutt R, Margolis D, Garmon D, Markowitz M, Valentine F, Borrow P, Bhardwaj N 2010. Evidence of dysregulation of dendritic cells in primary HIV infection. *Blood* 116:3839-3852.

Sabatte J, Ceballos A, Raiden S, Vermeulen M, Nahmod K, Maggini J, Salamone G, Salomon H, Amigorena S, Geffner J 2007. Human seminal plasma abrogates the capture and transmission of human immunodeficiency virus type 1 to CD4+ T cells mediated by DC-SIGN. *J.Virol.* 81:13723-13734.

Saez-Cirion A, Sinet M, Shin SY, Urrutia A, Versmisse P, Lacabaratz C, Boufassa F, Vettand-Fenoel V, Rouzioux C, Delfraissy JF, Barre-Sinoussi F, Lambotte O, Venet A, Pancino G 2009. Heterogeneity in HIV suppression by CD8 T cells from HIV controllers: association with Gag-specific CD8 T cell responses. *J.Immunol.* 182:7828-7837.

Saksena NK, Rodes B, Wang B, Soriano V 2007. Elite HIV controllers: myth or reality?

AIDS Rev. 9: 195-207.

Salemi M, de Oliveira T, Soares MA, Pybus O, Dumans AT, Vandamme AM, Tanuri A, Cassol S, Fitch WM. 2005. Different epidemic potentials of the HIV-1B and C subtypes. *J Mol Evol.* 2005;60(5):598-605.

Sanabani SS, Pastena ER, Neto WK, Martinez VP, Sabino EC 2010. Characterization and frequency of a newly identified HIV-1 BF1 intersubtype circulating recombinant form in Sao Paulo, Brazil. *Viol. J.* 7:74.

Sanabani S, Kleine NW, Kalmar EM, Diaz RS, Janini LM, Sabino EC 2006. Analysis of the near full length genomes of HIV-1 subtypes B, F and BF recombinant from a cohort of 14 patients in Sao Paulo, Brazil. *Infect. Genet. Evol.* 6(5):368-377.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 74(12):5463-5467.

Santos AF, Sousa TM, Soares EA, Sanabani S, Martinez AM, Sprinz E, Silveira J, Sabino EC, Tanuri A, Soares MA 2006. Characterization of a new circulating recombinant form comprising HIV-1 subtypes C and B in southern Brazil. *AIDS* 20(16):2011-2019.

Sauce D, Larsen M, Fastenackels S, Pauchard M, it-Mohand H, Schneider L, Guihot A, Boufassa F, Zaunders J, Iguertsira M, Bailey M, Gorochoy G, Duvivier C, Carcelain G, Kelleher AD, Simon A, Meyer L, Costagliola D, Deeks SG, Lambotte O, Autran B, Hunt PW, Katlama C, Appay V 2011. HIV disease progression despite suppression of viral replication is associated with exhaustion of lymphopoiesis. *Blood* 117:5142-5151.

Schmidt B, Ashlock BM, Foster H, Fujimura SH, Levy JA 2005. HIV-infected cells are major inducers of plasmacytoid dendritic cell interferon production, maturation, and migration. *Virology* 343:256-266.

Schuurman R, Brambilla D, de GT, Huang D, Land S, Bremer J, Benders I, Boucher CA 2002. Underestimation of HIV type 1 drug resistance mutations: results from the ENVA-2 genotyping proficiency program. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 18(4):243-

Schuurman R, Demeter L, Reichelderfer P, Tijnagel J, de GT, Boucher C 1999. Worldwide evaluation of DNA sequencing approaches for identification of drug resistance mutations in the human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *J. Clin. Microbiol.* 37(7):2291-2296.

Scott S, Moss WJ, Cousens S, Beeler JA, Audet SA, Mugala N, Quinn TC, Griffin DE, Cutts FT 2007. The influence of HIV-1 exposure and infection on levels of passively acquired antibodies to measles virus in Zambian infants. *Clin. Infect. Dis.* 45(11):1417-1424.

Senise JF, Palacios R, Tanno ZN, Lunardi L, Waghabi GR, Vaz MJ, Diaz RS, Castelo A 2006. HIV-1 viremia during the first 28 weeks of pregnancy is not associated with mother-to-child transmission. *Braz J Infect Dis.* 4:259-63.

Sha BE, D'Amico RD, Landay AL, Spear GT, Massad LS, Rydman RJ, Warner NA, Padnick J, Ackatz L, Charles LA, Benson CA.1997. Evaluation of immunologic markers in cervicovaginal fluid of HIV-infected and uninfected women: implications for the immunologic response to HIV in the female genital tract. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol.* 1;16(3):161-8.

Shafer RW 2002. Genotypic testing for human immunodeficiency virus type 1 drug resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 15(2): 247-277.

Sheehy AM, Gaddis NC, Malim MH 2003. The antiretroviral enzyme APOBEC3G is degraded by the proteasome in response to HIV-1 *Vif.* *Nat.Med.* 9:1404-1407.

Silva EM, Acosta AX, Santos EJM, Netto EM, Lemaire DC, Oliveira AS, Barbosa CM, Bendicho MT, Galvão-Castro B, Brites C 2010. HLA-Bw4-B*57 and Cw*18 alleles are associated with plasma viral load modulation in HIV-1 infected individuals in Salvador, Brazil. *Braz J Infect Dis.* 14(5):468-475.

Simon F, Mauciere P, Roques P, Loussert-Ajaka I, Muller-Trutwin MC, Saragosti S, Georges-Courbot MC, Barre-Sinoussi F, Brun-Vezinet F 1998. Identification of a new

human immunodeficiency virus type 1 distinct from group M and group O. *Nat. Med.* 4(9): 1032-1037.

Simon V and Ho DD 2003. HIV-1 dynamics in vivo: implications for therapy. *Nat.Rev.Microbiol.* 1:181-190.

Soares EA, Martinez AM, Souza TM, Santos AF, Da HV, Silveira J, Bastos FI, Tanuri A, Soares MA 2005. HIV-1 subtype C dissemination in southern Brazil. *AIDS* 19 Suppl 4: S81-S86.

Soares EA, Santos RP, Pellegrini JA, Sprinz E, Tanuri A, Soares MA 2003. Epidemiologic and molecular characterization of human immunodeficiency virus type 1 in southern Brazil. *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr.* 34(5):520-526.

Soogoor M, Daar ES 2005. Primary HIV-1 Infection: Diagnosis, Pathogenesis, and Treatment. *Curr.Infect.Dis.Rep.* 7:147-153.

Souza Jr PRB, Szwarcwald CL, Júnior AB, Carvalho MF, Castilho EA 2004. Infecção pelo HIV durante a gestação: Estudo Sentinela Parturiente, Brasil, 2002. *Rev. Saúde Pública* 38(6):764-72.

Sprinz E, Netto EM, Patelli M, Lima JS, Furtado JJ, da Eira M, Zajdenverg R, Madruga JV, Lewi DS, Machado AA, Pedro RJ, Soares MA 2009. Primary antiretroviral drug resistance among HIV type 1-infected individuals in Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses* 25(9): 861-867.

Stamatatos L, Morris L, Burton DR, Mascola JR 2009. Neutralizing antibodies generated during natural HIV-1 infection: good news for an HIV-1 vaccine? *Nat. Med.* 15(8):866-870.

Staprans SI and Feinberg MB 2004. The roles of nonhuman primates in the preclinical evaluation of candidate AIDS vaccines. *Expert. Rev. Vaccines.* 3(4) Suppl:S5-32.

Stefani MMA, Pereira GA, Martelli CM, Shindo N, Galvao-Castro B 2000. Evidence of HIV-1 genetic diversity among pregnant women with AIDS or infected with HIV-1 in

Central Brazil. *J. Acquir Immune Defic Syndr.* 23: 20:207.

Stefani MM, Pereira GA, Lins JA, Alcantara KC, Silveira AA, Viegas AA, Maya NC, Mussi AH 2007. Molecular screening shows extensive HIV-1 genetic diversity in Central West Brazil. *J Clin Virol.* 39(3):205-9.

Stopak K, de NC, Yonemoto W, Greene WC 2003. HIV-1 Vif blocks the antiviral activity of APOBEC3G by impairing both its translation and intracellular stability. *Mol. Cell* 12:591-601.

Streeck H & Nixon DF 2010. T cell immunity in acute HIV-1 infection. *J. Infect. Dis.* 202 Suppl 2:S302-S308.

Streeck H, Kwon DS, Pyo A, Flanders M, Chevalier MF, Law K, Julg B, Trocha K, Jolin JS, Anahtar MN, Lian J, Toth I, Brumme Z, Chang JJ, Caron T, Rodig SJ, Milner DA, Jr. Piechoka-Trocha A, Kaufmann DE, Walker BD, Altfeld M 2011. Epithelial adhesion molecules can inhibit HIV-1-specific CD8+ T-cell functions. *Blood* 117:5112-5122.

Stuhlmann H, Berg P 1992. Homologous recombination of copackaged retrovirus RNAs during reverse transcription. *J. Virol.* 66(4):2378-2388.

Succi RCM and Brazilian Pediatric Societu study group to evaluate HIV-1 mother-to-child transmission 2007. Mother-to-child transmission of HIV in Brazil during the years 2000 and 2001: results of a multicentric study. *Cad. SaudePública.* 23(3): S379-S389.

Swanson CM, Puffer BA, Ahmad KM, Doms RW, Malim MH 2004. Retroviral mRNA nuclear export elements regulate protein function and virion assembly. *EMBO J.* 23(13):2632-2640.

Szwarcwald CL. Primeiros resultados do estudo sentinela-Parturiente. [Série na Internet] Jan 2005. [Citado em: 7/03/2011]; S [1]. Disponível em <http://www.aids.gov.br/publicacao/primeiros-resultados-do-estudo-sentinela-parturiente>

Takehisa J, Kraus MH, Ayouba A, Bailes E, Van HF, Decker JM, Li Y 2009. Origin

- and biology of simian immunodeficiency virus in wild-living western gorillas. *J. Virol.* 83(4):1635-1648.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol.* Aug;24(8):1596-9.
- Teixeira PR, Vitoria MA, Barcarolo J 2004. Antiretroviral treatment in resource-poor settings: the Brazilian experience. *AIDS* 18 Suppl : S5-S7.
- Telenti A, Carrington M 2008. Host factors associated with outcome from primary human immunodeficiency virus-1 infection. *Curr. Opin. HIV. AIDS* 3(1):28-35.
- Teng B, Burant CF, Davidson NO 1993. Molecular cloning of an apolipoprotein B messenger RNA editing protein. *Science* 260:1816-1819.
- Tenner-Racz K, Racz P, Gartner S, Ramsauer J, Dietrich M, Gluckman JC, Popovic, M 1989. Ultrastructural analysis of germinal centers in lymph nodes of patients with HIV-1-induced persistent generalized lymphadenopathy: evidence for persistence of infection. *Prog.AIDS Pathol.* 1:29-40.
- The European mode of delivery Collaboration 1999. Elective caesarean section versus vaginal delivery in prevention of vertical HIV-1 transmission: a randomized clinical trial. *Lancet* 353: 1035-39.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22(22), 4673-4680.
- Tiemessen CT, Shalekoff S, Meddows-Taylor S, Schramm DB, Papathanasopoulos MA, Gray GE, Sherman GG, Coovadia AH, Kuhn L 2009. Cutting Edge: Unusual NK cell responses to HIV-1 peptides are associated with protection against maternal-infant transmission of HIV-1. *J.Immunol.* 182:5914-5918.
- Tilton JC, Doms RW 2010. Entry inhibitors in the treatment of HIV-1 infection. *Antiviral Res.* 85(1), 91-100.

Tomaras GD, Yates NL, Liu P, Qin L, Fouda GG, Chavez LL, Decamp AC 2008. Initial B-cell responses to transmitted human immunodeficiency virus type 1: virion-binding immunoglobulin M (IgM) and IgG antibodies followed by plasma anti-gp41 antibodies with ineffective control of initial viremia. *J. Virol.* 82 (24):12449-12463.

Tornatore M, Gonçalves CV, Mendoza-Sassi RA, Silveira JM, D'ávila NE, Maas CG, Bianchi MS, Pinheiro EM, Machado ES, Soares MA, Martinez AM 2010. HIV-1 vertical transmission in Rio Grande, Southern Brazil. *Int J STD AIDS.* 21(5):351-5.

Townsend CL, Cortina-Borja M, Peckham CS, de RA, Lyall H, Tookey PA 2008. Low rates of mother-to-child transmission of HIV following effective pregnancy interventions in the United Kingdom and Ireland, 2000–2006. *AIDS* 22: 973–981.

Trono D, Van LC, Rouzioux C, Verdin E, Barre-Sinoussi F, Chun TW, Chomont N 2010. HIV persistence and the prospect of long-term drug-free remissions for HIV-infected individuals. *Science* 329:174-180.

Tubiana R, Le Chenadec J, Rouzioux C, Mandelbrot L, Hamrene K, Dollfus C, Faye A, Delaugerre C, Blanche S, Warszawski J 2010. Factors associated with mother-to-child transmission of HIV-1 despite a maternal viral load <500 copies/ml at delivery: a case-control study nested in the French perinatal cohort (EPF-ANRS CO1). *Clin Infect Dis.* 50(4):585-96.

Turchi MD, Duarte LS, Martelli CM 2007. Mother-to-child transmission of HIV: risk factors and missed opportunities for prevention among pregnant women attending health services in Goiania, Goias State, Brazil. *Cad. Saude Publica* 23 Suppl 3:S390-S401.

Turner BG, Summers, MF 1999. Structural biology of HIV. *J. Mol. Biol.* 285(1):1-32.

Turner BJ, Hecht FM, Ismail RB 1994. CD4+ T-lymphocyte measures in the treatment of individuals infected with human immunodeficiency virus type 1. A review for clinical practitioners. *Arch. Intern. Med.* 154 (14):1561-1573.

Turville SG, Cameron PU, Arthos J, MacDonald K, Clark G, Hart D, Cunningham AL 2001. Bitter-sweet symphony: defining the role of dendritic cell gp120 receptors in HIV infection. *J.Clin.Virol.* 22:229-239.

UNAIDS/WHO - World Health Organization, United Nations Children's Fund, UNAIDS. 2009 [base de dados na internet]. Towards universal access: scaling up priority HIV/AIDS interventions in the health sector. [citado em 31/05/2011]. Disponível em:<http://www.who.int/hiv/pub/2009progressreport/en/index.html>

UNAIDS/WHO - World Health Organization, United Nations Children's Fund, UNAIDS. [base de dados na internet]. Global report: UNAIDS report on the global AIDS epidemic: December 2010. [citado em 31/05/2011]. Disponível em: http://www.unaids.org/globalreport/documents/20101123_GlobalReport_full_en.pdf

Van de PP, Rouvroy D, Lepage P, Bogaerts J, Kestelyn P, Kayihigi J, Hekker AC, Butzler JP, Clumeck N 1984. Acquired immunodeficiency syndrome in Rwanda. *Lancet.* 2(8394): 62-65.

Van HF, Li Y, Neel C, Bailes E, Keele BF, Liu W, Loul S 2006. Human immunodeficiency viruses: SIV infection in wild gorillas. *Nature.* 444 (7116):164.

Veloso VG, Vasconcelos AL, Grinsztejn B. Prevenção da transmissão vertical do HIV no Brasil. *Bol Epidemiol Aids.*1999;12(3):16-25.

Véras NM, Véras VS, Ramalho ED, Kyaw C, Silva RR, Brígido MM, Martins CR. 2007. HIV type 1 genetic variability in central Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 23(12):1481-90.

Vidal N, Peeters M, Mulanga-Kabeya C, Nzilambi N, Robertson D, Ilunga W, Sema H, Tshimanga K, Bongo B, Delaporte E 2000. Unprecedented degree of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) group M genetic diversity in the Democratic Republic of Congo suggests that the HIV-1 pandemic originated in Central Africa. *J. Virol.* 74(22):10498-10507.

Vieillard V, Strominger JL, Debre P 2005. NK cytotoxicity against CD4+ T cells during

HIV-1 infection: a gp41 peptide induces the expression of an NKp44 ligand. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 102: 10981-10986.

Wain-Hobson S 1989. HIV genome variability in vivo. *AIDS.* 3 Suppl 1: S13-S18.

Warszawski J, Tubiana R, Le Chenadec J, Blanche S, Teglas JP, Dollfus C, Faye A, Burgard M, Rouzioux C, Mandelbrot L; ANRS French Perinatal Cohort 2008. Mother-to-child HIV transmission despite antiretroviral therapy in the ANRS French Perinatal Cohort. *AIDS.* 22(2):289-99.

Watts DH, Covington DL, Beckerman K, Garcia P, Scheuerle A, Dominguez K, Ross B, Sacks S, Chavers S, Tilson H 2004. Assessing the risk of birth defects associated with antiretroviral exposure during pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 191(3):985-992.

Wei X, Liang C, Gotte M, Wainberg MA 2002. The M184V mutation in HIV-1 reverse transcriptase reduces the restoration of wild-type replication by attenuated viruses. *AIDS* 16(18):2391-2398.

Weinberg A, Quinones-Mateu ME, Lederman MM 2006. Role of human beta-defensins in HIV infection. *Adv.Dent.Res.* 19:42-48.

Wetzel MA, Steele AD, Henderson EE, Rogers TJ 2002. The effect of X4 and R5 HIV-1 on C, C-C, and C-X-C chemokines during the early stages of infection in human PBMCs. *Virology* 292(1): 6-15.

Whitmore SK, Patel-Larson A, Espinoza L, Ruffo NM, Rao S 2010. Missed opportunities to prevent perinatal human immunodeficiency virus transmission in 15 jurisdictions in the United States during 2005-2008. *Women Health.* 50(5):414-25.

Williams SF, Megan H, Keane T, Bettica L, Dieudonne A, Bardeguet AD 2009. Pregnancy outcomes in young women with perinatally acquired human immunodeficiency virus-1. *Am J Obstet Gynecol* 200:149.e1–149.e5.

Williams G, Stretton TB, Leonard JC 1983. AIDS in 1959? *Lancet* 2(8359), 1136.

Wrammert J, Ahmed R 2008. Maintenance of serological memory. *Biol.Chem.* 389, 537-539.

Wu L and KewalRamani VN 2006. Dendritic-cell interactions with HIV: infection and viral dissemination. *Nat.Rev.Immunol.* 6:859-868.

Yerly S, Kaiser L, Race E, Bru JP, Clavel F, Perrin L 1999. Transmission of antiretroviral-drug-resistant HIV-1 variants. *Lancet* 354(9180):729-733.

Yerly S, von W, V Ledergerber B, Boni J, Schupbach J, Burgisser P, Klimkait T, Rickenbach M, Kaiser L, Gunthard HF, Perrin L 2007. Transmission of HIV-1 drug resistance in Switzerland: a 10-year molecular epidemiology survey. *AIDS* 21(16): 2223-2229.

Zhang J, Scadden DT, Crumpacker CS 2007. Primitive hematopoietic cells resist HIV-1 infection via p21. *J.Clin.Invest* 117:473-481.

Zorrilla C, Febo I, Ortiz I, Orengo JC, Miranda S, Santiago MPH 2003. Pregnancy in perinatally HIV-infected adolescents and young adults: Puerto Rico, 2002. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 52:149–151.

ANEXO I: Critérios clínicos para definição dos casos de aids.

MMWR™

Recommendations and Reports

December 5, 2008 / 57(RR10);9

Appendix A

1.1.1. AIDS-Defining Conditions

- Bacterial infections, multiple or recurrent*
- Candidiasis of bronchi, trachea, or lungs
- Candidiasis of esophagus[†]
- Cervical cancer, invasive[§]
- Coccidioidomycosis, disseminated or extrapulmonary
- Cryptococcosis, extrapulmonary
- Cryptosporidiosis, chronic intestinal (>1 month's duration)
- Cytomegalovirus disease (other than liver, spleen, or nodes), onset at age >1 month
- Cytomegalovirus retinitis (with loss of vision)[†]
- Encephalopathy, HIV related
- Herpes simplex: chronic ulcers (>1 month's duration) or bronchitis, pneumonitis, or esophagitis (onset at age >1 month)
- Histoplasmosis, disseminated or extrapulmonary
- Isosporiasis, chronic intestinal (>1 month's duration)
- Kaposi sarcoma[†]
- Lymphoid interstitial pneumonia or pulmonary lymphoid hyperplasia complex^{*†}
- Lymphoma, Burkitt (or equivalent term)
- Lymphoma, immunoblastic (or equivalent term)
- Lymphoma, primary, of brain
- *Mycobacterium avium* complex or *Mycobacterium kansasii*, disseminated or extrapulmonary[†]
- *Mycobacterium tuberculosis* of any site, pulmonary,^{†§} disseminated,[†] or extrapulmonary[†]
- *Mycobacterium*, other species or unidentified species, disseminated[†] or extrapulmonary[†]
- *Pneumocystis jirovecii* pneumonia[†]
- Pneumonia, recurrent^{†§}
- Progressive multifocal leukoencephalopathy
- *Salmonella* septicemia, recurrent
- Toxoplasmosis of brain, onset at age >1 month[†]
- Wasting syndrome attributed to HIV

* Only among children aged <13 years. (CDC. 1994 Revised classification system for human

immunodeficiency virus infection in children less than 13 years of age. MMWR 1994;43[No. RR-12].)

† Condition that might be diagnosed presumptively.

§ Only among adults and adolescents aged ≥ 13 years. (CDC. 1993 Revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and adults. MMWR 1992;41[No. RR-17].)

Use of trade names and commercial sources is for identification only and does not imply endorsement by the U.S. Department of Health and Human Services.

References to non-CDC sites on the Internet are provided as a service to *MMWR* readers and do not constitute or imply endorsement of these organizations or their programs by CDC or the U.S. Department of Health and Human Services. CDC is not responsible for the content of pages found at these sites. URL addresses listed in *MMWR* were current as of the date of publication.

All *MMWR* HTML versions of articles are electronic conversions from typeset documents. This conversion might result in character translation or format errors in the HTML version. Users are referred to the electronic PDF version (<http://www.cdc.gov/mmwr>) and/or the original *MMWR* paper copy for printable versions of official text, figures, and tables. An original paper copy of this issue can be obtained from the Superintendent of Documents, U.S. Government Printing Office (GPO), Washington, DC 20402-9371; telephone: (202) 512-1800. Contact GPO for current prices.

**Questions or messages regarding errors in formatting should be addressed to mmwrq@cdc.gov.

Date last reviewed: 11/20/2008

[HOME](#) | [ABOUT MMWR](#) | [MMWR SEARCH](#) | [DOWNLOADS](#) | [RSS](#) | [CONTACT](#)
[POLICY](#) | [DISCLAIMER](#) | [ACCESSIBILITY](#)

SAFER • HEALTHIER • PEOPLE™

Morbidity and Mortality Weekly Report
Centers for Disease Control and Prevention
1600 Clifton Rd, MailStop E-90, Atlanta, GA
30333, U.S.A

USA.gov
Government Made Easy



Department of Health
and Human Services

ANEXO II: Carta de concessão do financiamento do projeto de pesquisa.



Ofício SN/CGEFO/CNPq

Brasília, 30 de abril de 2008.

Mariane Martins de Araújo Stefani
RUA ALTO HORIZONTE QUADRA AH2, LOTE 13
RESIDENCIAL GOIAS, ALPHAVILLE FLAMBOYANT
74884-535 GOIÂNIA-GOIAS

Referência: Edital 22/2007 - Saúde da Mulher - Linha de Apoio 1.2.1.

Processo: 551300/2007-8

Projeto: PROFILAXIA DA TRANSMISSÃO VERTICAL EM GESTANTES ADOLESCENTES INFECTADAS PELO HIV-1 DO CENTRO-OESTE: PERFIL IMUNOLÓGICO E VIRAL E GENOTIPAGEM PARA RESISTÊNCIA AOS ANTI-RETROVIRAIS


Prezado(a) Senhor(a),

Em aditamento à notificação de concessão, encaminhada ao seu endereço eletrônico institucional do CNPq, encaminhamos anexos, solicitação e roteiro para abertura de conta pesquisador/Bolsista do Tesouro Nacional.

Após a abertura da Conta Pesquisador/Bolsista junto ao Banco do Brasil, o número da mesma deverá ser informado ao CNPq de acordo com uma das seguintes opções:

- No ato do registro do aceite do Termo de Concessão, através da chave de acesso encaminhada por e-mail;
- Na Plataforma Integrada Carlos Chagas, aba Pesquisador/Gerenciamento de Projetos/Dados Bancários; ou
- Na página do CNPq na internet, opção Bolsas/Ferramentas (antigo serviços restritos)/Dados Bancários.

Atenciosamente,


JOVAN GUIMARAES GADIOLI DOS SANTOS
COORDENADOR-GERAL
PO=087/2003

Canp/canp
Ministério da Ciência e Tecnologia

Conselho Nacional de Desenvolvimento
Científico e Tecnológico
Administração Central (Head Office)
SEPN 597, Bloco A, Ed. Nazir
70750-901 Brasília DF Brasil

Telefone +55 61 2108.9000
Fax +55 61 2108.9150
e-mail: cgefo@cnpq.br

ANEXO III: Modelo da ficha adotada para coleta de dados das pacientes incluídas no estudo.

PROFILAXIA DA TRANSMISSÃO VERTICAL EM GESTANTES ADOLESCENTES INFECTADAS PELO HIV-1 DO CENTRO-OESTE: PERFIL IMUNOLÓGICO E VIRAL E GENOTIPAGEM PARA RESISTÊNCIA AOS ANTI-RETROVIRAIS

A. SÓCIO-DEMOGRÁFICO

DATA: ___/___/____.		Pront. HDT: _____		Pront. HMI: _____			
Nome: _____		Idade: _____					
Telefone: _____		Naturalidade: _____					
A1. Raça:		1. Branca 2. Negra 3. Parda 4. amarela 5. índia					
A2. Está gestante?		1. sim 2. não					
A3. É puérpera?		1. sim 2. não					
		Idade gestacional () semanas					
		99. Não grávida					
A4. Em quais estados você morou nos últimos anos?		1. só Goiás 2. Outros, especifique _____ _____					
A5. Se foi em Goiás, responda:		1. Goiânia 2. Interior					
A6. Você lê e escreve?		1. sim 2. não 99. ignorado					
A7. Você estudou até que série?							
1. nenhuma							
2. 1ª. a 4ª. Série (1 2 3 4)							
3. 5ª. a 8ª. Série (5 6 7 8)							
4. Segundo grau (1 2 3)							
5. Curso técnico (1 2 3)							
6. Universitário incompleto							
99. Ignorado		Se a resposta for 2, 3, 4 ou 5, pergunte que série completou e registre o número correspondente					
A8. Qual seu estado civil atual?		1. Solteira 2. Casada 3. União consensual 4. Separada 5. Divorciada 6. Viúva 99. Ignorado					
A9. Há quanto tempo você vive com ele?		1. menos que 1 ano 2. de 1 a 5 anos 3. Mais de 5 anos 99. Não se aplica					
A10. Qual é/era sua ocupação?		1. Empregada assalariada com carteira assinada. 2. Empregada assalariada sem carteira assinada. 3. Autônoma 4. Empregada doméstica 5. Empregadora ou profissional liberal 6. Dona de negócio ou trabalhadora familiar 7. Desempregadase sim: Há quanto tempo? _____ 8. aposentada ou inativa 9. Estudante 10. Dona de casa 11. Prostituição 12. outro 99. Não responde					
A11. Em sua casa você tem?							
	0	1	2	3	4	5	6 ou +
Tv a cores	0	4	7	11	14	18	22
Rádio	0	2	3	5	6	8	9
Automóvel	0	4	9	13	18	22	26

Empregada domiciliar	0	5	11	16	21	26	32
Banheiro	0	2	5	7	10	12	15
DVD player	0	10	10	10	10	10	10
Máquina de lavar	0	8	8	8	8	8	8
Geladeira	0	7	7	7	7	7	7
Microondas	0	6	6	6	6	6	6
A12. Qual o grau de instrução do chefe da família?							
1. nenhuma 2. 1ª. a 4ª. Série (1 2 3 4) 3. 5ª. a 8ª. Série (5 6 7 8) 4. Segundo grau (1 2 3) 5. Curso técnico (1 2 3) 6. Universitário incompleto 99. Ignorado				Se a resposta for 2, 3, 4 ou 5, pergunte que série completou e registre o número correspondente			
A13. Qual o grau de parentesco com o chefe da família?				1. É a própria 2. Cônjuge 3. Irmão / Irmã 4. Filho (a) 5. Outro. Qual? _____ 99. Não responde			
A14. Onde você mora atualmente?				1. Casa ou apartamento 2. Abrigo público 3. Nas ruas 4. Invasão 5. Outro _____			
A15. Quantas pessoas vivem com você?				1.1 2. 2 3. 3 4. 4 5. 5 6. mais de 5			
A16. Você já morou em abrigo público ou nas ruas?				1. sim 2. não 99. não responde * Se sim, pergunte: Há quanto tempo? _____ Por quanto tempo? _____			
A17. Atualmente você fuma?				1. sim 2. não 99. não responde			
* Se sim, pergunte:		Quantos cigarros fuma/dia?					
		Quantos anos tinha quando começou a fumar?					
*Se não, pergunte:		Já fumou alguma vez?		1. sim 2. não 99. Não responde			
		Se sim, pergunte: quando parou?					

B. CUIDADOS GINECOLÓGICOS E HISTÓRICO DE DST

B1. Você vai ao médico ou ginecologista a cada 2 anos ou menos?	1. sim 2. não 3. Não sei 99. Não responde
B2. Você já fez exame de prevenção?	1. sim 2. não 3. Não sei 99. Não responde
B3. Você tem ou teve doença que se pega através da relação sexual (gonorréia, HPV, gota matinal, blenorragia, cancro mole...)	1. sim 2. não 3. Não sei 99. Não responde
Se a resposta for sim, pergunte:	
B3.1 Qual você teve?	1. HPV (condiloma) 2. Herpes 3. Tricomonas 4. Clamídea 5. Sífilis 6. Hepatite B 7. Outras 99. Não sabe
	1. Úlcera 2. Corrimento

B3.2 Que tipo de lesão?	3. Verruga 4. Outra _____
B3.3 Qual o local da lesão?	1. Genital 2. Anal 3. Genital e anal 99. Não se lembra
B4. Você já fez tratamento com bezetacil?	1. Sim 2. Não 99. Não responde

C. HISTÓRICO SOBRE COMPORTAMENTO SEXUAL

C1. Quantos anos você tinha quando começou a ter relações sexuais?	____ anos completos	99. não responde
C2. Quantos parceiros regulares você teve nos últimos 12 meses?	_____	99. não responde
C3. Quanto ao uso de camisinha com este parceiro	1. sempre usaram? 2. Usavam, mas abandonaram? 3. Não usavam e começaram a usar? 4. Usam às vezes? 5. Nunca usaram 99. Não responde	
C4. Você costuma ou costumava ter parceiros ocasionais?	1. sim 2. Não 99. Não responde	
Se a resposta for sim, pergunte: use 99 para não responde		
C4.1 Quantos parceiros ocasionais nos últimos 12 meses?	_____	
C4.2 Quanto ao uso de camisinha com este parceiro?	6. Sempre usaram? 7. Usavam, mas abandonaram? 8. Não usavam e começaram a usar? 9. Usam às vezes? 10. Nunca usaram 99. Não responde	
C5. Nos últimos 5 anos, você recebeu alguma vez dinheiro, presentes ou favores em troca de sexo?	1. sim 2. não 99. não responde	
C6. Você já transou com alguém que usa drogas injetáveis?	1. sim 2. não 3. acho que sim 99. não responde	
C7. Seu(s) parceiro(s) tem ou tiveram:	1. Múltiplos parceiros ou troca regular de parceiros 2. Parceiros usuários de drogas injetáveis 3. Parceiro que faleceu de causa desconhecida 4. bissexual 5. Não sei os antecedentes do(s) meu(s) parceiros(s) 99. Não responde	
C8. Você já transou com alguém que veio a desenvolver ou está com HIV/AIDS ou que morreu com HIV/AIDS?	1. Sim 2. Não 3. Acho que sim 99. Não responde Se sim, quem? _____	

D: HISTÓRIA DO USO DE DROGAS INJETÁVEIS

D1. Você usa ou já usou drogas injetáveis?	1. sim 2. não 99. não responde
D1.1 Se sim, qual?	1. Cocaína 2. Heroína 3. Outras
D1.2 Se sim, quando foi a primeira vez?	Mês _____ Ano _____
D1.3 Se sim, quando foi a última vez?	Mês _____ Ano _____
D2. Você já usou seringas, agulhas ou outro material que tenha sido usado por outra pessoa?	1. sim 2. não 99. não responde

E. HISTÓRICO SOBRE TRANSFUSÃO SANGUÍNEA

E1. Você alguma vez recebeu transfusão de sangue?	1. sim 2. não 99. não responde
*Se a resposta for sim, pergunte:	
E1.1 Quando?	1. Antes de 1988 2. Entre 1988 e 2000 3. Após 2000 4. Não sabe 99. Não responde
	1. Goiânia 2. Outra cidade de Goiás

E1.2 Onde?	3. Região Sul 4. Região Norte 5. Nordeste 6. Outro local da região Centro-Oeste 99. Não responde
E1.3 Quantas vezes recebeu transfusão?	1. Uma vez 2. De 2 a 4 vezes 3. Cinco ou mais vezes 4. Não sabe 99. Não responde
E1.4 Quanto tempo faz que recebeu a última transfusão?	1. menos que um ano 2. De 1 a 3 anos 3. Mais de 3 anos 4. Não sabe 99. Não responde
E1.5 Você doou sangue alguma vez?	1. sim 2. não 3. Não sabe 99. não responde
E2. Alguma vez você procurou algum banco de sangue com intenção de fazer o teste para HIV?	1. sim 2. não 99. não responde

F. HISTÓRIA SOBRE TAGUTAGEM

F1. Você tem alguma tatuagem?	1. sim 2. não 99. não responde
* Se a resposta for sim, pergunte:	
F1.1. Quantas tatuagens fez?	1. Uma 2. Duas 3. Três 4. Mais de três 99. Não responde
F1.2 Onde fez?	1. Tatuador profissional (loja) 2. Na rua 3. Na prisão 4. Outro local 99. Não responde
F1.3 Você usou material descartável?	1. sim 2. não 99. não responde
F1.4 Quando fez a última tatuagem?	1. Antes de 1980 2. Entre 1980 e 1990 3. Entre 1990 e 2000 4. Após 2000 99. Não responde

H. HISTÓRICO SOBRE PRISÃO

H. você já esteve presa?	1. sim 2. não 99. não responde
* se sim, pergunte:	
H2. Quantas vezes foi preso?	1. 1 vez 2. De 2 a 4 vezes 3. 5 vezes ou mais 99. Não responde
H3. Algum parceiro seu está ou esteve preso?	1. sim 2. não 99. não responde

I. HISTÓRICO CLÍNICO DA INFECÇÃO PELO HIV

II. Data do diagnóstico da infecção ____/____/____.	1. Anterior à gestação atual 2. Durante a gestação 3. Durante o parto 4. Após o parto (____ dias)
* se anterior a gestação, responda:	
II.1 Há quanto tempo sabe da infecção?	1. Um ano 2. Entre um e dois anos 3. Entre 2 e 4 anos 4. Mais de 4 anos _____
Se durante a gestação, responda:	
II.2 Em qual trimestre?	1. Primeiro 2. Segundo 3. Terceiro 99. Não sabe

IG: ____ sem

I2. Sinais e sintomas clínicos na época do diagnóstico?	<ol style="list-style-type: none"> 1. anemia/trombocitopenia/leucopenia 2. IVAS recorrente 3. pneumocistose 4. tuberculose 5. linfadenopatia 6. perda de peso acentuada 7. astenia 8. febre 9. diarreia crônica 10. herpes zoster 11. candidíase oral 12. candidíase esofágica 13. toxoplasmose 14. histoplasmose 15. neurocriptococose 16. SEM sintomas
I3. Presença de co-infecções?	<ol style="list-style-type: none"> 1. Toxoplasmose 2. CMV 3. Hepatite 4. Sífilis 5. Chagas 99. não sabe
I4. Fazia uso de antiretrovirais antes desta gestação?	1. sim 2. não
*se sim, pergunte:	
I4.1 Qual o esquema?	_____
I4.2 Mudou o esquema durante a gestação?	1. sim pq? _____ 2. não 99. não sabe
I4.3 Abandonou tratamento?	1. sim pq? _____ 2. não 99. não sabe
I5. Condição clínica?	1. HIV+ 2. AIDS

CONTAGEM DE LINFÓCITOS T CD4+ / CD8+

CD4= ___ cels/μL	CD8= ___ cels/μL	Metodologia: 1-citometria 2-IFI	Data: ___/___
CD4= ___ cels/μL	CD8= ___ cels/μL	Metodologia: 1-citometria 2-IFI	Data: ___/___
CD4= ___ cels/μL	CD8= ___ cels/μL	Metodologia: 1-citometria 2-IFI	Data: ___/___
CD4= ___ cels/μL	CD8= ___ cels/μL	Metodologia: 1-citometria 2-IFI	Data: ___/___
CD4= ___ cels/μL	CD8= ___ cels/μL	Metodologia: 1-citometria 2-IFI	Data: ___/___
CD4= ___ cels/μL	CD8= ___ cels/μL	Metodologia: 1-citometria 2-IFI	Data: ___/___
CD4= ___ cels/μL	CD8= ___ cels/μL	Metodologia: 1-citometria 2-IFI	Data: ___/___
CD4= ___ cels/μL	CD8= ___ cels/μL	Metodologia: 1-citometria 2-IFI	Data: ___/___

QUANTIFICAÇÃO DA CARGA VIRAL

Valor: _____ cópias/mL	_____ log	Met.: 1-NASBA 2-PCR 3-bDNA	Data: ___/___
Valor: _____ cópias/mL	_____ log	Met.: 1-NASBA 2-PCR 3-bDNA	Data: ___/___
Valor: _____ cópias/mL	_____ log	Met.: 1-NASBA 2-PCR 3-bDNA	Data: ___/___
Valor: _____ cópias/mL	_____ log	Met.: 1-NASBA 2-PCR 3-bDNA	Data: ___/___

Sorologia : _____ **cut off:** _____

J: HISTÓRICO DE GESTAÇÃO E PARTO

J1. () gesta () para () aborto	
J2. DUM: dia () mês () ano ()	
J3. Número de consultas no pré-natal	<ol style="list-style-type: none"> 1. uma a três consultas 2. Quatro a seis 3. Mais de seis
J4. Intercorrências durante a gestação?	1.sim 2. não 99. não sabe

J5. Usou antiretrovirais durante a gestação?	1. profilaxia 2. tratamento 3. não usou 99. não sabe
J6. Início da profilaxia	1. Já tratava 2. Primeiro trimestre 3. Segundo trimestre 4. Terceiro trimestre 5. Não fez profilaxia
J7. Usou AZT solução injetável durante o parto?	1. sim 2. não 99. não sabe
J8. Tipo de parto?	1. Vaginal 2. Cesáreo 99. Não sabe
J9. Se vaginal, qual foi o tempo de ruptura de membranas?	____ horas

K. HISTÓRICO DA CRIANÇA

DATA: ____/____/____.	Pront. HDT: _____	Pront. HMI: _____
Nome: _____		
Data de nascimento: ____/____/____.	Sexo: _____	Peso: _____
Estatura: _____		
Idade gestacional ao nascimento : _____		
A criança foi amamentada?	1. sim (____ dias) 2. Não 99. Não sabe	
A criança usou AZT Xarope ao nascimento?	1. sim 2. não 99. Não sabe	
Usou por quanto tempo?	____ dias	

CONTAGEM DE LINFÓCITOS T CD4+ / CD8+

CD4=____ cels/μL	CD8=____ cels/μL	Idade: _____	Data do processamento:

QUANTIFICAÇÃO DA CARGA VIRAL

Cópias/mL	log	Met.: 1-NASBA 2-PCR 3-bDNA	Idade:	Data do processamento:
		Met.: 1-NASBA 2-PCR 3-bDNA		
		Met.: 1-NASBA 2-PCR 3-bDNA		
		Met.: 1-NASBA 2-PCR 3-bDNA		
		Met.: 1-NASBA 2-PCR 3-bDNA		

Sorologia

DO da amostra	Cut off	Reagente/Não reagente	Idade:	Data do processamento:

ANEXO IV: Parecer do comitê de ética para condução da pesquisa.



Hospital de Doenças Tropicais Dr. Anuar Auad - HDT

PARECER CONSUBSTANCIADO

Protocolo nº: 003/2008

Projeto de Pesquisa: Profilaxia da Transmissão Vertical em Gestantes Adolescentes Infectadas pelo HIV-1 do Centro-Oeste: Perfis Imunológico e Viral e Genotipagem para Resistência aos Anti-Retrovirais.

Pesquisador Responsável: Prof. Drª. Mariane Martins de Araújo Stefani

Instituição Responsável: Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública.

CEP de Origem: Comitê de Ética em Pesquisa do HDT.

Área Temática: Grupo III

Instituição onde será realizada a Pesquisa: Hospital HDT.

PARECER FINAL:

O projeto é pertinente e mediante a adequação do mesmo as normas exigidas por este Comitê e Resolução nº 196/96-CONEP, manifestamos favorável pela aprovação do referido projeto.

Goiânia, 04 de março de 2008.

Handwritten signature of Denise Milioli in black ink.

DRª Denise Milioli

Presidente do Comitê de Ética e Pesquisa do HDT

ANEXO V: Modelo dos TCLE adotados para maiores e menores de idade

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (maior de idade)

Você está sendo convidada para participar como voluntária de um estudo sobre a infecção pelo HIV/AIDS em gestantes. Você será informada sobre todas as etapas da investigação. Caso você aceite participar, assine ao final deste documento. Caso não queira participar, você não sofrerá nenhum tipo de prejuízo no seu tratamento, assistência, cuidado ou acompanhamento médico.

Informações sobre a pesquisa

Título do estudo: PROFILAXIA DA TRANSMISSÃO VERTICAL EM GESTANTES ADOLESCENTES INFECTADAS PELO HIV-1 DO CENTRO-OESTE: PERFIL IMUNOLÓGICO E VIRAL E GENOTIPAGEM PARA RESISTÊNCIA AOS ANTI-RETROVIRAIS.

Responsável: Dra. Mariane Martins de Araújo Stefani – Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública / Universidade Federal de Goiás (IPTSP/UFG).

Descrição da Pesquisa

Mulheres infectadas pelo HIV enfrentam problemas relativos à sua própria saúde e quando gestantes, podem transmitir a infecção ao bebê. Para prevenir a transmissão da infecção para seu filho é preciso usar tratamento que combate o HIV durante a gestação, o trabalho de parto e na criança durante as seis primeiras semanas de vida, além de não amamentar o bebê. Quanto mais cedo você começar a tratar maiores as chances de evitar que seu filho seja infectado, além de trazer vantagens para o controle da sua doença. Estamos oferecendo a você um serviço de atendimento especial para a realização dos testes de laboratório importantes para o seu médico decidir qual o melhor tratamento para você e para diminuir o risco de você transmitir a doença para seu bebê. Os seguintes exames serão realizados: contagem de células CD4, carga viral e genotipagem para saber como os medicamentos vão agir no vírus que causou sua infecção.

Procedimento da Pesquisa

Caso você concorde em participar desse estudo, você deverá responder a algumas perguntas e nós colheremos amostra de sangue na primeira consulta e outra no momento do parto. Para saber se seu bebê foi ou não infectado pelo HIV será colhida uma amostra de sangue ao nascimento e durante os seis primeiros meses de vida. Material estéril e descartável será utilizado para a coleta de sangue por pessoa treinada. Os desconfortos e riscos da coleta de sangue para sua saúde são mínimos não cabendo nenhum tipo de indenização por danos, pois eles não existem. No momento da coleta as amostras de sangue sua e a do seu bebê receberão um código de identificação e os nomes nunca serão revelados. Tão logo os exames estejam prontos, você e seu médico receberão os resultados sem nenhum custo. Qualquer dúvida ou informação sobre esse estudo favor entrar em contato com Dra. Mariane M de Araújo Stefani ou Janaína B. A. Lins, pelo telefone: 3209-6111 no Laboratório de Imunologia da Aids e da Hanseníase, IPTSP/UFG e/ou com o Comitê de Ética em pesquisa do Hospital Materno Infantil: 3201-3346.

CRITÉRIOS DE INCLUSÃO: gestantes infectadas com HIV de qualquer idade incluindo as adolescentes menores de 18 anos, em qualquer idade gestacional com diagnóstico recente ou já em tratamento. **CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO:** gestantes infectadas pelo HIV que não desejem utilizar o atendimento especial para os testes laboratoriais e gestantes que não possam trazer seus bebês para o acompanhamento nos seis primeiros meses de vida.

Participação e Confidencialidade

Sua participação é voluntária, e você pode se recusar e retirar seu consentimento em qualquer momento. Tudo o que soubermos sobre você e seu bebê pelos exames e dados da entrevista será confidencial. A sua identidade e a do seu bebê jamais será revelada e mesmo na divulgação dos resultados nenhum participante será identificado. Todos os dados da pesquisa serão confidenciais, somente usados pelos pesquisadores para fins científicos. Nenhum nome ou resultado individual será divulgado, permanecendo em sigilo. Você terá acesso aos seus resultados e aos do seu filho a qualquer tempo.

Consentimento

Eu, _____, documento de identificação nº _____, declaro que entendi o objetivo do estudo e concordo em participar juntamente com meu filho até os seis meses de vida para saber pelos exames de laboratório se ele está ou não infectado pelo HIV. Sei que minha participação não terá nenhum custo e que posso desistir em qualquer momento sem ter nenhum tipo de prejuízo para o meu tratamento. Concordo, inclusive, com a publicação científica dos resultados dessa pesquisa e sei que os pacientes serão identificados apenas por códigos. Informo que aceito participar ou que a menor de 18 anos sob a minha responsabilidade participe da investigação.

Nome

Paciente: _____ RG: _____

Assinatura da paciente: _____

Nome do responsável legal pela menor de idade: _____ RG: _____

Assinatura do responsável legal pela menor de idade: _____

Assinatura do pesquisador responsável: _____ RG: _____.

GOIÂNIA, _____.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA O RESPONSÁVEL LEGAL DE MENOR DE IDADE GESTANTE INFECTADA PELO HIV-1

A adolescente pela qual você é responsável legal está sendo convidada para participar como voluntária de um estudo sobre a infecção pelo HIV/AIDS em gestantes. Ela receberá informações sobre todas as etapas da investigação. Caso você concorde com a participação dela, assine ao final deste documento. Caso você não concorde com a participação da adolescente sob sua responsabilidade, asseguramos que ela não sofrerá nenhum tipo de prejuízo no tratamento, assistência, cuidado ou acompanhamento médico.

Informações sobre a pesquisa

Título do estudo: PROFILAXIA DA TRANSMISSÃO VERTICAL EM GESTANTES ADOLESCENTES INFECTADAS PELO HIV-1 DO CENTRO-OESTE: PERFIL IMUNOLÓGICO E VIRAL E GENOTIPAGEM PARA RESISTÊNCIA AOS ANTI-RETROVIRAIS.

Responsável: Dra. Mariane Martins de Araújo Stefani – Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública / Universidade Federal de Goiás (IPTSP/UFG).

Descrição da Pesquisa

Mulheres infectadas pelo HIV enfrentam problemas relativos à sua própria saúde e quando gestantes, podem transmitir a infecção ao bebê. Para prevenir a transmissão da infecção para o filho a mãe precisa usar tratamento que combate o HIV, durante a gestação, o trabalho de parto e para a criança durante as seis primeiras semanas de vida, além de não amamentar o bebê. Quanto mais cedo a mãe começar a tratar-se, maiores as chances de evitar que o bebê seja infectado, além de trazer vantagens para o controle da doença. Estamos oferecendo à adolescente pela qual você é responsável um serviço de atendimento especial para a realização dos testes de laboratório importantes para que o médico dela possa decidir qual o melhor tratamento para ela, e para diminuir o risco de ocorrer a transmissão da doença para o bebê. Os seguintes exames serão realizados: contagem de células CD4, carga viral e genotipagem para saber como os medicamentos vão agir no vírus que causou a infecção.

Procedimento da Pesquisa

Caso você concorde em autorizar a participação da adolescente sob sua responsabilidade nesse estudo, ela deverá responder a algumas perguntas e nós colheremos amostra de sangue dela na primeira consulta e outra no momento do parto. Para saber se o bebê foi ou não infectado pelo HIV será colhida uma amostra de sangue dele ao nascimento e durante os seis primeiros meses de vida. Material estéril e descartável será utilizado para a coleta de sangue por pessoa treinada. Os desconfortos e riscos da coleta de sangue para a saúde da adolescente são mínimos não cabendo nenhum tipo de indenização por danos, pois eles não existem. No momento da coleta, as amostras de sangue da adolescente e a do bebê receberão um código de identificação e os nomes nunca serão revelados. Tão logo os exames estejam prontos, a adolescente e seu médico receberão os resultados sem nenhum custo. Qualquer dúvida ou informação sobre esse estudo favor entrar em contato com Dra. Mariane M de Araújo Stefani ou Janaína B. A. Lins, pelo telefone: 3209-6111 no Laboratório de Imunologia da Aids e da

Hanseníase, IPTSP/UFG e/ou com o comitê de ética em pesquisa do hospital Materno Infantil pelo telefone 3201-3346.

CRITÉRIOS DE INCLUSÃO: gestantes infectadas pelo HIV-1, de qualquer idade, incluindo as adolescentes menores de 18 anos, em qualquer idade gestacional com diagnóstico recente ou já em tratamento. **CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO:** gestantes infectadas pelo HIV-1 que não desejem utilizar o atendimento especial para os testes laboratoriais e gestantes que não possam trazer seus bebês para o acompanhamento nos seis primeiros meses de vida.

Participação e Confidencialidade

A participação da adolescente pela qual você é responsável é voluntária, e a recusa ou retirada do consentimento pode ocorrer em qualquer momento. Tudo o que soubermos sobre ela e seu bebê pelos exames e dados da entrevista será confidencial. A identidade dela e a do seu bebê jamais serão reveladas e mesmo na divulgação dos resultados nenhum participante será identificado. Todos os dados da pesquisa serão confidenciais, somente usados pelos pesquisadores para fins científicos. Nenhum nome ou resultado individual será divulgado, permanecendo em sigilo. Você e a adolescente terão acesso a todos os resultados dela e do bebê a qualquer tempo.

Consentimento

Eu, _____, documento de identificação nº _____, declaro que entendi o objetivo do estudo e autorizo a participação da adolescente sob minha responsabilidade legal, _____, documento de identificação nº _____, juntamente com seu filho até os seis meses de vida para saber pelos exames de laboratório se ele está ou não infectado pelo HIV. Sei que a participação dela não trará nenhum custo e que posso desistir da autorização em qualquer momento sem que haja nenhum tipo de prejuízo para o tratamento dela e do bebê. Concordo, inclusive, com a publicação científica dos resultados dessa pesquisa e sei que os pacientes serão identificados apenas por códigos. Informo que aceito que a menor de 18 anos sob a minha responsabilidade participe da investigação.

Nome do responsável legal pela menor de idade: _RG:_____

Assinatura do responsável legal pela menor de idade:

Grau de parentesco com a adolescente:_____

Nome da Paciente:_____RG:_____

Assinatura do pesquisador responsável:_____RG:_____.

GOIÂNIA, _____.