

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Biologia Celular e Molecular

Diversidade e resistência do HIV-1 em gestantes
soropositivas provenientes das regiões Sul e
Sudeste do Brasil.

por

ROBERTA DOS SANTOS LORETE

Rio de Janeiro

Outubro 2005



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz / Instituto Oswaldo Cruz
Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

“Diversidade e resistência do HIV-1 em gestantes soropositivas provenientes das regiões Sul e Sudeste do Brasil”.

por

ROBERTA DOS SANTOS LORETE

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências na Área de Concentração: Biologia Celular e Molecular

Orientadora: Dra. Mariza Gonçalves Morgado

Outubro 2005

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Esta tese intitulada:

“Diversidade e resistência do HIV-1 em gestantes soropositivas provenientes das regiões Sul e Sudeste do Brasil”.

Apresentada por

ROBERTA DOS SANTOS LORETE

Foi avaliada e aprovada pela Banca Examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. José Carlos Couto Fernandez – IOC/FIOCRUZ

Prof.^a Dra. Patrícia Brindeiro – BIOMANGUINHOS/FIOCRUZ

Prof.^a Dra. Mariane Stefani - UFG

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Manguinhos / CICT / FOCRUZ - RJ

L869 Lorete, Roberta dos Santos

Diversidade e resistência do HIV-1 em gestantes soropositivas provenientes das regiões Sul e Sudeste do Brasil / Roberta dos Santos Lorete. – Rio de Janeiro, 2006.

xiv, 102. : il.

Dissertação (mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Curso, 2006.

Bibliografia: f. 81-102.

1. HIV-1. 2. Transmissão vertical de doença.

I. Título.

CDD:616.9792

Trabalho realizado no Laboratório de AIDS & Imunologia Molecular
Do Departamento de Imunologia do Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ,
Sob orientação da Dra. Mariza Gonçalves Morgado

A Deus, ser supremo e criador de todas as coisas,
A minha família,
Ao meu amor

Quando os homens fracassam, o
que lhes faltou não foi inteligência: foi paixão

Struther Burt

AGRADECIMENTOS

Para aquelas pessoas que fazem rir meu coração.

Para galera que sempre estive junto até mesmo quando eu não estava disposta.

Para as pessoas que fazem e sempre fizeram a diferença em minha vida.

Para as pessoas que quando olho para trás sinto muitas saudades.

Para as pessoas que me aconselharam quando me senti sozinha e me ajudaram a entender que não importa em quantos pedaços meu coração tenha se partido, o mundo não pára para que eu o conserte.

Para as pessoas que me deram força quando eu não estava muito animada para o trabalho.

Para as pessoas que não conheço, mas que foram super importantes para realização deste trabalho.

Para as pessoas que amo.

Para as pessoas que abraço.

E para aquelas que encontro apenas em meus sonhos.

Para aquelas que encontro todos os dias e não tenho a chance de dizer tudo que sinto olhando nos olhos.

Para aqueles que já se esqueceram de quanto são importantes para mim.

Para aquelas pessoas que me magoaram e que me feriram de alguma forma, que destruíram em segundos a confiança que eu construí em anos, mesmo assim, merecem meu perdão e meu carinho.

A vida é um caminho cheio de surpresas e o final dela ninguém conhece.

Você pode fazer coisas em um instante das quais se arrependerá a vida inteira, o que importa não é o que você tem na vida, mas quem você tem na vida.

Temos só uma vida para viver e ela é sempre muito mais curta do que imaginamos, cada momento é muito importante.

Por isso guardo todas as pessoas importantes na minha vida em uma caixinha dentro do meu coração, e só tenho a agradecer a todas elas.

Obrigada de todo coração.

RESUMO

O primeiro caso reportado de transmissão vertical do HIV-1 no Brasil ocorreu em São Paulo em 1985, e apesar da disponibilização de medidas preventivas nos últimos anos, o controle efetivo da transmissão vertical continua sendo uma das prioridades da pesquisa e da intervenção em saúde pública.

Neste estudo avaliamos os níveis de carga viral plasmática, o subtipo genético, e a presença de variantes resistentes aos anti-retrovirais, assim como a contagem de linfócitos T CD4+ em uma população de gestantes diagnosticadas como soropositivas para o HIV-1 no momento do parto e discutimos a influência destes parâmetros na transmissão vertical do HIV.

Amostras biológicas de 148 gestantes provenientes das regiões Sul (Porto Alegre; n=98) e Sudeste (Rio de Janeiro; n=50) do Brasil, colhidas entre Março de 2000 e Agosto de 2002, foram testadas quanto à carga viral plasmática (NASBA) e os níveis de CD4 (citometria de fluxo). A caracterização molecular do HIV-1 foi feita por HMA_{env} e por sequenciamento de nucleotídeos das regiões *env* e *pol*, visando à determinação do subtipo viral (*env/pol*), assim como a análise da resistência aos antiretrovirais (*pol*). Os bebês foram diagnosticados para a infecção pelo HIV por PCR DNA (Roche) e confirmados pela quantificação da carga viral plasmática (NASBA).

Considerando os resultados de subtipagem viral com base nas regiões gênicas *env* e *pol* verificamos que 42 das 50 amostras analisadas do Rio de Janeiro, 36 (86%) apresentaram o perfil B_{pol}/B_{env}, 4 (10%) F_{pol}/F_{env} e 2 (4%) F_{PR}/B_{RT}/B_{env}. Quando analisamos as 70 das 98 amostras da região Sul, verificamos que 15 (22%) apresentaram o perfil B_{pol}/B_{env}, 43 (63%) o perfil C_{pol}/C_{env} e apenas uma amostra (1%) o perfil F_{pol}/F_{env}. Observamos, ainda, perfis *pol/env* discordantes, sugestivos de genomas recombinantes como: C_{pol}/B_{env} em 4 (6%) amostras, B_{pol}/C_{env} em 3 (4%), F_{pol}/C_{env} em 1 (1%), B_{PR}/C_{RT}/C_{env} em 1 (1%) e F_{PR}/B_{RT}/C_{env} em 1 amostra (1%). Observamos, ainda, um caso sugestivo de infecção dupla B_{pol}/B-C_{env}.

A presença de resistência primária aos inibidores da protease foi verificada em 4 (3,5%) gestantes. Mutações acessórias como a M36I, L63P e V77I foram também encontradas. Em relação aos inibidores da transcriptase reversa tivemos uma prevalência de 5,2% (6 amostras). A ocorrência da transmissão vertical do HIV-1 foi observada em, pelo menos, 17 gestantes incluídas no estudo, sendo 6 do RJ e 11 de PoA. Não encontramos nenhuma associação quando comparamos os dados de CD4+, carga viral e subtipo viral entre as mães transmissoras e as não-transmissoras, como também não houve transmissão de variantes resistentes aos anti-retrovirais.

A presença de resistência primária nesta população de gestantes virgens de tratamento indica a ocorrência da transmissão de variantes resistentes aos anti-retrovirais em nosso meio, o que representa uma preocupação para as políticas públicas de tratamento do HIV/AIDS no Brasil.

Abstract

The first reported case of mother-to-child transmission (MTCT) in Brazil occurred in São Paulo in 1985 and, in spite of the availability of preventive measures in the recent years, the control of MTCT is still a government public health priority.

In this study the plasmatic RNA viral load, the CD4+ T cells count, the genetic subtype, and the presence of antiretroviral resistant variants, were determined in a population of pregnant women diagnosed as HIV-1 seropositive at delivery. The influence of these parameters in HIV-1 vertical transmission was also evaluated.

Blood samples of 148 pregnant women coming from South (Porto Alegre, PoA; n=98) and Southeast (Rio de Janeiro, RJ; n=50) Brazilian regions were collected between March 2000 and August 2002, and tested for RNA viral load (NASBA) and CD4+ T cells count (flow cytometry). The HIV-1 genetic characterization (genetic subtype and antiretroviral resistance mutations) was performed by HMA based on *env* region and subsequent nucleotide sequencing of *env/pol* regions. The babies were diagnosed for HIV-1 infection by PCR DNA (Roche) and confirmed by RNA viral load assay (NASBA).

Among the 42 samples analyzed from Rio de Janeiro we observed the following subtype profiles: 36 (86%) B_{pol}/B_{env}, 4 (10%) F_{pol}/F_{env}, and 2 (4%) F_{PR}/B_{RT}/B_{env}. Meanwhile, among 70 samples from Porto Alegre, the following profiles were observed: 15 (22%) B_{pol}/B_{env}, 43 (63%) C_{pol}/C_{env}, one (1%) F_{pol}/F_{env}, 4 (6%) C_{pol}/B_{env}, 3 (4%) B_{pol}/C_{env}, one (1%) F_{pol}/C_{env}, one (1%) B_{PR}/C_{RT}/C_{env}, and one (1%) F_{PR}/B_{RT}/C_{env}. A suggestive case of double infection B_{pol}/B-C_{env} was observed. The presence of primary resistance for protease inhibitors (M46I, V82L, and D30N) was found in four out of 112 pregnant women, indicating a primary resistance prevalence of 3.5% in our population. Accessory resistance mutations M36I, L63P and V77I were also detected. The presence of resistance for reverse transcriptase inhibitors was detected in six women, resulting in a prevalence of 5.2%. Seventeen cases of HIV-1 vertical transmission (6 in RJ and 11 in PoA) were detected. No significant difference in CD4+ T cells count, RNA viral load or viral subtype was observed between transmitter and non transmitter mothers. Moreover, the vertical transmission of antiretroviral resistant variants was not verified in our study group.

The presence of primary resistance mutations in these treatment-naive pregnant women reveals the transmission of antiretroviral resistant variants in our country, which could represent an important public health problem for the future policies of antiretroviral treatment of HIV/AIDS in Brazil.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Distribuição de adultos e crianças vivendo com HIV/Aids até o fim de 2004
- Figura 2: Estrutura morfológica do HIV-1 indicando os principais genes
- Figura 3: Estrutura genômica do HIV-1
- Figura 4- Modelo esquemático dos diferentes isolados virais
- Figura 5: Ciclo replicativo do HIV
- Figura 6: Curso Clínico, imunológico e virológico da infecção pelo HIV-1.
- Figura 7: Epidemiologia Molecular do HIV-1 no mundo.
- Figura 8: Epidemiologia Molecular do HIV-1 no Brasil
- Figura 9: Representação das mutações de resistência aos INTR e INNTR
- Figura 10: Representação das mutações de resistência aos Inibidores da Protease.
- Figura 11: Géis representativos de HMA dos subtipos B, C e F do HIV-1
- Figura 12: Árvore filogenética baseada no sequenciamento da porção C2-V3 da região do envelope viral.
- Figura 13: Árvore filogenética representativa da região da polimerase viral das gestantes soropositivas para o HIV-1.
- Figura 14: Distribuição dos subtipos virais em gestantes soropositivas para o HIV provenientes do RJ e PoA.
- Figura 15: Prevalência das mutações acessórias encontradas na região da protease do HIV-1 associadas aos subtipos B, C e F.
- Figura 16: Prevalência de mutações aos Inibidores da Transcriptase Reversa Nucleosídeos e Não-Nucleosídeos.
- Figura 17: Árvore filogenética representativa da região da polimerase viral das amostras dos pares de mãe – filho.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Identificação e seqüências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados na amplificação por PCR das diferentes regiões genômicas do HIV-1

Tabela 2: Análise dos parâmetros laboratoriais das gestantes distribuídas por regiões geográficas estudadas, considerando os dados de valores absolutos de contagem de células T CD4, relação CD4/CD8 e quantificação da carga viral.

Tabela 3: (A) Distribuição dos subtipos virais e das mutações nos genes da protease e transcriptase reversa na população de gestantes da cidade do RJ.

(B) Distribuição dos subtipos virais e das mutações nos genes da protease e transcriptase reversa na população de gestantes da cidade do PoA.

Tabela 4: Parâmetros laboratoriais das gestantes HIV positivas estratificadas em grupos de mães transmissoras e não-transmissoras, considerando os valores absolutos de contagem de células T CD4, relação CD4/CD8 e quantificação da carga viral e subtipo viral.

Tabela 5: Distribuição dos subtipos virais, dos parâmetros laboratoriais, de via de transmissão e das mutações nos genes da protease e transcriptase reversa na população de gestantes transmissoras do HIV-1.

LISTA DE ABREVIATURAS

Água DDD - Água Tri-destilada

AIDS - Acquired Immunodeficiency Syndrome ou Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

ABC – abacavir

APV – amprenavir

ATV - atazanavir

ATZ - atazanavir

AZT - zidovudina

CCR5 – co-receptor. Participa da entrada do vírus na célula hospedeira

CDC - Centers for Disease Control and Prevention

CD4 – glicoproteína de superfície das células T

CRF – Circulating Recombinant Form ou Forma recombinante circulante

CXCR4 - co-receptor. Participa da entrada do vírus na célula hospedeira

ddl – Didanosina

ddC – Zalcitabina

ddNTP – Didesoxirribonucleotídeos trifosfato

DLV - delavirdina

dNTP – Desoxirribonucleotídeos trifosfato

DNA - Desoxirribonucleic acid ou Acido desoxirribonucléico

DST – Doenças Sexualmente Transmissíveis

EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético

EFV - efavirenz

ELISA – Enzyme – Linked Immunosorbent Assay

Env – gene que codifica as glicoproteínas do envelope viral

FDA – Food and Drug Administration

Gag – gene que codifica as proteínas estruturais do vírus

Gp 120 – glicoproteína de 120 kD

Gp 41 – glicoproteína de 41 kD

HAART - Highly Active Antiretroviral Treatment ou Tratamento Antiretroviral Altamente Ativo

HIV - Human Immunodeficiency Vírus ou Vírus da Imunodeficiência Humana

HMA – Heteroduplex Mobility Assay ou Ensaio de Mobilidade de Heteroduplexes

HXB2 – isolado viral do HIV-1

IDV - indinavir
IFI – Imunofluorescência Indireta
INNTR – inibidor não-nucleosídico da transcriptase reversa
INTR – inibidor nucleosídico da transcriptase reversa
IP – Inibidor da protease
LPV - lopinavir
LTR - Long Terminal Repeats ou Longas repetições terminais
M - molar
 μ l - microlitro
 μ g – micrograma
ml – mililitros
mM – milimolar
ng – nanograma
NFV – nelfinavir
NSI – não indutores de sincício
NVP – nevirapina
OMS - Organização Mundial de Saúde
pb- pares de bases
PCR - Polymerase Chain Reaction ou Reação em Cadeia da Polimerase
pmol - picomol
PoA – Porto Alegre
Pol – gene que codifica as enzimas que participam na replicação viral
PR – Protease
q.s.p. – quantidade suficiente para
RJ – Rio de Janeiro
RNA – Ribonucleic Acid ou Ácido Ribonucléico
RNAm – RNA mensageiro
Rpm – rotações por minuto
RTV – ritonavir
SI – indutores de sincício
SIV-Vírus da Imunodeficiência Símia
SQV - saquinavir
TBE – Tampão Tris – Borato - EDTA
TR -Transcriptase Reversa ou Reverse Transcriptase
3TC - lamivudina

ÍNDICE

	Pág.
Resumo	
Abstract	
Introdução	01
Uma retrospectiva da AIDS e do HIV	03
A origem do HIV	05
Estrutura do HIV	06
Genoma do HIV	08
Ciclo replicativo do HIV-1	11
História Natural da Infecção	17
Diversidade do HIV	19
Classificação do HIV	20
Distribuição dos Subtipos no Mundo	22
Diversidade Genética do HIV-1 no Brasil	24
Resistência Viral	26
Feminização da Epidemia e Transmissão Vertical	31
Objetivos	36
Metodologia	37
Descrição do Projeto “Teste Rápido”	37
Casuística	37
Imunofenotipagem das sub-populações de linfócitos	40
Carga Viral	40
Extração de DNA	41
Caracterização molecular dos subtipos virais	42
Envelope	42
Polimerase	43
Análises Filogenéticas	44
Avaliação genotípica da resistência aos anti-retrovirais	44
Resultados	46
Discussão	68
Conclusões	80
Referências bibliográficas	81

Introdução

“A AIDS representa o estágio final de um processo patogênico contínuo e progressivo, iniciando com uma infecção primária pelo HIV, continuando com uma fase crônica que geralmente é assintomática, levando progressivamente a sintomas severos e, finalmente, a uma imunodeficiência profunda, infecções oportunistas e neoplasias. Fonte: CDC”.

O HIV é o patógeno emergente que causou o maior impacto no final do século XX. Estima-se, atualmente, que cerca de 40 milhões de pessoas no mundo estejam vivendo com o HIV/AIDS e que destas, 16,6 milhões são mulheres e 2,2 milhões são crianças com menos de 15 anos. Em 2004, o número estimado de novas infecções em crianças foi de 640.000, e o número total de mortes chegou a 510.000 em todo o mundo. Em 2003, metade dos casos de novas infecções no mundo correspondeu a pessoas jovens entre 15 e 24 anos, com mais de 6.000 novos casos de infecção por dia. A situação é bem mais grave na África Subsaariana onde, no final de 2003, 12 milhões de crianças se encontravam órfãs da AIDS. (ONUSIDA, Boletim epidemiológico, 2005 - www.who.ch).

No Brasil, a relação heterossexual é, atualmente, uma das formas mais importantes da transmissão do HIV/AIDS. O número de mulheres em idade fértil infectadas pelo HIV no Brasil representou 86% dos casos de AIDS na população feminina no período de 1980 a 2004. Dessa forma, a incidência de gestantes soropositivas vem aumentando significativamente. Atualmente, o Ministério da Saúde estima que existam aproximadamente 17 mil gestantes HIV positivas no País, este fato reflete, também, no aumento da transmissão vertical do HIV (Boletim epidemiológico PN-DST/AID-MS, 2005 - www.aids.gov.br).

De acordo com dados do Ministério da Saúde, o número total de casos da doença no nosso país desde 1980 é igual a 362.364. Estes dados apontam que a epidemia da AIDS em algumas regiões esteja em um processo de estabilização, embora mantenha patamares elevados. O número de casos entre os homens demonstra esta tendência à estabilização, no entanto entre as mulheres, o número de casos é o maior desde o início da epidemia. A taxa de mortalidade também aponta para um quadro de estabilidade. Entre os usuários de drogas injetáveis, o número de casos de AIDS vem mantendo a tendência de queda observada nos últimos anos (Boletim epidemiológico – PN-DST e AIDS/MS, 2005).

Regionalmente, considerando a taxa de incidência da AIDS (número de casos/ 100 mil habitantes), o crescimento da epidemia é observado em todas as regiões do país, exceto no Sudeste, onde há estabilização com tendência de queda. (Boletim epidemiológico – PN-DST e AIDS/MS, 2005).

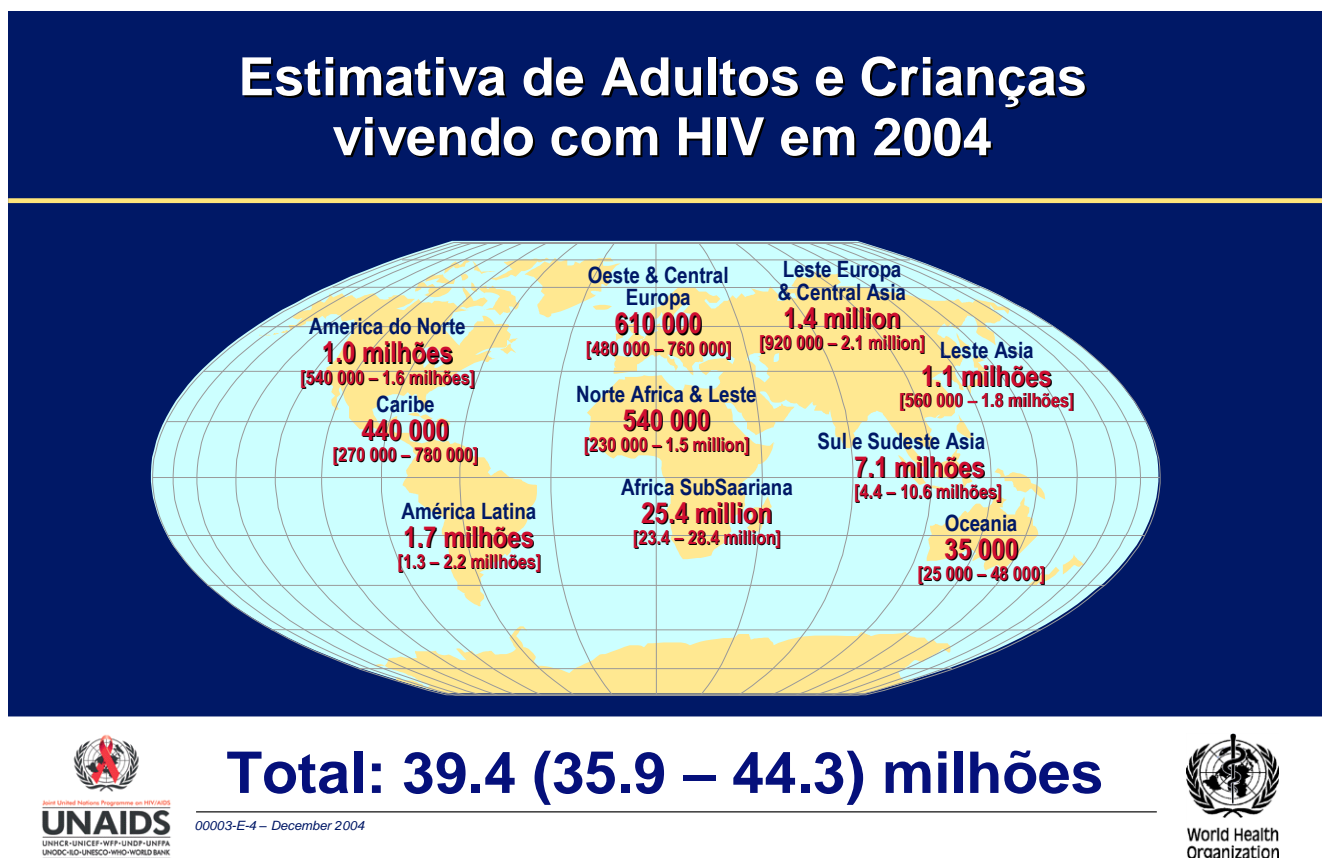


Figura 1: Distribuição de adultos e crianças vivendo com HIV/AIDS até o fim de 2004. Figura adaptada do Boletim epidemiológico da UNAIDS (<http://www.unaids.gov>)

Uma retrospectiva da AIDS e do HIV.

Os primeiros casos de AIDS foram descritos em 1981, nos Estados Unidos através da observação de um surto de pneumonia provocada por *Pneumocystis carini* e o aparecimento de um raro tipo de câncer vascular conhecido como Sarcoma de Kaposi entre jovens homossexuais masculinos previamente saudáveis (Gottlieb e cols, 1981), transformando-se em uma epidemia que ficou conhecida vulgarmente por “Praga Gay”. Posteriormente, devido ao amplo espectro clínico de manifestações da doença o CDC a nomeou de Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (CDC, 1982).

Os sintomas da doença começaram a aparecer também entre indivíduos submetidos à transfusão de sangue (CDC, 1982), em hemofílicos (Jett e cols, 1983), e usuários de drogas (Jafee e cols, 1983), sugerindo então que a transmissão da doença poderia ocorrer por via sanguínea. Posteriormente, os mesmos sintomas foram observados em prostitutas e crianças filhas de mães infectadas confirmando a transmissão sexual (Marmor e cols, 1982) e vertical da doença (CDC, 1984).

Análises retrospectivas de casos de pessoas que morreram de doenças, relacionadas à AIDS foram estudados através da análise de amostras de sangue e tecidos congelados armazenados. Entre estes casos, foram identificados os casos de um marinheiro na Inglaterra, que morreu de AIDS em 1959 (Corbitt e cols, 1990) e de um marinheiro, sua mulher e sua filha mais jovem, na Noruega, que começaram a desenvolver doenças nos anos 60 e morreram todos até 1976 (Froland e cols, 1988), sugerindo que os primeiros casos de AIDS na Europa datam dos anos 50.

No ano de 1983, Barré-Sinousi e cols detectaram a atividade da enzima transcriptase reversa em cultura de células obtidas a partir do linfonodo de um paciente que apresentava linfodenopatia, sugerindo que a AIDS poderia ser causada por um retrovírus, ao qual chamaram de Vírus Associado à Linfodenopatia - LAV (Barré-Sinousi e cols, 1983). As características desse vírus se assemelhavam através de suas características biológicas, morfológicas e estruturais ao vírus HTLV-III (Vírus da Leucemia de Células T Humanas tipo III) identificado quase que simultaneamente pelo grupo de Robert Gallo nos EUA (Popovic e cols, 1984).

Posteriormente, a análise das características genéticas e biológicas mostrou se tratar do mesmo retrovírus sendo então adotada a denominação de Vírus da Imunodeficiência Humana ou Human Immunodeficiency Virus (HIV) para o agente etiológico da AIDS. Em 1986, foi identificado um segundo retrovírus de um paciente africano, cuja análise molecular mostrou identidade de aproximadamente 50% de

sua estrutura genômica com o HIV-1, sendo então denominado HIV-2 (Clavel e cols, 1986). Após o FDA (Food and Drug Administration) ter aprovado o primeiro teste de imunodiagnóstico baseado na pesquisa de anticorpos, este foi então, largamente utilizado para triagem sorológica em bancos de sangue e inquéritos epidemiológicos em diferentes grupos populacionais para determinação da prevalência da infecção (CDC, 1986).

Em 1987, o grupo liderado por B. Galvão Castro, da Fundação Oswaldo Cruz, isolou o vírus pela primeira vez no Brasil (Galvão-Castro e cols, 1987). Isto permitiu a padronização da técnica de imunofluorescência indireta para pesquisa da soropositividade em doadores de sangue (Galvão-Castro e cols, 1987). Posteriormente, começaram a surgir Centros de Referência para diagnóstico e tratamento em todo o Brasil.

No mesmo ano, nos EUA, o FDA aprovou o AZT (zidovudina), o primeiro medicamento antiviral para o tratamento da AIDS. Em 1994, Connor e cols mostraram que o AZT reduz em mais de 70% a transmissão vertical (Connor e cols, 1994).

Em 1996, pela primeira vez em 16 anos de história da epidemia mundial, o número de novos casos de AIDS no Brasil reduziu devido ao sucesso nos esforços na prevenção e aos novos tratamentos anti-retrovirais (Boletim epidemiológico, PN-DST/AIDS 1996; Marins e cols, 2003). A partir da introdução de novos inibidores da transcriptase reversa e principalmente dos inibidores da protease, culminando no desenvolvimento da terapia anti-retroviral combinada de alta atividade (HAART - Highly Active Antiretroviral Treatment), as mortes pela doença foram reduzidas em até 20% no Brasil e no mundo (Marins e cols, 2003). Métodos moleculares para monitoramento dos níveis de carga viral foram desenvolvidos e aprimorados para o acompanhamento da infecção e terapia anti-retroviral.

Um estudo em homossexuais cujas amostras de plasma foram colhidas durante 10 anos, demonstrou que a quantificação da carga viral seria um bom preditor de sobrevivência de longo termo, mais significativa do que a contagem de células CD4+, que é o marcador principal para início da terapia (Mellors e cols, 1996). Desde então, a carga viral se tornou uma peça central de informação na decisão sobre a estruturação e condução da terapia anti-retroviral.

Durante duas décadas, a epidemia de HIV/AIDS se espalhou por todo o mundo, principalmente entre os países em desenvolvimento. Este fato também se observou no Brasil, onde as grandes metrópoles da região sudeste do Brasil

posicionam-se entre as áreas mais afetadas pela epidemia da AIDS nas Américas (UNAIDS, 2002). As taxas de incidência de casos de AIDS no Brasil são diretamente proporcionais à distribuição populacional dos municípios, ou seja, tanto menor o tamanho das cidades, maior o aclave das taxas de incidência ao longo do tempo, mostrando que a epidemia teve início nos grandes centros urbanos, mas que são estes mesmos centros que detêm o menor aumento relativo (Szwarcwald e cols, 2000).

A análise recente dos números da epidemia de AIDS no Brasil, também chama a atenção pelo aumento progressivo da incidência na região sul (Boletim epidemiológico CN-DST/AIDS, 2001) assim como a feminilização, municipalização e pauperização da epidemia na maior parte das regiões.

A origem do HIV

A introdução do HIV na população humana teve origem em transmissões zoonóticas do vírus da imunodeficiência símia (SIV - Simian Immunodeficiency Vírus) provavelmente por contato com sangue e secreções de animal contaminado e/ou através de ingestão de carne contaminada (Hahn e cols, 2000). Um exemplo desta possibilidade é a estreita relação filogenética entre o HIV-2 e o SIVsm (sooty mangabey), o vírus da imunodeficiência símia encontrado em macacos sooty mangabey, conhecido como macaco do topete dourado (Gao e cols, 1992).

Com relação ao HIV-1 foi bem mais difícil definir a procedência da cepa virulenta responsável pela atual epidemia de AIDS no mundo. Em 1998, Zhu e cols analisando amostras de plasma colhidas em 1959 nos EUA e países da África sugeriram que o HIV-1 foi introduzido em humanos no final da década 40 (Zhu e cols, 1998). Entretanto em 1999, Gao e cols isolaram de uma espécie de chimpanzé (*Pan troglodytes troglodytes*) capturado na África um novo vírus (SIVcpzUS) que tudo indicava ser o ancestral do HIV-1 em primatas. Comparando a posição filogenética deste vírus com os demais isolados de SIVcpz, foi observado uma relação filogenética mais estreita com o SIVcpzGAB1 e SIVcpzGAB2 do que com o SIVcpzANT, caracterizando definitivamente esta infecção como uma zoonose transmitida inter-espécies (Gao e cols, 1999).

Em 2000, um estudo realizado por Korber e colaboradores realizando uma análise filogenética de dados epidemiológicos de amostras retrospectivas sugeriu

que o primeiro caso de infecção pelo HIV-1 ocorreu em 1931 (95% IC - 1915-1941) no oeste da África (Korber e cols, 2000).

Vários fatores contribuíram para a vasta disseminação da epidemia como, por exemplo, viagens internacionais, comercialização do sangue, tráfico e uso de drogas, entre outros.

Estrutura do HIV-1

O agente etiológico da AIDS é membro da família Retroviridae, gênero Lentivirus. O HIV-1 se apresenta na microscopia eletrônica como uma partícula esférica de aproximadamente 100nm de diâmetro contendo um nucleocapsídeo denso sob a forma de bastão. Como os demais retrovírus, o HIV-1 é um vírus envelopado, seu capsídeo é constituído de proteínas internas e nele está contido seu material genômico (RNA), além de enzimas necessárias a sua replicação. (HIV Medicine, 2005 disponível no site www.hivmedicine.com).

A porção mais externa do vírus, o envelope, é formada por uma dupla camada fosfolipídica proveniente da membrana plasmática da célula hospedeira formada a partir do brotamento da partícula viral. No envelope estão inseridas as duas glicoproteínas de superfície, a gp120 e a gp 41 participando respectivamente da ligação com o receptor CD4 e co-receptores para a entrada do HIV na célula hospedeira.

Associadas ao material genético do HIV-1, organizam-se monômeros de duas proteínas do nucleocapsídeo, as proteínas p7 e p9. Na proteína de 7Kd existem dois motivos estruturais (“zinc finger”) conferindo a proteína capacidade de interagir com o RNA viral.

Associadas ao complexo riboproteico p7/p9-RNA encontramos as enzimas virais necessárias à replicação viral: transcriptase reversa (TR) 66Kb, responsável pela retro-transcrição, a integrase (34Kb) responsável pela integração do provírus ao genoma da célula hospedeira e a protease (11Kb), responsável pelo processamento de precursores protéicos nas etapas finais da replicação (HIV Medicine, 2005).

Envolvendo este complexo ribonucléico encontramos a proteína p24 responsável pela formação do capsídeo que constitui o “core” cilíndrico da partícula viral madura. No espaço entre o “core” e o envelope, encontramos a proteína p17 que por ser mistirilada na sua porção NH2-terminal se associa à parte interna do envelope estabilizando a estrutura do vírion. (Figura 2).

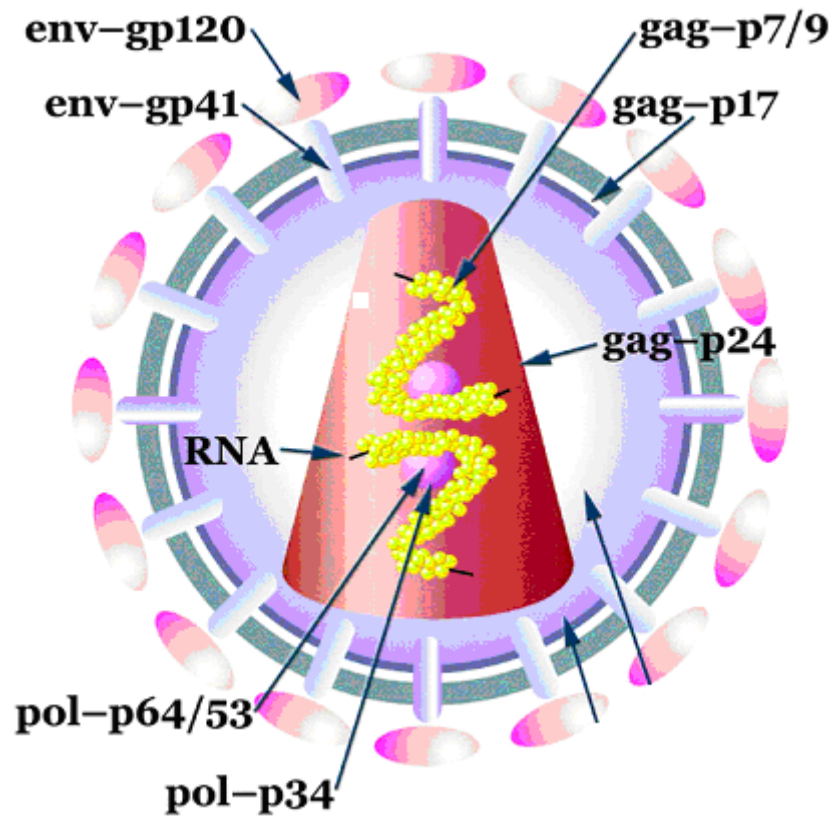


Figura 2: Estrutura morfológica do HIV-1 indicando os principais genes
Disponível no site: www.AIDS.harvard.edu/research/discoveries.html

Genoma do HIV-1

O genoma do HIV-1 é constituído por duas fitas de RNA cadeia simples e, polaridade positiva contendo aproximadamente 9,700 nucleotídeos (9,7Kb). Como todos os retrovírus o HIV possui três genes estruturais: *gag*, *env* e *pol* e ainda seis genes acessórios *tat*, *rev*, *vif*, *nef*, *vpr* e *vpu* implicados em fenômenos de regulação da expressão de proteínas e replicação viral. O genoma do HIV (Figura 3) é flanqueado por duas regiões contendo longas seqüências repetitivas denominadas LTR (long terminal repeat). (HIV Medicine, 2005).

As LTRs são seqüências idênticas localizadas nas extremidades 5' e 3' do genoma proviral do HIV integrado ao cromossomo da célula hospedeira. Estes elementos não codificam proteínas, mas são essenciais para a regulação da expressão dos genes virais, estando também envolvidos no processo de integração. Embora idênticos, os LTRs possuem funções diferentes, o localizado na extremidade 5' (5'LTR) regula a expressão dos genes virais enquanto que o do extremo 3' (3'LTR) é importante para terminação da transcrição. As extremidades LTRs são divididas em 3 sub-regiões, U3, R e U5 (Freed e Martin, 1994).

O gene estrutural *gag* é o responsável por codificar as proteínas estruturais que compõem o capsídeo viral. Este gene é codificado por um RNAm que é traduzido numa proteína 55 kd, a qual é clivada pela protease viral nas proteínas p24 (capsídeo), p17 (matriz), p7 (nucleocapsídeo) e p6 (núcleo) (Welker e cols, 2000; Strack e cols, 2003).

O gene *pol* codifica uma longa proteína precursora que é clivada também pela protease viral, dando origem as três enzimas que se situam no core viral: a transcriptase reversa (RT) que possui atividade de polimerase e RNase H, realiza a retrotranscrição do RNA do genoma viral em DNA complementar ou provírus; a protease (PR), que media a clivagem do precursor *gag/pol* e outros precursores que levarão a maturação viral; e a integrase (IN), que promove a integração do DNA proviral ao genoma da célula hospedeira devido à sua atividade de DNA ligante (HIV Medicine, 2005).

O gene *env* codifica um único RNAm, cuja proteína resultante, após sofrer glicosilações progressivas, origina uma glicoproteína precursora de 160Kd que é transportada até o complexo de Golgi, onde é clivada por proteases celulares, gerando duas proteínas a gp120 e a gp41. Após a clivagem, esse complexo gp120-gp41, associado de forma não-covalente, é transportado para a superfície celular,

onde é incorporado aos vírions em brotamento na membrana da célula hospedeira. (Freed e Martin, 1994).

Tat e *Rev* são proteínas reguladoras que se acumulam no núcleo, e ligam-se a regiões definidas do RNA viral. A proteína *Tat* é um potente ativador pós-transcricional da região promotora LTR e é essencial para a replicação viral na maioria dos sistemas de cultura *in vitro*. A *Tat* e a *Rev* estimulam a transcrição do DNA proviral de HIV-1 em RNA, promovem a elongação do RNA, estimulam o transporte de RNA viral do núcleo para o citoplasma e são essenciais para a tradução. A *Rev* é também um fator nuclear de exportação importante na troca da expressão precoce das proteínas reguladoras pelas proteínas estruturais que são sintetizadas mais tardiamente (HIV Medicine, 2005).

O produto do gene *vif* (fator de infectividade viral) é uma proteína de membrana de 24 Kd que desempenha um papel nas fases finais da maturação viral, de forma que os vírions desprovidos de *vif* não desenvolvem a estrutura cônica do capsídeo e são menos infecciosos que o tipo selvagem. Esta proteína capacita o vírus a realizar o processo de maturação e é importante para os mecanismos intracelulares de transporte dos componentes virais. Os virions deficientes em *vif* podem ser transmitidos célula a célula, mas não a partir de um meio livre de células. A *Vif* parece também afetar a morfogênese viral (revisto por Cullen, 1998).

O gene *nef* (fator regulatório negativo) codifica uma proteína de 27 Kd, e possui várias funções, pode induzir a sub-regulação dos CD4 (Aiken e cols, 1994) e das moléculas HLA de classe I e II (Collins e cols, 1998) a partir da superfície das células infectadas com HIV-1, o que pode representar um mecanismo de escape importante do vírus a um ataque imediato por células T CD8⁺ citotóxicas e para evitar o reconhecimento pelas células T CD4⁺. A *Nef* pode também interferir com a ativação das células T por ligação a várias proteínas que estão envolvidas nas vias intracelulares de transdução de sinal (revisto por Peter F, 1998). Em macacos rhesus infectados com SIV, um gene *nef* intacto era essencial para uma elevada taxa de produção de vírus e progressão para a doença, que está relacionada a manutenção da infecção latente, aumentando a replicação viral, sendo essencial para a manutenção de uma alta carga viral plasmática.

A proteína *Vpr* parece ser essencial para a replicação viral em células como os macrófagos. A *Vpr* pode estimular o LTR juntamente com uma variedade de promotores virais e celulares. Mais recentemente, verificou-se que a *Vpr* é

importante para o transporte do complexo de pré-integração viral para o núcleo (revisto por Miller e cols, 1997) e pode reter as células na fase G2 do ciclo celular.

O gene *vpu* produz uma proteína de membrana de 16 Kd que auxilia na degradação do receptor CD4 e no brotamento das partículas virais recém produzidas. Atua na eficiência da replicação viral e provavelmente no processo de montagem e maturação do vírus. O HIV-2 possui o gene *vpx* no lugar ao que corresponderia ao gene *vpu* do HIV-1 (Freed e Martins, 1994). A *Vpu* é importante para o processo de formação de vesículas, uma vez que mutações no *vpu* estão associadas com a persistência das partículas virais na superfície da célula hospedeira. A *Vpu* é também envolvida quando os complexos CD4-gp160 são degradados no retículo endoplasmático e por isso permite a reciclagem da gp160 para a formação de novos vírions (Bour e cols, 1995).

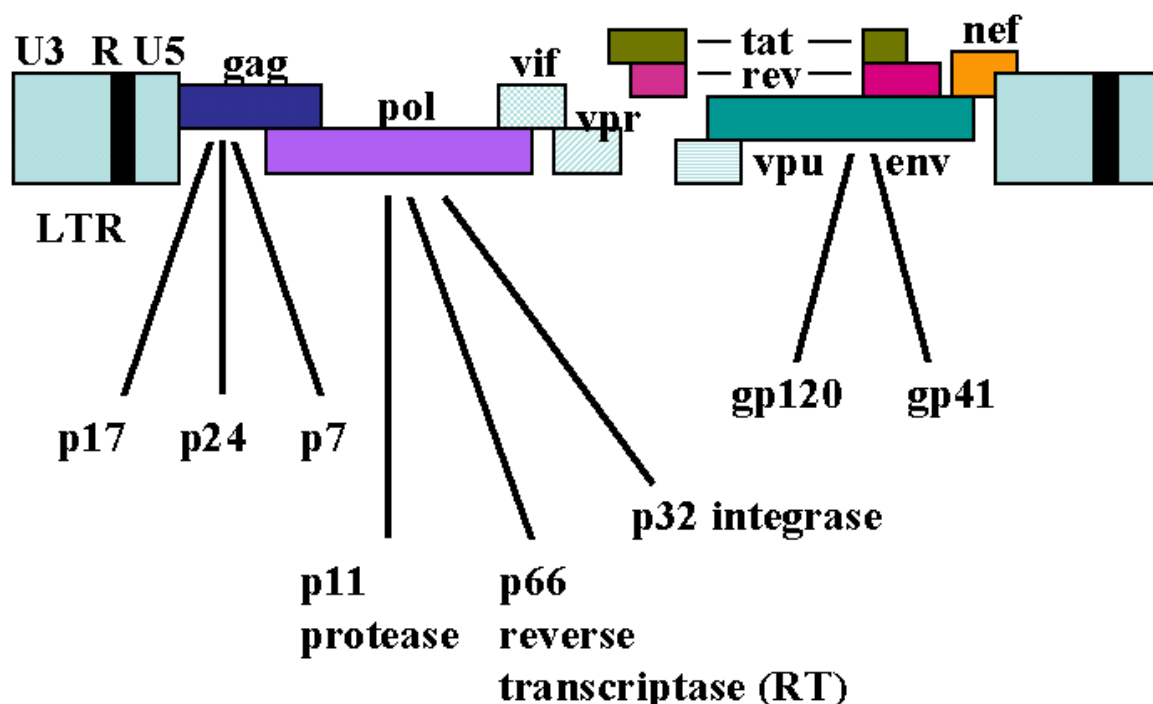


Figura 3: Estrutura genômica do HIV-1 retirado do Programa HIV Sequence Locator

Ciclo replicativo do HIV

O primeiro passo para o início da infecção é a ligação da partícula viral a receptores específicos na superfície da célula alvo. Este processo tem início através da ligação da glicoproteína de superfície gp120 do HIV-1 ao receptor CD4 e co-receptores CXCR4 e CCR5 da célula hospedeira (Figura 4).

A molécula de CD4 faz parte da superfamília de imunoglobulinas, sendo um receptor de superfície celular expresso em uma das subpopulações de linfócitos T, em monócitos, e em outras células como macrófagos, células da micróglia e células dendríticas. Além de ser um receptor para HIV, o CD4 também participa do reconhecimento da molécula MHC de classe II durante o processo de apresentação antigênica (Abbas e cols, 2000).

Deste modo poderão se infectar células do organismo que exibam esse marcador de superfície em suas membranas. Destacam-se entre essas células, os linfócitos T auxiliares (CD3+, CD4+, CD8-), por exibirem grandes concentrações da molécula CD4 em suas membranas. Outras células infectadas são as da linhagem monocítico-macrofágica, incluindo a micróglia do sistema nervoso central, as células dendríticas foliculares dos linfonodos e as células de Langerhans da pele. Observa-se ainda adesão do HIV a outras células, entre as quais podemos citar células endoteliais, neurônios, astrócitos e células M das placas de Peyer intestinais (HIV Medicine, 2005).

O tropismo celular do HIV-1 baseia-se nos mecanismos envolvidos nas etapas de invasão de células susceptíveis do hospedeiro (Revisto por Frankel e cols, 1998).

Dois co-receptores foram também identificados, como os principais componentes necessários para que o HIV se incorpore à célula: o primeiro foi o CXCR4, que é utilizado principalmente pelos vírus linfotrópicos e indutores de sincício (SI) *in vitro* e, o segundo, o CCR5 utilizado pelos vírus macrofagotrópicos, não indutores de sincício (NSI) (Figura 4).

As quimiocinas MIP-1 α , MIP-1 β e Rantes são ligantes naturais para o co-receptor CCR5, vários grupos demonstraram que o CCR5 é um co-receptor necessário para a infecção de isolados monocitotrópicos (M-trópicos) de HIV-1 (Deng H e cols, 1996). Isolados M-trópicos são classicamente aqueles que facilmente se propagam em culturas de macrófagos, são incapazes de infectar

linhagens de células T e induzir sincício *in vitro* (NSI-non sincicium inducer), mas são capazes de infectar facilmente células T primárias de amostras de sangue periférico.

De modo oposto, isolados de HIV-1 com tropismo para células T foram identificados como sendo aqueles que se propagavam facilmente em linhagens T e mostravam capacidade de induzir sincício em células MT-02 (SI-sincicium inducer) replicavam pouco em macrófagos, mas eram igualmente capazes de infectar com facilidade células T primárias de sangue periférico (Fenyo e cols, 2000). Assim, é de notar que tanto as variantes de HIV-1 M-trópicas como as T-trópicas podem facilmente infectar *in vitro* células T primárias humanas.

As quimiocinas, "citoquinas quimiotáticas", e os seus receptores foram previamente caracterizados tendo em atenção, o seu papel na promoção da migração ("quimiotaxia") dos leucócitos e da sua actividade pró-inflamatória. O SDF-1 ("factor 1 derivado de células do estroma") foi identificado como o ligante natural do CXCR4 e é capaz de inibir a entrada de isolados T-trópicos de HIV-1 em células T CD4⁺ activadas. Rantes, MIP-1 α ("proteína inibidora de macrófagos") e MIP-1 β representam os ligandos naturais do CCR5 e são capazes de inibir a entrada de isolados M-trópicos em células T (HIV Medicine, 2005).

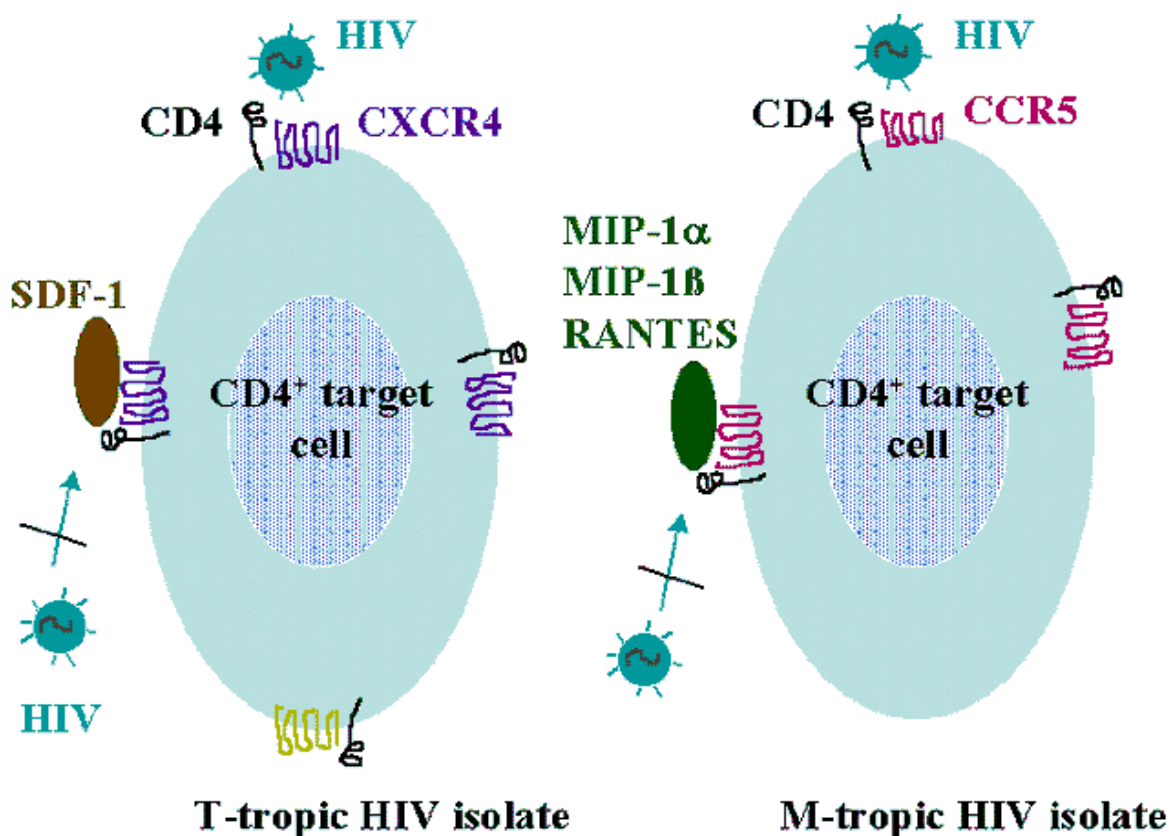


Figura 4: Modelo esquemático mostrando: isolados T-trópicos de HIV-1 infectam principalmente células T CD4⁺ activadas do sangue periférico e linhas celulares e usam o CXCR4 para a entrada em células alvo positivas CD4⁺. Isolados M-trópicos são capazes de infectar células T CD4⁺, monócitos, e macrófagos e dependem do uso do CCR5 e do CD4 para a entrada viral.

Após a ligação específica da gp120 a determinados epítomos do receptor CD4 ocorrerão alterações conformacionais na glicoproteína gp120 que promoverá uma interação mais eficiente da alça V3 da gp120 com o respectivo co-receptor. O processo de fusão das membranas celular e viral é dependente da ligação gp120-co-receptor. A gp41, como zona transmembranar da proteína do invólucro gp160, é crucial para a fusão do vírus à membrana da célula hospedeira. Após a ligação da gp120 ao CD4, é também induzida uma alteração conformacional na gp41 que lhe permite inserir o seu terminal-NH₂ hidrofóbico na membrana da célula hospedeira. (Chan e cols, 1997). A identificação das sequências de aminoácidos importantes neste processo foram utilizadas para sintetizar péptidos que se possam ligar à gp41 nos seus domínios que são críticos para a indução de alterações conformacionais e podem inibir a fusão membranar (HIV Medicine, 2005).

A importância dos diferentes co-receptores celulares do HIV na infecção da célula CD4 pôde ser demonstrada com a descoberta de que o genótipo homozigoto para a deleção $\Delta 32$ do gene CCR5 confere resistência, embora não absoluta, à infecção pelo HIV (Liu e cols 1996) e que o genótipo heterozigoto está associado com uma progressão clínica mais lenta (Dean e cols, 1996). O conhecimento do envolvimento dos co-receptores nos processos de ligação e infecção do HIV à célula, abriu novas possibilidades para o estudo e utilização de novas drogas anti-retrovirais. Uma variedade de novos agentes terapêuticos está sendo projetada para bloquear a infecção impedindo a entrada e fusão do HIV com a célula hospedeira (HIV Medicine, 2005).

A glicoproteína do envelope da superfície do vírion, a gp120, consiste em cinco domínios variáveis (V1-V5) e em cinco domínios conservados (C1-C5) (Poignard e cols, 2001). Acredita-se que a afinidade da molécula de CD4 pela gp120 se dá pela interação entre os domínios C3 e C4 da gp120 e do domínio extracelular da porção N-terminal do CD4. Uma vez que o HIV penetrou na célula, seu material genético (RNA) é liberado no citoplasma da célula hospedeira (Figura 5). O RNA viral é convertido em cDNA, processo chamado de transcrição reversa, realizado pela enzima transcriptase reversa. Seguindo-se a transcrição reversa, um processo nucleoproteico é rapidamente transportado para o núcleo da célula hospedeira em um processo mediado pela proteína *Vpr* (Cohen e cols, 1996). A ação da integrase, resulta na integração estável do cDNA do genoma viral no DNA cromossômico. Os RNAs virais transcritos são expressos a partir do promotor localizado no 5' LTR e a proteína acessória *Tat* aumenta a velocidade de transcrição

(Puglisi e cols, 1992). O conjunto de RNAs transcritos, é então transportado para o citoplasma (Figura 5), onde serão então traduzidos, ou constituirão novas partículas virais em um processo regulado pela *Rev* (Hope, 1997).

Os vírions são inicialmente montados próximos à membrana celular na forma de partículas imaturas, compostas de um envelope glicoprotéico, RNA genômico e poliproteínas virais. Após ou durante o brotamento, as partículas virais passam por uma modificação morfológica conhecida como maturação, que consiste na clivagem de poliproteínas gag e gag-pol pela protease viral, produzindo as enzimas de replicação e proteínas estruturais do capsídeo (Kaplan e cols, 1994). O processamento das poliproteínas no vírion completa o ciclo de replicação do HIV, os vírions maduros são então capazes de infectar outras células (Figura 5).

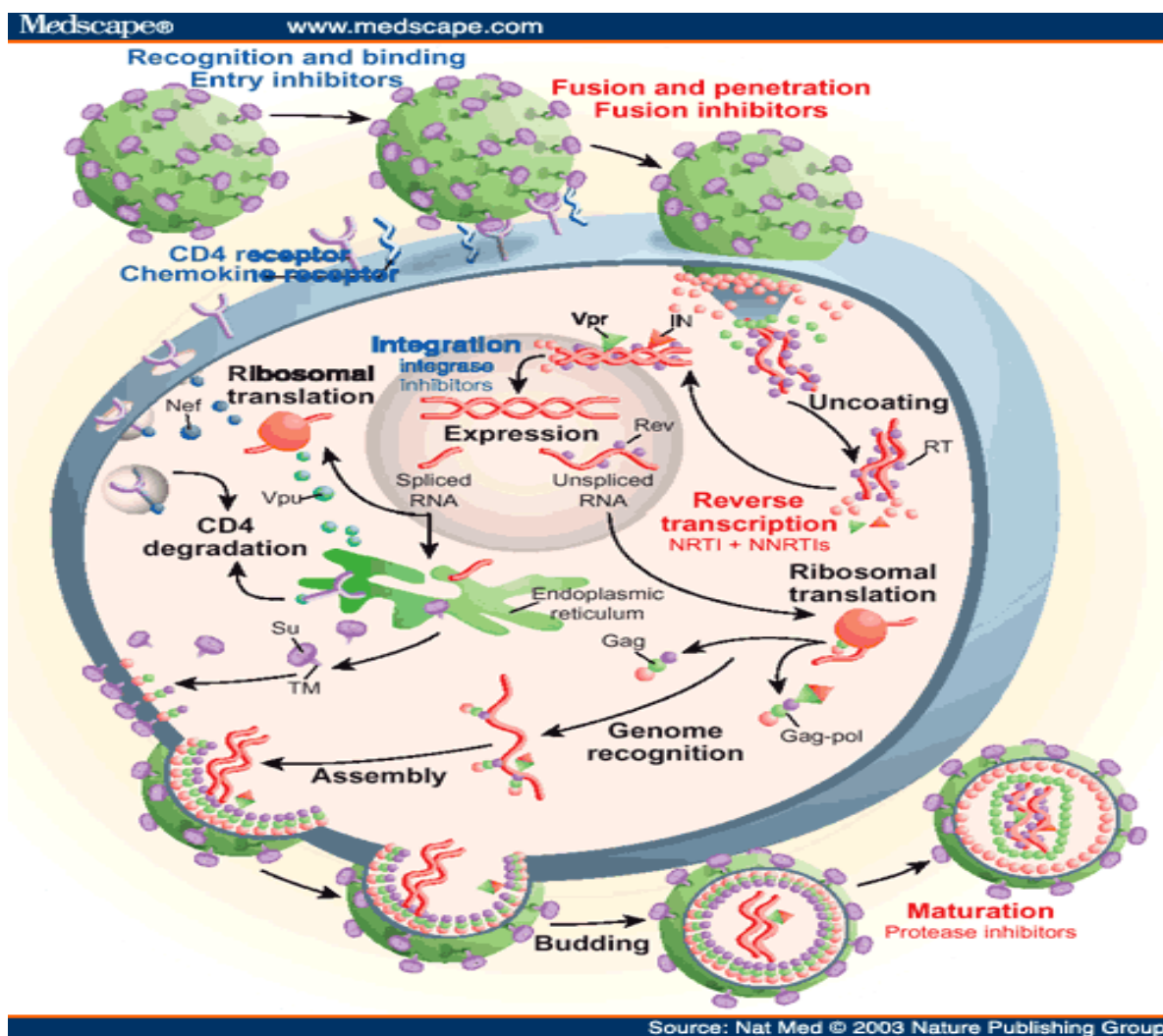


Figura 5: Representação das principais etapas do ciclo de replicação do HIV, indicando as etapas alvo dos inibidores da transcriptase reversa e os inibidores da protease. O texto em vermelho indica os alvos dos agentes anti-retrovirais aprovados pelo FDA, o texto em azul indica os prováveis alvos futuros. Retirado do site www.medscape.com disponível na internet.

História natural da infecção

Durante o curso clínico da infecção são identificadas três fases bem distintas (Figura 6). A fase inicial ou infecção aguda que pode durar de 4 a 8 semanas sem sintomas clínicos específicos, onde frequentemente ocorrem febre, dor de cabeça, náusea entre outros sintomas comuns a outras doenças virais. Também nessa fase, há uma queda no número de células T CD4+ no sangue periférico, e a presença de níveis elevados de viremia, que pode ser preditivo do início do curso clínico da infecção pelo HIV-1, e disseminação viral. A quantificação do RNA viral é clinicamente informativa, visto como uma das melhores ferramentas no monitoramento da infecção e também da eficácia do tratamento anti-retroviral (Katzenstein, 2003).

A regressão dos sintomas acompanha o início de uma segunda fase, a latência clínica também conhecida como fase crônica ou assintomática da infecção, que pode durar em média 10 anos (Figura 6) ou até que inicie as infecções oportunistas ou quadros clínicos graves e persistentes, caracterizando o aparecimento da AIDS, a terceira fase da doença (Pantaleo e Fauci, 1996).

A infecção primária cursa com o desenvolvimento de resposta humoral e celular aos antígenos do HIV, seguindo-se por um período prolongado de latência clínica, o qual geralmente é assintomático. Diferentes eventos imunológicos podem ocorrer nessa fase como, linfócitos CD4 infectados perdem a habilidade de induzir as células B a secretarem imunoglobulinas, falhando na secreção de citocinas tais como IL-2. Anticorpos induzidos contra a gp120 expressa em células infectadas estimulariam a citotoxicidade celular dependente de anticorpo (adcc) contra estas células, bem como, moléculas de gp120 que circulam livres no sangue se ligariam às células infectadas que expressam CD4 sobre sua superfície e estas células seriam lisadas por células da resposta imune (Abbas e cols, 2000).

A história natural da infecção pelo HIV-1 começou a ser alterada a partir da segunda metade da década de 90 com o surgimento da terapia anti-retroviral de alta atividade (HAART-“High active antiretroviral therapy”). Atualmente, o tratamento da infecção pelo HIV-1, utiliza a combinação de pelo menos três drogas de duas diferentes classes de anti-retrovirais (Consenso Brasileiro para Terapia Antiretroviral 2005 – www.aids.gov.br). Estas drogas inibem a multiplicação do vírus, revertendo quadros clínicos sintomáticos e o estado de imunossupressão observados em pacientes com AIDS (Marins e cols 2003). Nos indivíduos assintomáticos, a HAART

pode impedir a progressão da doença, aumentando com isso a sobrevivência destes pacientes e reduzindo as taxas de morbidade e mortalidade associadas a esta infecção no mundo (Osmanov e cols, 2002) e no Brasil (Marins e cols, 2003).

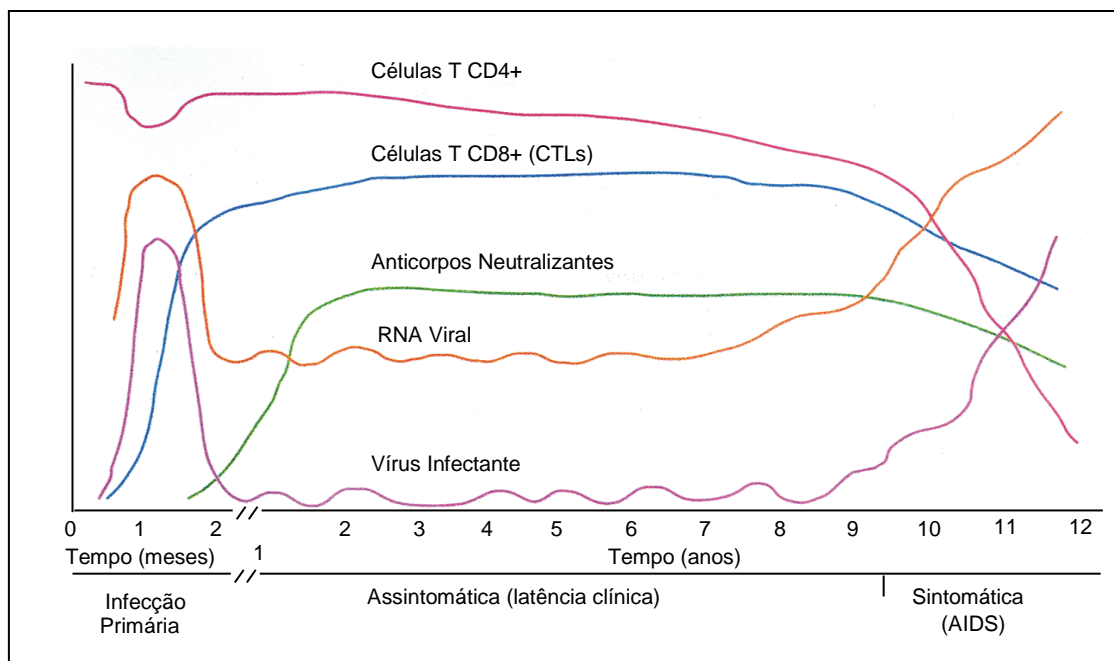


Figura 6: Cursos clínicos, imunológicos e virológicos da infecção pelo HIV-1.

Adaptado de Pognard e cols, 1996.

Diversidade do HIV

Sabe-se que as taxas evolutivas dos vírus RNA são consideravelmente maiores do que aquelas de seus hospedeiros eucarióticos. As razões que explicam esta heterogeneidade genética são: a elevada taxa de erro da enzima transcriptase reversa em conjunto com a alta taxa de geração de populações virais. O genoma diplóide que favorece eventos de recombinação entre os diversos genótipos (Alaeus, 2000), a existência de fortes pressões seletivas exercidas pelo sistema imune e/ou anti-retrovirais (Ho e cols, 1995; Spira e cols, 2003), além do tropismo e “fitness” viral (capacidade replicativa do vírus), criam um repertório de formas virais genéticas heterogêneas nos indivíduos cronicamente infectados pelo HIV, conhecido como quasispécies virais (Zhang e cols, 1997).

O “fitness” viral refere-se à adaptabilidade do mesmo em um determinado meio ambiente, tem relação com a capacidade que este vírus tem em replicar, ser transmitido ou infectar as células. Tratamentos sub ótimos ou aderência incompleta a terapia anti-retroviral estão entre os principais pontos de emergência de variantes resistentes às drogas (Hirsch e cols, 1998). Isto resulta na seleção de variantes resistentes com menor capacidade replicativa ou fitness reduzido, no entanto devido a plasticidade do genoma do vírus, mutações compensatórias são selecionadas, levando a um aprimoramento do “fitness viral” (Quinones-Mateu e cols, 2002).

A restauração da capacidade replicativa do vírus (“fitness” viral) está associada ao surgimento destas mutações acessórias ou secundárias (Hirsch e cols, 1998), e a natureza compensatória destas mutações é necessária à manutenção da funcionalidade estrutural da protease (Pieniazek e cols, 2000), levando também ao aumento do nível de resistência fenotípica aos inibidores da protease (IPs). A presença de mutações nos sítios de clivagem da protease também constitui um mecanismo de atividade compensatória, podendo corrigir a perda de “fitness” viral associada à resistência (Mammano e cols, 1998).

O acúmulo de múltiplas mutações pode levar à restauração compensatória do “fitness” replicativo dos vírus mutantes, que pode chegar ao nível dos vírus selvagens (Martinez-Picado e cols, 1999), além de promover um aumento do nível de resistência fenotípica às drogas.

Classificação do HIV

As análises filogenéticas de numerosas amostras de HIV-1 provenientes de diversas localidades geográficas permitiram estabelecer a classificação do HIV em tipos, grupos, subtipos, sub-subtipos e formas recombinantes circulantes (CRFs) (Robertson e cols, 2000).

Os dois tipos de vírus da AIDS, o HIV-1 e o HIV-2 são diferenciados com base na sua organização genômica e nas relações filogenéticas entre si, e entre os outros retrovírus de primatas. Para o HIV-1 foram descritos três grupos distintos: M (major), O (outlier) (Jaffe e cols, 1998) e N (new) (Simon e cols, 1998). Destes, o mais prevalente é o grupo M, responsável pela atual pandemia, que ainda é subdividido em pelo menos nove subtipos classificados como A, B, C, D, F, G, H, J, K, além de dezessete formas recombinantes circulantes (CRFs), tendo como origem a África Central (Kandathil e cols, 2005).

O subtipo F foi inicialmente dividido em três sub-subtipos F1, F2 e F3 (Triques e cols, 1999), mas análises posteriores levaram a reclassificação do sub-subtipo F3 como o novo subtipo K (Triques e cols, 2000). Um ano após, Gao e cols subdividiram o subtipo A em A1 e A2 (Gao e cols, 2001).

A variabilidade genética que distancia as diferentes amostras do grupo M entre si pode chegar à cerca de 30% para as seqüências do gene *env*, cerca de 15% para as seqüências do gene *gag* (Takebe, 2004), e 5% para as seqüências do gene *pol* (Los Alamos, 2004). Já para os grupos de HIV-1 esta diferença genética pode chegar a 35% na sua estrutura.

O surgimento de formas recombinantes pode ser considerado uma propriedade fundamental dos retrovírus em razão da natureza diplóide de seu genoma de RNA e da possibilidade da transcriptase reversa atuar numa ou noutra fita durante a síntese do cDNA, em células infectadas por mais de uma variante viral (Robertson, 1995).

As CRFs descritas até o momento são: CRF01_AE, CRF02_AG, CRF03_AB, CRF04_cpx, CRF05_DF, CRF06_cpx, CRF07_BC, CRF08_BC, CRF09_cpx, CRF10_CD, CRF11_cpx, CRF12_BF, CRF13_cpx, CRF14_BG, CRF15_01B e CRF16_A2D. Recentemente, foi identificada em Cuba uma nova forma recombinante, a CRF18_cpx, apresentando seqüências dos subtipos A1, F, G, H e K (Thomson e cols, 2005). Para que seja classificada como uma CRF é necessário que um vírus recombinante seja identificado em pelo menos três indivíduos não

relacionados epidemiologicamente e caracterizado através do sequenciamento completo do seu genoma (<http://hiv-web.lanl.gov>). De uma célula duplamente infectada pode sair um vírus que possua uma fita de RNA de cada vírus de subtipos diferentes gerando um recombinante. Se esta cepa tiver um bom índice de replicação (fitness), ela poderá se fixar e se expandir na corrente sanguínea do indivíduo infectado e, inclusive, ser transmitida (Barbour e Grant, 2005). A recombinação genética tem sido descrita em todos os níveis filogenéticos: entre lentivirus de primatas, entre tipos e grupos do HIV-1, entre subtipos e sub-subtipos e intra-subtipos virais. Esta recombinação tem implicações importantes para o entendimento da epidemia do HIV, na patogenia da doença, na resistência às drogas e no desenvolvimento de vacinas (Peeters e cols, 2000; Rambaut e cols, 2004).

O HIV-2 pode ser dividido em 8 subtipos de A – H. Entre esses vírus, os subtipos A e B estão circulando na população humana em regiões africanas e os subtipos de C – H representam apenas descrições de infecções únicas também em alguns lugares da África, identificadas através da amplificação de fragmentos genômicos por PCR em amostras retrospectivas procedentes de alguns países do oeste africano (Damond e cols, 2004).

O HIV-2 possui aproximadamente 50% de homologia entre as seqüências de aminoácidos com o HIV-1. O HIV-2 é menos transmissível, sendo raramente transmitidos de mãe para filho, estes eventos podem também estar associados com carga viral mais baixa, queda mais lenta de células T CD4 e maior tempo de progressão clínica para a AIDS observada na infecção pelo HIV-2. (O'Donovan e cols, 2000).

Distribuição dos subtipos no mundo

Os estudos sobre a epidemiologia molecular do HIV são fundamentais para a compreensão sobre a dinâmica da epidemia, com implicações no melhor entendimento da sua transmissibilidade, progressão clínica, resposta ao tratamento anti-retroviral e das próprias circunstâncias que envolveram o início da pandemia.

O grupo M do HIV-1 é prevalente em todo o mundo e agrupa a maioria dos vírus responsáveis pela pandemia de AIDS (Figura 7). Os grupos N e O são geograficamente restritos a países da África Ocidental e Central (Yamaguchi e cols 2003). Atualmente, todos os tipos, grupos, subtipos e boa parte das CRFs do HIV são encontrados na África (Osmanov, 2002) .

Os subtipos e as formas recombinantes do HIV-1 estão distribuídos a nível mundial mostrando faixas de ocorrência definidas (Figura 7). Atualmente, o subtipo C é o mais prevalente no mundo, sendo também o responsável pela expansão da epidemia mundial, responsável aproximadamente pela metade do número de novas infecções (Alaeus, 2000).

O subtipo A1 é a forma viral mais prevalente na pandemia depois do subtipo C, seguido pelo subtipo B que mostra uma maior distribuição em países da Europa, EUA e América do Sul (Osmanov e cols, 2002). Atualmente, a forma recombinante CRF02_AG foi estimada como sendo a principal forma recombinante do HIV-1 responsável por novas infecções na África (Osmanov, 2002). O subtipo A predomina na África Central e tem apresentado um papel crescente também na epidemia Russa (Bobkov e cols, 2004). Os subtipos B e D são os mais próximos do ponto de vista filogenético e provavelmente derivam de um ancestral comum (Robertson e cols, 1995). Recentemente no estado do Rio de Janeiro, nosso grupo realizou a análise filogenética de cinco amostras de pacientes infectados com o subtipo D, e chegou a conclusão de que todas as amostras autóctones apresentavam relação filogenética com amostras provenientes da África do Sul, mostrando que este subtipo já se encontra introduzido e circulante na região sudeste do país (Couto-Fernandez e cols, 2005).

O subtipo F está presente no Brasil (Morgado e cols, 1994, Morgado 1998), Argentina (Campodónico e cols, 1996), Romênia (Apetrei e cols, 1994), Bolívia (Velarde-Dunois e cols, 2000) e Venezuela (Castro e cols, 2003).

A presença dos subtipos G e H foi documentada no Gabão, Rússia e Uganda (Janssen e cols, 1997), enquanto que o subtipo J foi encontrado somente na África

Central e o subtipo K na República Democrática do Congo e República dos Camarões (Korber e cols, 1995).

Em muitos países europeus, da América do Sul, América do Norte e Austrália observa-se amplo predomínio do subtipo B (figura 7). Na França, por exemplo, apesar a ocorrência de múltiplos subtipos, apenas uma minoria de casos é atribuída a subtipos não-B (Couturier e cols, 2000). Aproximadamente, 12% da pandemia global do HIV correspondem ao subtipo B (Osmanov e cols, 2002).

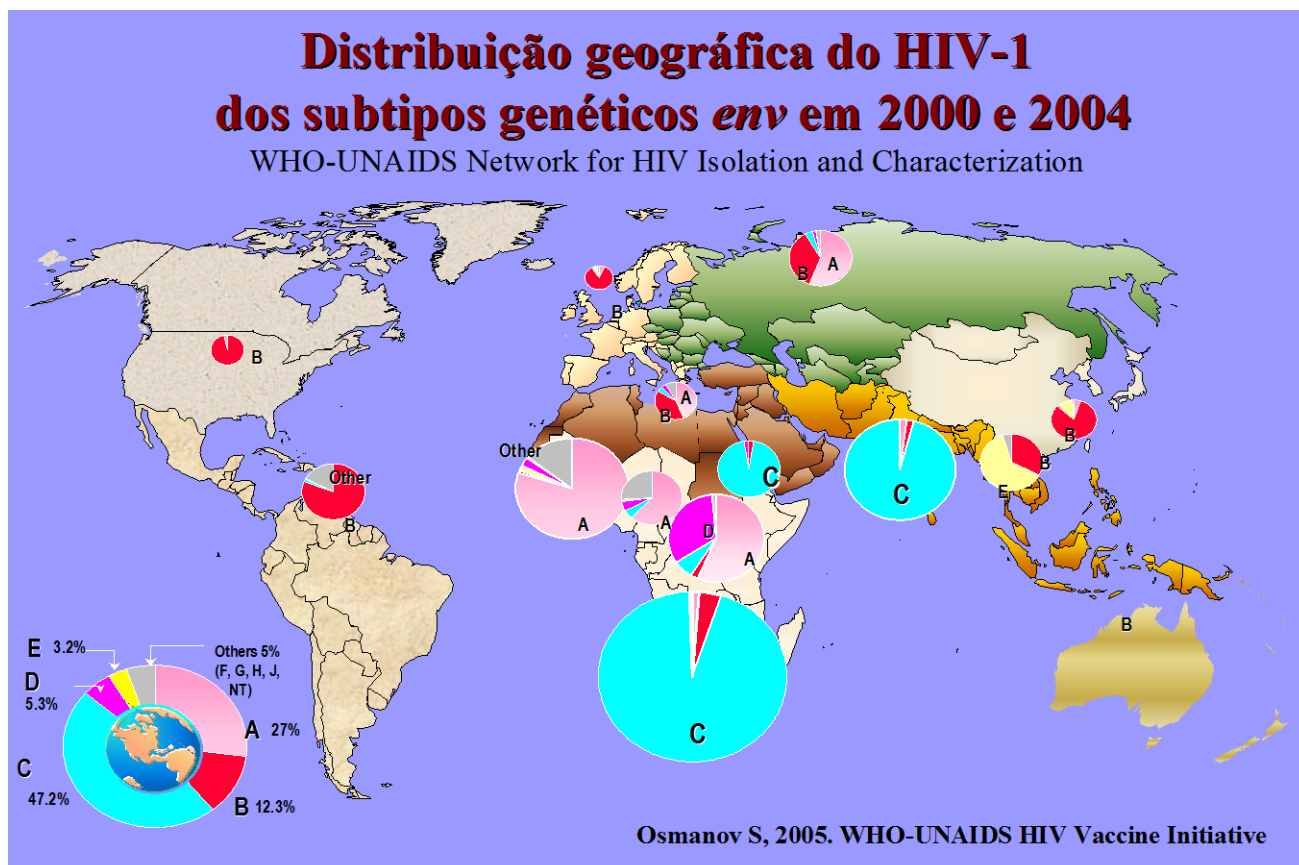


Figura 7: Distribuição dos subtipos no mundo, retirado e adaptado do site da Rede de Isolamento e Caracterização do HIV WHO-UNAIDS.

Diversidade genética do HIV-1 no Brasil

O HIV-1 foi isolado pela primeira vez no Brasil em 1987 pelo grupo de pesquisas em HIV/AIDS da Fiocruz a partir de um paciente do Rio de Janeiro (Galvão-Castro e cols, 1987). A distribuição dos subtipos no Brasil é complexa quando comparada com outros países da América do Sul. O principal subtipo circulante é o subtipo B, embora resultados de vários estudos realizados no país mostram a presença dos subtipos C, principalmente no Sul do país (WHO, 1994; Loureiro, 1998; Stefani e cols, 2000), subtipo F (Morgado e cols, 1994; Couto-Fernandez e cols, 1999; Vicente e cols, 2000; Stefani e cols, 2000), subtipo D (Morgado e cols, 1998^a; Couto-Fernandez e cols, 2006), subtipo A (Caride e cols, 2000), além de genomas recombinantes B/F (Sabino e cols 1994, Couto-Fernandez e cols, 2005) e B/C (Cornelissen e cols, 1996, Guimarães e cols, 2002). Revisto por Morgado e cols, 2002. Recentemente, houve a primeira descrição da forma recombinante africana CRF2_AG no Rio de Janeiro (Couto-Fernandez e cols, 2005). Estes dados encontram-se sumarizados na figura 8.

Diferenças genéticas e antigênicas têm sido descritas entre os vírus do subtipo B circulantes no Brasil, com a ocorrência de uma variante do subtipo B denominada B”, que se difere do subtipo B clássico por apresentar um motivo GWGR no topo da alça V3 da glicoproteína do envelope gp120, ao invés de GPGR em sua assinatura molecular (Potts e cols, 1993; Morgado e cols, 1994; Covas e cols, 1998).

A presença do subtipo C no Sul do Brasil foi detectada primeiramente em amostras colhidas em um estudo da Organização Mundial da Saúde, visando descrever os subtipos virais em regiões onde se planejavam futuros testes de vacinas (WHO, 1994). Posteriormente, estudos com amostras de Porto Alegre, obtidas em 1998 (Guimarães e cols, 2002) e de Rio Grande (de Martinez e cols, 2002) já evidenciaram uma proporção importante deste subtipo (30%) nas amostras no sul do país. Brindeiro e cols em 2003 em um trabalho da Rede Brasileira de Vigilância de Resistência às Drogas (REVIRE) confirmaram a presença de uma alta proporção do subtipo C em estados do sul, e o subtipo F como sendo o subtipo não – B mais prevalente no resto do país de maneira geral (Brindeiro e cols, 2003).

Dados de Soares e cols mostraram que o subtipo C entrou no país através de uma introdução única ou através de um grupo de vírus geneticamente relacionados,

pois quando comparados com outros vírus do mesmo subtipo formavam um grupo monofilético (Soares e cols, 2003).

Estudos recentes mostraram variações entre subtipos nas taxas de transmissão vertical, alguns autores sugerem que o subtipo materno possa ter um papel importante na transmissibilidade e na patogenicidade da transmissão. Existem evidências de que é mais comum que a transmissão ocorra com o subtipo D do que com o subtipo A (Yang, 2003), e o subtipo C é mais facilmente transmitido do que os subtipos D e A (Renjifo, 2003).

Estudos comparando a diversidade genética de isolados virais maternos com o do recém-nascido indicam que a heterogeneidade viral nestes é bem mais reduzida, sugerindo a ocorrência de seleção de determinadas variantes virais durante a transmissão vertical (Wolinsky e cols, 1992). No entanto, o papel da variabilidade genética do HIV-1 na transmissão vertical não foi ainda esclarecido.

Epidemiologia Molecular do HIV-1 no Brasil



Updated 2005

Figura 8: Distribuição dos subtipos no Brasil, retirado e adaptado do site da OMS.

Resistência Viral

Um aspecto de grande relevância analisado neste estudo é a questão da resistência viral. Considerando que as mulheres incluídas na análise desconheciam seu “status” sorológico quanto à infecção pelo HIV e que, portanto, não estavam sendo submetidas à terapia anti-retroviral, a possível identificação de variantes resistentes reflete a ocorrência destas circulando na população. A existência de resistência primária ao AZT poderá se refletir na transmissão de variantes resistentes ao feto, limitando, assim, o efeito benéfico da droga (Boletim epidemiológico PN-DST-AIDS, Ministério da Saúde, 2004). A utilização da genotipagem no período de gestação pode levar à modificações nas estratégias terapêuticas de forma a prevenir a transmissão vertical, uma vez que através desta metodologia pode-se avaliar a presença de variantes resistentes apresentando em seu genoma mutações associadas à resistência aos anti-retrovirais.

O desenvolvimento de medicamentos anti-retrovirais, capazes não somente de controlar a infecção, mas também promover a eliminação parcial do vírus, assim como, de vacinas anti-HIV/AIDS, têm sido os objetivos de inúmeros estudos em todo o mundo. Os anti-retrovirais disponíveis hoje permitem controlar a replicação viral e prolongar a vida do paciente, reduzindo os sintomas da doença e melhorando as funções imunológicas (Marins e cols, 2003).

O maior obstáculo para a eficácia a longo termo da terapia anti-retroviral é o surgimento de variantes do HIV-1 que reduzem a susceptibilidade aos agentes anti-retrovirais (Shafer e cols, 2003).

As análises genotípica dos vírus de diferentes subtipos mostram mudanças de nucleotídeos chamadas mutações, que podem ser silenciosas ou levarem a mudança de aminoácidos, gerando polimorfismos associados à resistência. As mutações nas regiões da transcriptase reversa e da protease implicam na emergência de resistência respectivamente aos inibidores da transcriptase reversa nucleosídeos (NRTIs), inibidores da transcriptase reversa não-nucleosídeos (NNRTIs) e inibidores da protease (PIs) atualmente usados no tratamento da AIDS, como descritos nas figuras 9 e 10.

Em relação aos inibidores da protease além das mutações principais, encontramos também as mutações acessórias relacionadas à resistência e ao “fitness” viral. Em pacientes virgens de tratamento, muitas destas mutações não conferem resistência às drogas, mas facilitam o desenvolvimento de resistência. Acredita-se que estes

polimorfismos pré-existentes podem acelerar o aparecimento de mutações de resistência aos NNRTIs em subtipos não-B (Spira e cols, 2003).

A resistência aos anti-retrovirais é um mecanismo de seleção natural, com a pressão seletiva do meio ambiente em que o vírus vive. Na presença dos anti-retrovirais, cepas virais mais adaptadas a este meio ambiente vão ser selecionadas e se expandir. Esta seleção acontece muito facilmente no caso do HIV em função do ciclo dinâmico de replicação do vírus. Levando em consideração o índice de erros de incorporação de nucleotídeos da transcriptase reversa que não tem função reparadora ($2,7 \times 10^{-5}$ mutações / ciclo replicativo), o altíssimo índice de replicação do vírus, em que uma pessoa cronicamente infectada e sem tratamento produz e elimina em média 10 bilhões de vírus diariamente, associado ao tamanho do genoma viral, que é de aproximadamente 10 mil pares de base. Vemos que todas as mutações possíveis podem ser geradas diariamente ao longo do genoma do HIV-1. Essa diversidade genética é a grande chave do mecanismo de escape, propiciando resistência *in vitro* aos anti-retrovirais (Diaz, 2004).

Essa alta taxa de erro da transcriptase e o dinamismo do vírus levam a possibilidade de acumulação de mutações de resistência se a supressão da viremia não for completa (Katzenstein, 2003).

O uso expandido de anti-retrovirais na terapia anti-HIV/AIDS tem levado a uma tendência de aumento dos níveis de resistência primária ao longo do tempo. A resistência primária é a resistência às drogas detectadas em pacientes virgens de tratamento anti-retroviral. Normalmente, a resistência primária está associada à transmissão de cepas de HIV-1 com mutações de resistência e implica a possibilidade de uma menor eficácia por ocasião do tratamento. A resistência secundária é a resistência aos anti-retrovirais decorrentes da pressão seletiva exercida pelas drogas, são todas aquelas mutações que emergem decorrente da falha ao tratamento em suprimir a replicação do HIV-1 (HIV Medicine, 2005).

A enzima transcriptase reversa é essencial para a replicação do HIV-1, uma vez que a expressão das proteínas virais e a progênie viral dependem da conversão da cadeia simples de RNA em cadeias duplas de DNA e subsequente integração do provírus ao genoma da célula hospedeira. Inibidores da transcriptase reversa, tal como o AZT, foram um dos primeiros medicamentos anti-HIV, e são ainda muito usados no tratamento de pacientes infectados (Consenso Brasileiro para Terapia Anti-retroviral, disponível no site: www.aids.com.br). Inibidores da transcriptase reversa são divididos em duas classes: análogos nucleosídeos e não-nucleosídeos

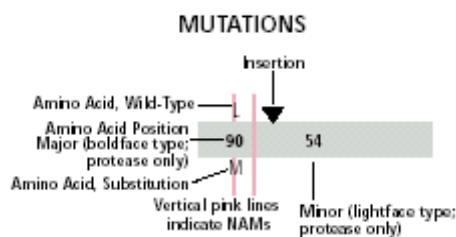
da transcriptase reversa, classificados pela sua estrutura química e pela maneira como inibem a ação da enzima transcriptase reversa.

A enzima protease do HIV-1 é responsável pelo processamento pós-traducional das proteínas virais. Os inibidores da protease se tornaram importantes agentes farmacológicos no tratamento da infecção pelo HIV-1 (Kakuda e cols, 1998), atuando no bloqueio da produção de vírus infecciosos pelas células infectadas através da inibição da clivagem das poliproteínas precursoras necessárias à produção de partículas virais infecciosas. A resistência associada a mutações no gene da protease pode ser decorrente de substituições de aminoácidos no sítio ativo ou a uma região próxima a ele, interferindo, portanto na ligação do inibidor devido às mudanças conformacionais ocorridas ou ainda, de substituições de aminoácidos fora da região ativa (Miller, 2001). Essas mutações podem ser principais (“major mutations”), ou acessórias ou secundárias (“minor mutations”).

A mutação principal é aquela que produz significativa perda de susceptibilidade ao anti-retroviral que a selecionou. A mutação acessória ou secundária é a mutação que emerge normalmente para recuperar o “fitness” perdido pelo aparecimento da mutação principal, propiciando uma perda de susceptibilidade ao anti-retroviral que a selecionou. Um acúmulo de grande número de mutações secundárias pode levar a uma perda de sensibilidade equivalente à proporcionada pelas mutações principais (Shafer, 2002).

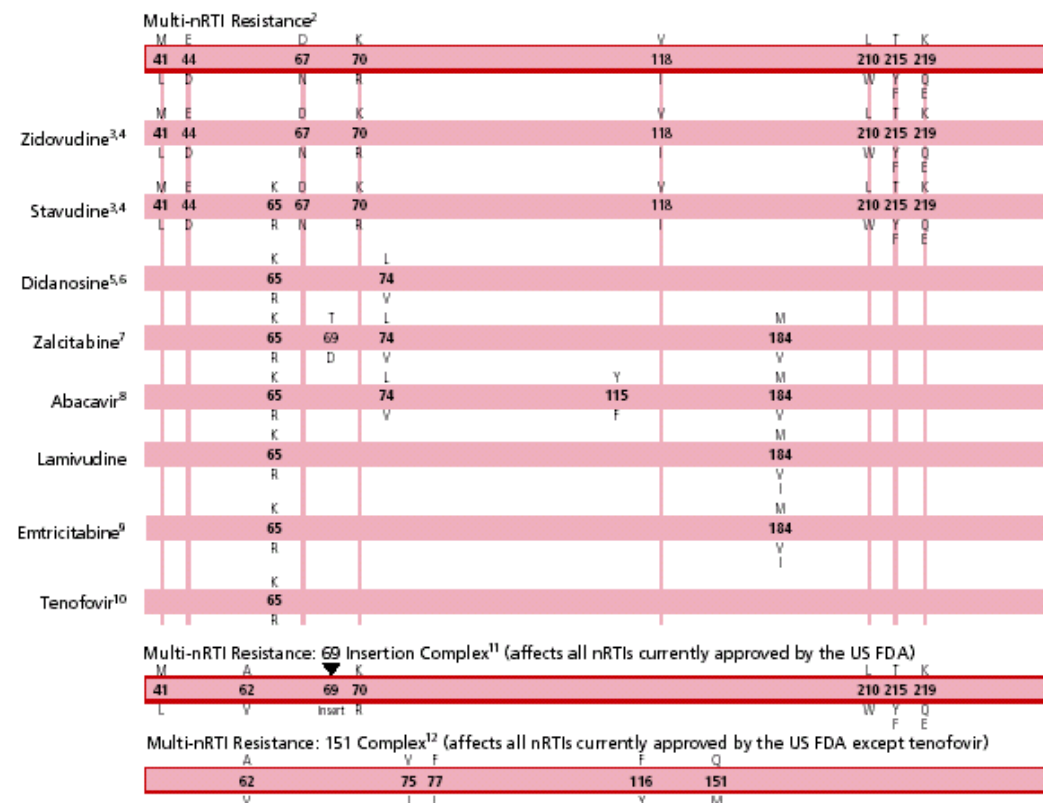
Podemos analisar melhor essas mutações, tanto primárias quanto secundárias aos inibidores da protease, assim como, as mutações relacionadas aos inibidores da transcriptase reversa nucleosídeos e não nucleosídeos através das figuras 9 e 10.

Para entendermos a denominação utilizada no site do IAS (“International AIDS Society”), utilizamos como modelo a figura abaixo, onde a letra indicada acima da barra indica o aminoácido selvagem, o número indicado dentro da barra indica a posição do aminoácido, quando este se encontra em negrito indica que apresenta uma mutação principal. A letra que se encontra abaixo da barra indica a substituição do aminoácido. No exemplo abaixo temos uma mutação na posição 90 da região da protease onde houve a substituição de uma leucina por uma metionina.



MUTATIONS IN THE REVERSE TRANSCRIPTASE GENE ASSOCIATED WITH RESISTANCE TO REVERSE TRANSCRIPTASE INHIBITORS

Nucleoside and Nucleotide Reverse Transcriptase Inhibitors (NRTIs)¹



Nonnucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors (NNRTIs)^{1,13}

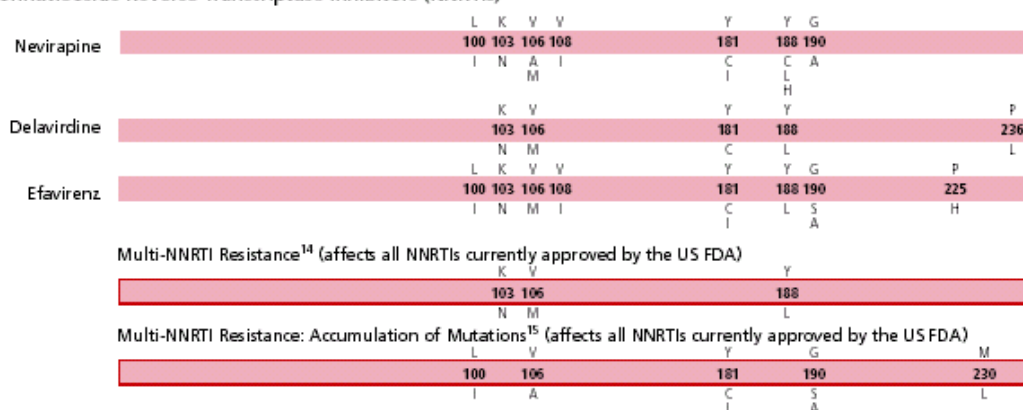


Figura 9: Representação das mutações de resistência aos Inibidores Nucleosídeos da Transcriptase Reversa (NRTIs) e Não Nucleosídeos (NNRTIs). Adquirida através do site: <http://www.iasusa.org> Topics in HIV Medicine, 2005

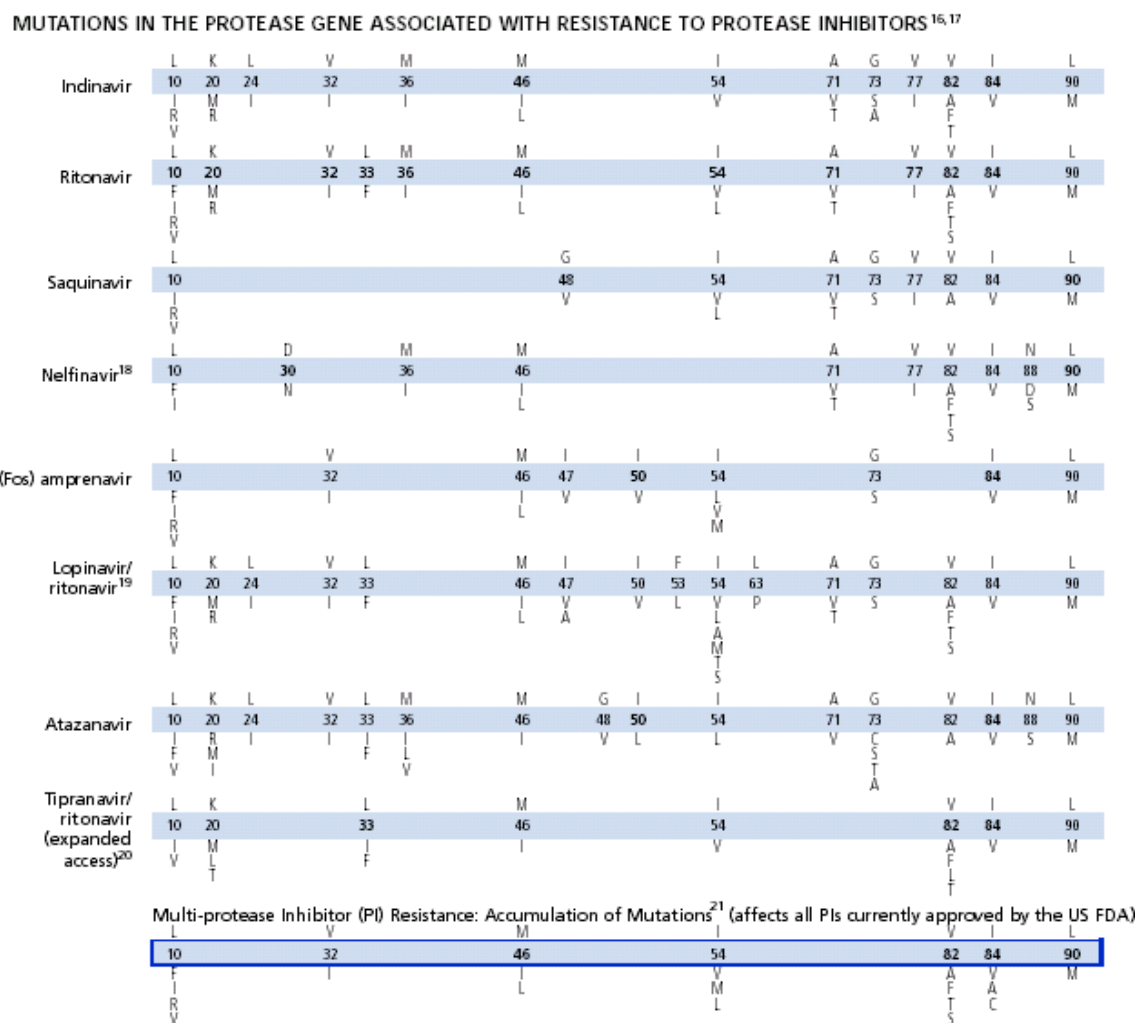


Figura 10: Representação das mutações de resistência aos Inibidores da Protease (PIs). Adquirida através do site: <http://www.iasusa.org> Topics in HIV Medicine, 2005

Feminização da epidemia e Transmissão Vertical

A transmissão vertical, também denominada materno-infantil, é a principal via de infecção pelo HIV em crianças, sendo responsável no Brasil, por mais de 83,6% do total de casos de AIDS em menores de 13 anos (Boletim epidemiológico, PN-DST/AIDS-MS, 2004). Nesta questão é fundamental uma análise inicial da epidemia atual da AIDS entre as mulheres.

Os indicadores epidemiológicos mostram que o padrão de transmissão da AIDS vem mudando no Brasil. O aumento do número de casos associados à subcategoria de exposição heterossexual, verificado principalmente a partir de 1991, fez-se acompanhar de uma proporção cada vez maior de mulheres, constatada na redução da razão de sexo, que atinge gradualmente, 3:1 entre 1993 e 1996, 2:1 em 1997, e 1,5: 1 em 2004. Dos 362.364 casos acumulados de AIDS no País, notificados ao Ministério da Saúde de 1980 a 2004, 111.314 ocorreram em mulheres (30,7 %) (Boletim epidemiológico, PN-DST/AIDS-MS, 2004 - www.aids.gov.br). Em Dezembro de 2004, as mulheres contabilizavam 47% de casos de pessoas vivendo com AIDS no mundo, e 57% só na África Subsaariana. (www.avert.org)

Embora, no geral o número de casos no sexo masculino seja bem mais elevado do que no sexo feminino, a tendência de crescimento dos casos nas mulheres vem sendo mais rápido. Esse fenômeno, denominado de "feminização" da epidemia, é acompanhado por um número cada vez maior de crianças expostas ao vírus durante a gravidez, o parto e amamentação. A participação de usuárias de drogas injetáveis nesse novo padrão de transmissão sexual é acentuada, particularmente nas regiões Sudeste e Sul do País (Szwarcwald e cols, 2000).

A maioria das mulheres soropositivas para o HIV-1 se infecta através de relações heterossexuais. Aparentemente, as mulheres são mais susceptíveis à infecção do que os homens nesse tipo de relação (Cohen e cols, 1998), sendo um dos principais fatores do crescente aumento no número de mulheres infectadas, que de acordo com o CDC, chega a 60% das infecções entre jovens de 15 a 24 anos no mundo.

Outro fator de extrema importância é o fato de que em algumas sociedades a mulher não pode escolher seu marido ou parceiro sexual, e tendo o homem o domínio familiar, elas não podem insistir no uso ostensivo do preservativo, anulando assim qualquer chance de se protegerem (www.avert.org).

Algumas outras questões importantes, que podem representar barreiras na adesão ao acompanhamento médico, como o papel da mulher como provedora da família, ou o medo de revelar-se como HIV+ ao parceiro, parecem afetar desproporcionalmente a população feminina (Zorrilla e cols, 2000).

A pobreza é uma das causas mais comuns da prostituição, que também favorece a transmissão do HIV. As profissionais do sexo fazem parte de um grupo de alto risco e, no intuito de conseguir dinheiro para seu sustento e/ou de seus filhos ou parceiros, muitas mulheres, com medo de perder o cliente, não insistem para que estes usem preservativos. Isto significa que não só elas correm o risco de se tornarem infectadas com HIV, mas também se já forem infectadas, de transmitirem o vírus para seus clientes, e estes o transmitirem para suas parceiras estáveis (www.avert.org). Além disso, estas mulheres são altamente discriminadas dificultando seu acesso aos serviços de saúde. Esta estigmatização aumenta mais a vulnerabilidade deste grupo. Outro fato bastante comum é o estupro, que é uma experiência devastadora para qualquer mulher, e também carrega o risco de infecção pelo HIV. A violência sexual contra a mulher é mais comum em algumas partes do mundo do que em outras (www.avert.org). A África do Sul, por exemplo, tem uma das maiores taxas de violência sexual, acoplada com alta prevalência do HIV. Em algumas partes do continente africano existe uma crença que se um homem infectado tiver relações sexuais com uma virgem, ele se cura da doença; isto leva ao aumento de casos de estupro em jovens mulheres e crianças (www.avert.org).

Em 1994, os resultados do Protocolo 076 do *AIDS Clinical Trial Group* (PACTG 076) evidenciaram uma redução de 67,5% na transmissão vertical com o uso da zidovudina (o AZT) durante a gestação, trabalho de parto e parto e pelos recém-nascidos que foram alimentados exclusivamente com fórmula infantil (Connor, 1994). O recém-nascido deve receber solução oral de zidovudina nas primeiras 2 horas após o nascimento, devendo ser mantido durante as primeiras seis semanas de vida (42 dias).

O crescimento da epidemia na população feminina em idade fértil e a comprovação de que a zidovudina pode reduzir significativamente a transmissão vertical do HIV, levaram o Ministério da Saúde a estabelecer a prevenção da transmissão vertical do HIV como um de seus principais objetivos e a disponibilizar a zidovudina oral e injetável na rede pública de serviços de saúde, garantindo assim, o acesso de todas as gestantes infectadas pelo HIV e seus filhos ao esquema de

tratamento utilizado no protocolo PACTG 076 (Ministério da Saúde, 1997). No mesmo ano, o Ministério da Saúde passou a recomendar que o teste anti-HIV fosse oferecido a todas as gestantes durante o pré-natal, independentemente da identificação de fatores de risco, sempre acompanhado de aconselhamento pré e pós-teste. Apesar desta recomendação, a identificação de gestantes infectadas pelo HIV durante o pré-natal tem sido especialmente difícil, estima-se que em 1998, na região Sudeste, apenas 50% das gestantes eram testadas durante o pré-natal (Santos e cols, 1998). Atualmente, de acordo com dados do Ministério da Saúde, essa taxa subiu para 75%, embora a introdução da terapia combinada para a profilaxia da transmissão vertical já tenha sido implantada no nosso país (Ver consenso adulto para tratamento anti-retroviral disponível no site: www.aids.gov.br).

Considerando-se que os medicamentos anti-retrovirais estão amplamente disponíveis no país, a identificação precisa da gestante infectada constitui-se ainda hoje na principal barreira para a prevenção da transmissão vertical do HIV. No entanto, apesar de todas essas dificuldades nos últimos anos, a incidência de casos de AIDS em crianças vem decrescendo progressivamente em nosso país (Ministério da Saúde, 2005).

A taxa de transmissão vertical do HIV, sem qualquer intervenção situa-se em torno de 20% (Connor, 1994). No entanto, diversos estudos publicados na literatura demonstram a redução da transmissão vertical do HIV para níveis entre 0 e 2% com o uso de anti-retrovirais combinados, com a cesariana eletiva e quando a carga viral é menor do que 1.000 cópias/ml ao final da gestação (Ministério da Saúde, 2005). Nos países desenvolvidos, a ampla implementação de intervenções para a redução da transmissão vertical do HIV, incluindo também a substituição do aleitamento materno, resultaram na redução significativa da incidência de casos de AIDS em crianças (CDC, 2000).

O Ministério da Saúde passou a disponibilizar, a partir de 1999, testes para o diagnóstico rápido da infecção pelo HIV, direcionados principalmente para a população de gestantes com situação sorológica para o HIV ainda não definida, ou seja, mulheres que não foram testadas durante o pré-natal ou que apesar de testadas, desconhecem seu resultado (Resolução do Ministério da Saúde em novembro de 2002, através da portaria nº 2104/GM). Em um estudo conduzido no Brasil (Velooso e cols, submetido 2005) avaliaram a aceitabilidade do teste rápido em uma população de gestantes do Rio de Janeiro e de Porto Alegre, que desconheciam seu status sorológico para o HIV no momento do parto. As

gestantes eram avaliadas quanto à infecção pelo HIV e, no caso de positividade, recebiam AZT endovenoso e seus bebês eram tratados com AZT oral nas primeiras semanas de vida.

Em geral, a maior parte dos casos de transmissão vertical do HIV (aproximadamente 65%) ocorre durante o trabalho de parto e no parto propriamente dito, e os 35% restantes ocorrem intra-útero, principalmente nas últimas semanas de gestação (Kalish, 1997) e através do aleitamento materno (Dunn, 1994) que representa risco adicional de transmissão de 7 a 22% (Bobat, 1997).

A patogênese da transmissão vertical do HIV está relacionada a múltiplos fatores, entre eles, características mais ligadas ao vírus, como a carga viral, o fenótipo, o genótipo e a amplitude da resposta imune humoral e celular poderiam favorecer ou restringir a transmissão vertical do HIV. Fatores maternos, incluindo estado clínico e imunológico, presença de DSTs e outras co-infecções, o estado nutricional da mulher e o tempo de uso de anti-retrovirais na gestação são importantes na transmissão vertical (Lallemant e cols, 2000; João e cols, 2003).

A maioria das crianças nascidas de mães infectadas não se infecta graças a uma série de fatores que influenciam a transmissão materno-fetal, alguns destes revistos por Bongertz (2001). A presença de outras doenças sexualmente transmissíveis, fatores comportamentais como, uso de drogas e prática sexual desprotegida, desnutrição, condições do parto, amamentação, e fatores inerentes ao recém-nascido, tais como prematuridade, baixos pesos ao nascer e fatores relacionados ao aleitamento materno, também contribuem, e estão potencialmente associados com a transmissão do HIV. A presença de deleção do co-receptor CCR5 (CCR5 Δ 32) e de determinados alelos de HLA, poderiam conferir alguma proteção (Bongertz, 2001).

A carga viral elevada e a ruptura prolongada das membranas amnióticas são reconhecidas como os principais fatores associados à transmissão vertical do HIV (Minkoff, 1995; Thea, 1997; Shaffer, 1999). A carga viral nas secreções cérvico-vaginais e no leite materno tem-se mostrado um importante determinante de risco de transmissão intraparto e pela amamentação (Chuachoowong, 2000).

Os bebês nascidos de mães HIV positivas terão anticorpos para HIV no momento do nascimento, uma vez que os anticorpos IgGs atravessam a placenta, com isto o diagnóstico sorológico destes bebês só pode ser realizado conclusivamente após 18 meses de vida (Recomendações para profilaxia da transmissão vertical do HIV e terapia anti-retroviral em gestantes, MS). Para

diagnóstico precoce da infecção em bebês, geralmente são utilizados ensaios para diagnóstico molecular baseados na amplificação do DNA através da técnica da PCR, uma vez que são mais sensíveis. E em casos positivos, confirma-se este diagnóstico através da análise do RNA viral.

Com base nas diferenças epidemiológicas e nos cenários virológicos distintos observados entre as duas regiões (Sul e Sudeste) do Brasil, o presente trabalho tem por objetivo avaliar a distribuição dos subtipos virais nas gestantes provenientes das duas regiões, assim como, a ocorrência de resistência primária aos anti-retrovirais. A possível associação entre estes parâmetros e a transmissão vertical é também discutida neste trabalho.

Objetivos

Objetivo Geral

Avaliar a distribuição dos subtipos virais e a ocorrência de mutações associadas à resistência aos anti-retrovirais em uma população de gestantes identificadas como soropositivas para o HIV no momento do parto e discutir as implicações desta diversidade genética na transmissão vertical em pacientes de duas regiões geográficas do Brasil.

Objetivos Específicos

1. Avaliar a distribuição dos subtipos de HIV-1 nas amostras de gestantes colhidas nas regiões geográficas do Sul (Porto Alegre - PoA) e Sudeste (Rio de Janeiro - RJ) do Brasil;
2. Avaliar a possível associação entre subtipo viral e transmissão vertical do HIV-1 na população;
3. Avaliar o perfil de resistência aos anti-retrovirais na população de gestantes positivas para a infecção pelo HIV-1.

Metodologia

Durante Março de 2000 a Agosto de 2002, o grupo de pesquisa do Laboratório de AIDS e Imunologia Molecular da Fundação Oswaldo Cruz, em cooperação com pesquisadores do Instituto de Pesquisa Evandro Chagas IPEC/Fiocruz, e da parceria internacional com a Universidade da Califórnia (UCLA, EUA), conduziu um estudo multicêntrico focalizando duas regiões brasileiras (Sudeste e Sul), afetadas de forma diferenciada pela epidemia de HIV/AIDS. Este estudo, denominado “Projeto Teste Rápido”, aprovado pelo comitê de ética em pesquisa (CEP-168/02), teve por objetivos: (a) avaliar o uso dos testes rápidos para detecção de anticorpos anti-HIV em gestantes admitidas para o parto, (b) avaliar a prevalência de infecção pelo HIV-1 e o perfil imunológico nestas gestantes, (c) determinar a viabilidade do início da terapia com AZT para gestantes e seus recém-natos nas primeiras horas de vida e (d) monitorar a transmissão vertical do HIV através do estabelecimento do diagnóstico precoce da infecção pelo HIV nos recém-natos por PCR HIV-DNA (Roche).

A fim de facilitar a compreensão dos resultados apresentados nesta tese, apresentamos uma breve descrição do projeto original, a partir do qual selecionamos as amostras biológicas incluídas na presente análise.

Descrição do protocolo “Teste Rápido” (IPEC/FIOCRUZ-UCLA)

Um total de 5.213 gestantes não testadas previamente, que não haviam realizado pré-natal ou sem informação sobre seu status quanto à infecção pelo HIV, aceitaram participar do estudo. Todas as gestantes foram submetidas ao teste rápido Determine™ HIV1/2 (Abbott, EUA) para detecção da infecção pelo HIV, seguindo-se de confirmação sorológica nos casos positivos de acordo com o fluxograma proposto pelo Ministério da Saúde (PN-DST /AIDS, 2005).

Para a confirmação da infecção pelo HIV-1 nas crianças nascidas de mães soropositivas foi utilizado o teste PCR-DNA (Amplicor v.1.5, Roche), obtido por colaboração externa (Universidade da Califórnia, USA).

As instituições envolvidas foram:

- No Rio de Janeiro: Hospital dos Servidores do Estado, Hospital Geral de Nova Iguaçu, Hospital Estadual Rocha Faria, e Maternidade Praça XV;
- No Rio Grande do Sul: Hospital Conceição, Hospital da Santa Casa de Misericórdia, e Hospital Fêmeina.

O recrutamento das participantes foi feito no momento da entrada da gestante a uma das maternidades participantes do estudo. Após breve explicação sobre a epidemia da AIDS, a possibilidade de prevenção da transmissão vertical, e sobre o estudo, as mulheres que decidiram serem voluntárias, receberam um termo de consentimento, para que fosse lido e assinado autorizando a sua inclusão e de seu filho no estudo.

Após a realização do teste rápido e posterior confirmação sorológica da infecção pelo HIV-1, amostras de sangue das mulheres com resultados positivos foram imediatamente coletadas e estocas para nossa análise, proposta nos objetivos já descritos.

O resultado do ELISA encontrava-se disponível antes da liberação da maternidade. A coleta da segunda amostra conforme fluxograma do Ministério da Saúde para afastar a possibilidade de erro, foi realizada no ambulatório durante a primeira consulta após o parto. Estes exames sorológicos foram realizados pelos próprios serviços incluídos no estudo.

O tratamento com AZT injetável nas mulheres positivas foi iniciado imediatamente após o diagnóstico, de acordo com as recomendações para profilaxia da Transmissão Vertical do HIV e Terapia Anti-retroviral em Gestante (Consenso Terapia Adulto, PN-DST e AIDS / Ministério da Saúde, 2004). O AZT xarope foi administrado para o recém-nascido nas primeiras 2 a 8 horas após o nascimento, prolongando-se até a 6ª semana de vida, conforme o Guia de Tratamento Clínico da Infecção pelo HIV em Crianças (Consenso Terapia Pediátrica, PN-DST e AIDS / Ministério da Saúde, 2005).

Todos os bebês nascidos de mulheres identificadas com sorologia positiva para o HIV-1 tiveram o sangue colhido nas primeiras 48 horas após o nascimento, para o diagnóstico precoce da infecção pelo HIV através do HIV DNA PCR (Roche),

permitindo a identificação dos bebês que se infectaram durante a gestação e, portanto antes da intervenção medicamentosa com o AZT. Este exame foi posteriormente repetido com 04 e 08 semanas de vida.

As mulheres com sorologia positiva para o HIV foram aconselhadas a não amamentar de acordo com a conduta padrão adotada pelo Ministério da Saúde Brasileiro. O leite artificial foi fornecido às mulheres sem qualquer custo até pelo menos o 6º mês de vida do bebê. Todos os pares de mãe-filho foram acompanhados em serviços especializados no acompanhamento de pacientes infectados pelo HIV e crianças expostas perinatalmente ao HIV.

Em relação às mães, foram obtidos 10 ml de sangue em tubo sem anticoagulante, visando à obtenção de soro, e 2 tubos de 5ml de sangue com EDTA, visando à realização do hemograma, fenotipagem das subpopulações de linfócitos T CD3⁺/CD4⁺ e CD3⁺/CD8⁺ por citometria de fluxo, preparo de leucócitos para extração de DNA para avaliação do subtipo viral, e da presença de resistência às drogas. Alíquotas de plasma foram estocadas para a avaliação da carga viral.

Dos recém-nascidos, foram obtidos cerca de 3-5mL de sangue em tubo contendo EDTA de forma a realizar o hemograma e a fenotipagem das subpopulações de linfócitos T CD3⁺/CD4⁺ e CD3⁺/CD8⁺, preparar o sedimento de leucócitos para extração de DNA para realização da PCR, e separar 1-2 alíquotas de plasma para a quantificação de carga viral. Além desta primeira coleta no período de 48hs após o nascimento, foram feitas duas coletas adicionais de sangue dos bebês com 4 semanas (1 mês) e com 8 semanas (2 meses), seguindo o mesmo protocolo descrito, de forma a avaliar o momento em que ocorreu e confirmar a infecção pelo HIV-1.

Todas as amostras de sangue das gestantes e dos bebês incluídos no estudo dos serviços clínicos do estado do Rio de Janeiro foram trazidas para o Laboratório de AIDS & Imunologia Molecular (LAIM), IOC / Fiocruz, para realização dos testes laboratoriais e estocagem de todos os espécimes a - 70°C.

As instituições colaboradoras localizadas fora do Rio de Janeiro fizeram o processamento do sangue localmente, (fenotipagem de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ e preparo de pellet de leucócitos) e estocaram os espécimes a -70°C até o envio para o LAIM. O envio destas amostras foi realizado em embalagens próprias contendo gelo seco, através de empresas registradas logo após a coleta das mesmas.

Para este estudo foram selecionadas inicialmente amostras biológicas de 153 mulheres incluídas no Estudo do “Projeto Teste Rápido”, sendo 51 gestantes do Rio

de Janeiro e 102 provenientes de Porto Alegre, diagnosticadas como soropositivas para o HIV no âmbito do projeto e seus respectivos bebês, acompanhados pelo diagnóstico molecular para caracterização da infecção pelo HIV.

Posteriormente, durante nosso estudo pudemos detectar alguns resultados sorológicos falso-positivos em algumas amostras de gestantes. Após confirmação do status sorológico, cinco gestantes foram retiradas do estudo, uma do Rio de Janeiro e quatro de Porto Alegre, resultando num total de 148 gestantes sendo 50 (34%) gestantes do Rio de Janeiro e 98 (66%) provenientes de Porto Alegre, que foram definitivamente incluídas neste estudo.

Imunofenotipagem das subpopulações de linfócitos T CD3⁺/CD4⁺ e CD3⁺/CD8⁺ por citometria de fluxo

Todas as amostras de sangue das gestantes coletadas nos hospitais localizados no Rio de Janeiro foram analisadas para imunofenotipagem das subpopulações de linfócitos T CD3⁺/CD4⁺ e CD3⁺/CD8⁺ por citometria de fluxo após a coleta. Foi empregada a técnica de marcação tripla com anticorpos monoclonais específicos para as moléculas CD3, CD4 e CD8 ligados, respectivamente aos fluorocromos PerCP, FITC e PE (Tritest, Beckton-Dickson BD, San Diego, USA). Foram utilizados 100µl de sangue total de cada amostra, com 10 µl do monoclonal. O citômetro utilizado foi o modelo XL-MCL da Coulter.

Para as amostras provenientes de Porto Alegre, tivemos a informação somente de dois hospitais envolvidos no estudo, impossibilitando assim a avaliação completa das gestantes incluídas na região sul. Alguns dos resultados de contagem de células T CD4⁺ obtidos foram enviados posteriormente para o nosso laboratório. A metodologia utilizada foi a mesma para as amostras do Rio de Janeiro.

Carga Viral

O método utilizado para quantificação da carga viral plasmática foi o teste NASBA (Nucleic Acid Sequence Based Amplification – Nuclisens – BioMeriueX), um teste que consiste de uma reação de amplificação isotérmica de ácidos nucléicos que ocorre a temperatura de 41°C. A metodologia baseia-se na atividade simultânea de três enzimas: AMV-RT, RNase H e T7 RNA polimerase e leva a amplificação da região correspondente ao gene gag do genoma do HIV-1. O limite de detecção do

teste é de 80 cópias de RNA viral/ml. Todos os procedimentos foram realizados segundo o manual de instruções que compõe o kit.

Extração do DNA

O DNA genômico foi extraído a partir de 200µl de sangue total utilizando o Kit MiniPrep de extração de sangue utilizando colunas da Quiagen, (QIAamp DNA Blood Mini Kit – Quiagen Inc., Valencia, CA, EUA), seguindo as orientações do fabricante. O DNA foi estocado a -20°C até o uso.

Análises estatísticas

Utilizamos o programa INSTAT 2 para avaliar a taxa de transmissibilidade do HIV-1 de mãe para filho. Analisamos inicialmente se houve diferença estatística significativa entre as mulheres com presença de variantes resistentes aos anti-retrovirais e as mulheres que não apresentavam estas variantes. Para tal utilizamos os testes de Mann-Whitney, qui-quadrado e Fisher.

Para os cálculos de mediana com intervalos de 95% utilizamos o teste de Mann Whitney.

Aspectos éticos

O projeto do Teste Rápido foi aprovado pelos Comitês de Ética em pesquisa local e também pelo CONEP nº 168/02. No termo de consentimento está anexada a informação sobre a utilização do sangue coletado para a realização dos estudos planejados para o projeto.

O projeto atual foi submetido aos comitês de ética locais e posteriormente a CONEP, tendo em vista que no projeto anterior os estudos que fizemos não estavam previstos e não constavam no termo de consentimento livre e esclarecido. Foi então criado o Termo de Consentimento Modificado para utilização das amostras biológicas.

Caracterização molecular dos subtipos virais

. gene do envelope

Para identificação dos diferentes subtipos virais, utilizamos uma técnica que avalia a mobilidade dos heteroduplex (Heteroduplex Mobility Assay - HMA) formados a partir de produtos genômicos amplificados pela técnica de "nested" PCR descrita por Delwart e cols em 1993. Amostras de DNA proviral das mulheres positivas para o HIV-1 foram amplificadas por PCR, primeiramente empregando-se um conjunto de oligonucleotídeos específicos para a região do envelope viral ED5/ED12, gerando um fragmento de 1,8kb. No segundo ciclo de amplificação por "nested" PCR, foi utilizado o conjunto de primers ED31/ED33, gerando um novo fragmento de 0,7kb da região V3-V5 da gp120 (Tabela 1).

Para as amostras que não amplificaram, utilizamos o par de iniciadores ED3/ED14 no primeiro ciclo da PCR, mantendo os mesmos iniciadores no segundo ciclo. A ciclagem para a realização da PCR para região do envelope constou de 3 ciclos de 97°C durante um minuto, 55°C um minuto e 72°C durante dois minutos; 32 ciclos de 94°C durante 45 segundos, 55°C por um minuto e 72°C por dois minutos e um ciclo de extensão de 72°C durante 10 minutos.

Os heteroduplexes são formados entre as seqüências divergentes pelo anelamento/pareamento do DNA genômico e dos protótipos referentes aos diversos subtipos virais clonados em plasmídeos, desnaturando-os durante 3 minutos a 94°C e re-anelando-os, posteriormente, pelo resfriamento brusco da preparação durante 10 minutos no gelo. Após choque térmico os fragmentos de DNA são separados por eletroforese em gel de poliacrilamida a 5% em tampão TBE sob uma voltagem de 200V por 3hs30min em uma cuba para gel vertical (Gibco BRL). Os plasmídeos utilizados nesta análise foram doados pelo NIH AIDS Reagent Program.

A demonstração da mobilidade dos heteroduplexes formados foi feita através da coloração pelo brometo de etídio. A subtipagem de cada isolado viral obedecerá a uma maior velocidade de migração dos heteroduplexes formados, ou seja, aquele pareamento que migrar para mais próximo do homoduplex será indicativo do subtipo viral.

Realizamos também o sequenciamento do gene do envelope viral de 35 amostras, incluindo todas as mães transmissoras e algumas mães não-transmissoras, para confirmação dos subtipos descritos através da técnica de HMA e para tentar recuperar algumas amostras que não foram claramente subtipadas através da técnica de HMA. Para este fim, utilizamos os mesmos conjuntos de iniciadores já descritos tanto para a PCR como para a realização do sequenciamento de nucleotídeos. As condições de sequenciamento e a edição das seqüências serão apresentadas junto com a caracterização do gene da polimerase.

. *gene da polimerase*

As amostras de DNA das mães e das crianças positivas para o HIV-1 foram selecionadas para a análise do subtipo viral através do sequenciamento dos genes da transcriptase reversa e da protease, utilizando iniciadores descritos por Zazzi e cols (1993); Tanuri e cols (1999) e Brindeiro e cols (1999). As seqüências obtidas foram também utilizadas para a análise da resistência primária aos anti-retrovirais. Os conjuntos de iniciadores incluídos nesta análise encontram-se descritos na Tabela 1.

A amplificação molecular de fragmentos genômicos do gene pol foi realizada pelo método de “nested” PCR utilizando-se os iniciadores externos DP10 e LR54 contendo quase a totalidade do gene pol do HIV-1. As condições de PCR foram similares às utilizadas para a reação do envelope viral. Para o segundo ciclo da PCR, utilizamos os iniciadores internos DP16 e RT12 que produzem fragmentos genômicos correspondentes à protease e a transcriptase reversa.

A ciclagem para a realização da PCR da região da polimerase viral incluiu três ciclos de 95°C durante 3 minutos, 52°C por 1 minuto e 72°C também por um minuto; 35 ciclos de 95°C por 1 minuto, 52°C por 45 segundos e 72°C por um minuto, seguindo-se de um ciclo de extensão de 72°C por 10 minutos. Os produtos da PCR foram quantificados por eletroforese em gel de agarose a 1%, purificados em colunas de afinidade (Prime Erase Quick, Qiagen Inc) e diretamente seqüenciados utilizando um kit de seqüenciamento molecular ABI-Prism Big-Dye Terminator Cyclor Sequencing Ready Reaction Kit (versão 3.1); utilizando os iniciadores DP16, RT12, LR49 e LR51.

As reações de sequenciamento foram feitas, tanto para a polimerase, como para o envelope viral, utilizando-se o seqüenciador automático ABI Model 3100

(Applied Biosystems, US), acoplado a um programa de análise de seqüências (SeqEd software-Applied Biosystems).

As seqüências obtidas foram editadas e analisadas no software DNASTAR, utilizando-se os programas Editseq e Seqman.

. Análises Filogenéticas

As análises filogenéticas das seqüências obtidas para o envelope e a polimerase viral, além de confirmarem os subtipos genéticos previamente definidos pelo HMA, permitiram também identificar amostras potencialmente recombinantes entre diferentes subtipos e também a avaliação do grau de diversidade entre os diferentes isolados.

As seqüências de nucleotídeos dos genes da protease, da transcriptase reversa e da porção gp 120 do envelope, obtidas a partir do sequenciamento molecular foram alinhadas com as seqüências de referência representativas dos diferentes subtipos de HIV-1 existentes. Para tal utilizamos o programa Clustal X e as respectivas árvores filogenéticas construídas utilizando o método de distância “neighbor-joining” (Saitou, 1987) incluído no pacote Mega 3 (Kumatis, 2001). A seqüência SIVcpz foi utilizada como grupo externo (“outlier”) nesta análise.

Avaliação genotípica da resistência aos anti-retrovirais

As seqüências de nucleotídeos das diferentes amostras obtidas para a região da polimerase (1,1Kb), compreendendo a protease (99 aa) e parte da transcriptase reversa (230aa), foram submetidas ao algoritmo fornecido pelo grupo de estudo da variabilidade genética do HIV em Stanford, disponibilizado através do site <http://www.hivdb.stanford.edu/hiv/> para interpretação das alterações moleculares associadas à resistência aos anti-retrovirais.

Tabela 1: Identificação e seqüências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados na amplificação por PCR e sequenciamento das diferentes regiões genômicas do HIV-1

Gene	1º round	2º round	Seqüência 5' 3'
pol		DP16 *	CCTCAAATCACTCTTTGGCAAC
		RT12 *	ATCAGGATGGAGTTCATAACCCATCCA
	DP10		CAACTCCCTCTCAGAAGCAGGAGCCG
	LR54		ATAGGCTGTACTGTCCATTTATCA
	LR49 *		CATGGCCATTGACAGAGA
	LR51 *		ATGTGGTATTCTAATTGAACTTCC
env	ED3		TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAGCGG
	ED14		TCTTGCCTGGAGCTGCTTGATGCCCCAGAC
	ED5		ATGGGATCAAAGCCTAAAGCCATGTG
	ED12		AGTGCTTCCTGCTGCTCCCAAGAACCCAAG
		ED31 *	CCTCAGCCATTACACAGGCCTGTCCAAAG
		ED33 *	TTACAGTAGAAAAATTCCCCTC

* Os iniciadores DP16, RT12, LR49 e LR51 foram utilizados para o sequenciamento da região pol e os iniciadores ED31 e ED33 da região env, se encontravam em uma concentração de 5 pmoles/ml

Resultados

No período compreendido entre Março de 2000 a Agosto de 2002, um total de 5.213 gestantes não testadas ou sem informações sobre seu status quanto à infecção pelo HIV, aceitaram participar do “Projeto Teste Rápido”. Este estudo que ofereceu testagem voluntária e aconselhamento a gestantes que chegaram aos hospitais no momento do parto sem terem realizado anteriormente o pré-natal. Foi realizado em duas regiões brasileiras: Sudeste (Rio de Janeiro) com 3.689 (70,7%) e Sul (Porto Alegre) com 1.524 (29,3%) gestantes. As 148 (2,8%) gestantes que apresentaram resultados reativos foram selecionadas e incluídas no estudo. Destas, 50 (34%) foram provenientes do Rio de Janeiro e 98 (66%) de Porto Alegre, cujas análises moleculares e imunológicas apresentamos neste trabalho.

A prevalência observada de infecção pelo HIV-1 nas gestantes provenientes das duas regiões foi de 1,3% e 6%, respectivamente. Os dados epidemiológicos não serão apresentados neste estudo, pois os mesmos estão sendo abordados e discutidos em um artigo recentemente em preparação (Veloso e cols, manuscrito em preparação, 2005).

Análise dos parâmetros laboratoriais das gestantes soropositivas

. Contagem de células T CD4+ e T CD8+

Para as gestantes provenientes dos hospitais do Rio de Janeiro realizamos a imunofenotipagem, pelo fato de todas as amostras chegaram ao nosso laboratório em tempo hábil para tal procedimento (até 24hs após a coleta). A avaliação do status imunológico foi realizada em 45 de 50 (90%) das mulheres do Rio de Janeiro. A contagem de linfócitos T CD4+ apresentou uma mediana de 477 céls/mm³ [IC 95% (465 – 663 céls/mm³)].

A contagem de linfócitos T CD4+ foi realizada em 64 de 98 (65%) das gestantes da região sul. A mediana das contagens de células CD4+ foi de 452 céls/mm³ [IC 95% (429 - 544 céls/mm³)]. Não observamos diferenças significativas quanto ao status imunológico das gestantes das regiões sul e sudeste incluídas no estudo. (p-valor=0,2744) (Mann-Whitney Test).

Quando estudamos a relação de células CD4/CD8 das amostras das gestantes do sul e do sudeste encontramos um valor $p > 0,05$, considerado limítrofe. O mesmo ocorreu quando realizamos esta análise comparando a relação de células CD4/CD8 e associação entre os subtipos virais B e C.

. **Quantificação da carga viral**

A quantificação da carga viral através do método NASBA foi realizada em todas as amostras do Rio de Janeiro, os resultados variaram entre o limite de detecção da técnica (< 80 cópias/ml) até 500.000 cópias/ml ($5,7 \log_{10}$), levando a uma mediana de $4 \log_{10}$ IC95% (3,64 - 4,26). Em Porto Alegre, obtivemos os resultados de 89 de 98 (91%) amostras com uma mediana de $3,8 \log_{10}$ IC95% (3,60 - 3,98).

Apenas seis (4,3%) mulheres apresentaram carga viral abaixo do limite de detecção, três pertencentes ao RJ e três de PoA. Não houve diferença significativa quanto aos valores de carga viral entre as gestantes das regiões sul e sudeste do Brasil. O conjunto dos dados de CD4 e CV das gestantes do RJ e PoA encontram-se na tabela 2.

Tabela 2: Análise dos parâmetros laboratoriais das gestantes distribuídas por regiões geográficas estudadas, considerando os dados de valores absolutos de contagem de células T CD4, relação entre CD4 e CD8 e quantificação da carga viral.

Parâmetros	RJ	PoA	p valor
Linfócitos T CD4+ *			
< 200 céls/mm ³	4	8	
200 - 400 céls/mm ³	13	21	
> 400 céls/mm ³	28	36	
Total	45	65	0,74
Relação CD4/CD8 **			
< 0,8	26	45	
≥ 0,8	19	20	
Total	45	65	0,6
Carga Viral *			
< 1.000	11	16	
1.000 - 10.000	12	38	
> 10.000	27	35	
Total	50	89	0,08

* X² test; **Fisher Exact test

Subtipagem do HIV-1 por HMA para a região do envelope viral

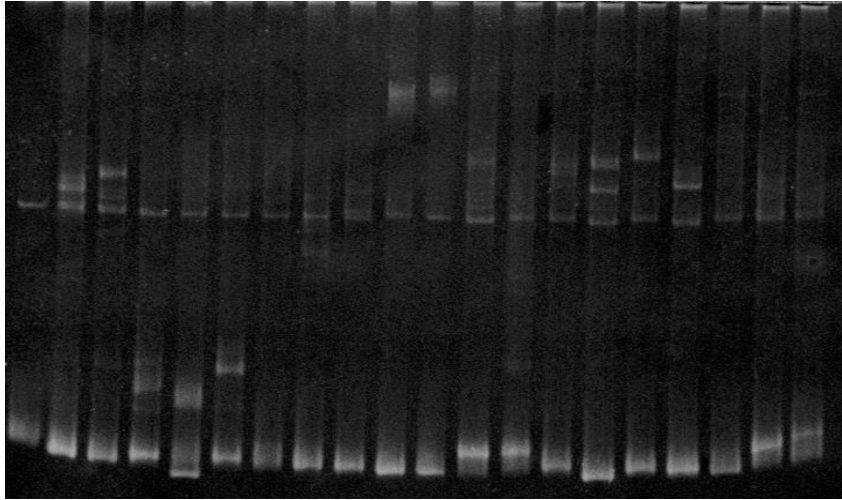
A análise do subtipo de HIV-1 baseada na região do envelope viral utilizando a técnica de HMA foi realizada em 121 (82%) de 148 mulheres incluídas no estudo, sendo 48 (96%) das 50 do Rio de Janeiro e 73 (74%) das 98 de Porto Alegre. Géis representativos da determinação dos subtipos B, C e F encontram-se apresentados na figura 11. No Rio de Janeiro, 41 (85%) das 48 amostras analisadas corresponderam ao subtipo B e 7 (15%) ao subtipo F.

Entre as 73 amostras provenientes de Porto Alegre, 51 (70%) corresponderam ao subtipo C, seguido pelo subtipo B, verificado em 19 amostras (26%) e o subtipo F em duas amostras (3%). Encontramos um caso sugestivo de infecção dupla com os subtipos B e C (1%) com base na similaridade de migração frente às amostras de referência B e C no HMA, (dado não mostrado). Em relação às amostras de Porto Alegre, não foi possível proceder a tipagem molecular para 25 (23%) das 98 gestantes incluídas no estudo, por condições próprias das amostras.

Figura 9: Eletroforese em gel de poliacrilamida representando os diferentes subtipos encontrados na subtipagem molecular através de HMA das gestantes soropositivas para o HIV-1 do RJ e de PoA.^{lxiii}

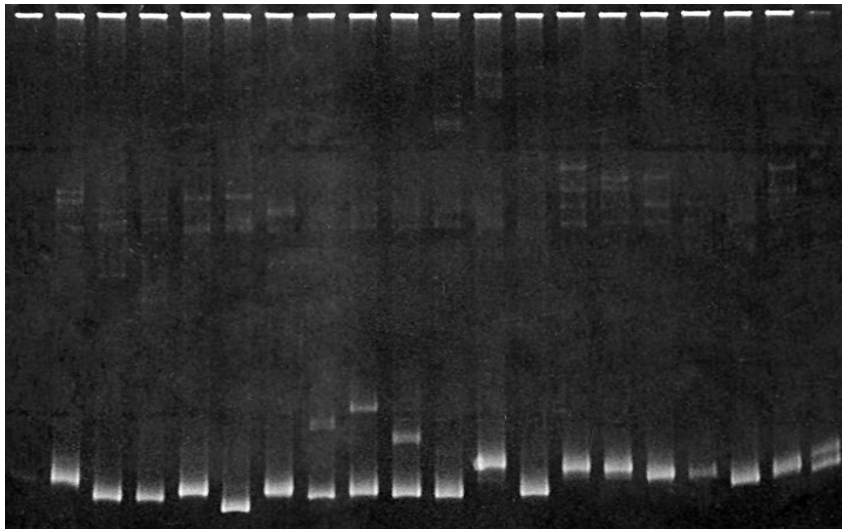
Subtipo B do Rio de Janeiro

TR A1 A2 **B1 B2 B3** C1 C2 C3 D1 D3 E1 E2 F1 F2 G1 G2 H2 J1 J2
01



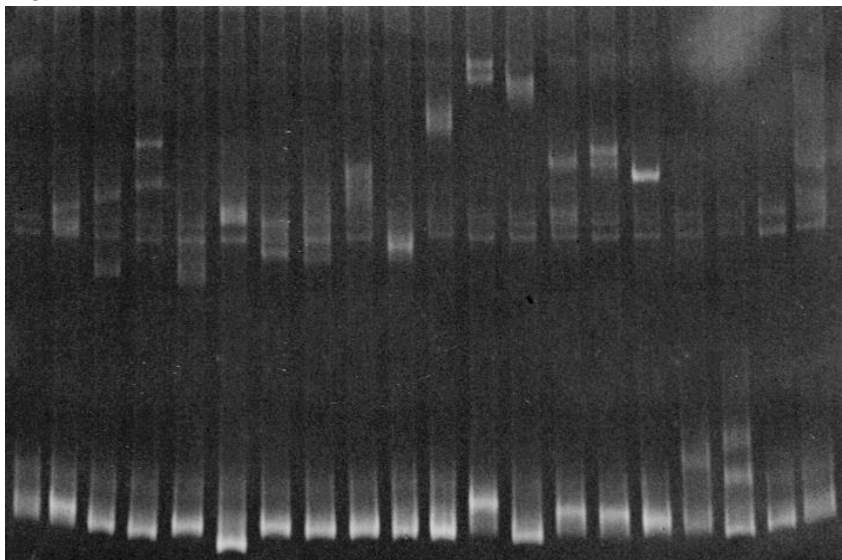
Subtipo C de Porto Alegre

RGS A1 A2 A3 **B1 B2 B3 C1 C2 C3** D1 D2 D3 E1 E2 F1 F2 G1 G2 H2
05



Subtipo F do Rio de Janeiro

TR A1 A2 A3 B1 **B2 B3 C1 C2 C3** D1 D2 D3 E1 E2 F1 F2 G1 G2 H2
13

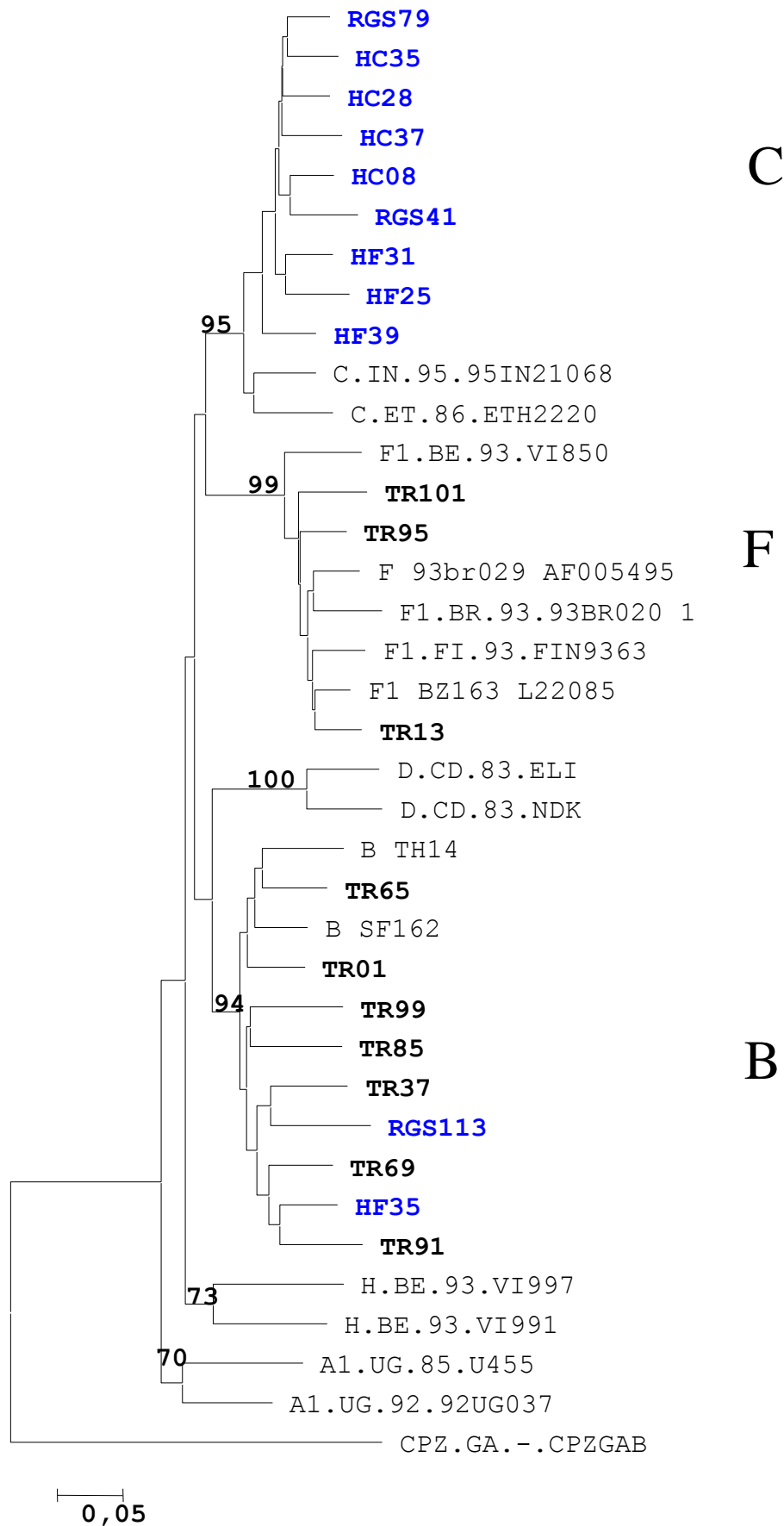


Análise filogenética da região do envelope viral

O sequenciamento da porção C2-V3 da gp120 do envelope viral foi realizado em 51 amostras, incluindo as mães transmissoras, seus respectivos bebês e um grupo de mães não-transmissoras. Esta análise nos permitiu confirmar os subtipos de HIV-1 encontrados na subtipagem por HMA e determinar os subtipos de cinco amostras dentre as 27 amostras onde o HMA não foi conclusivo. Estas amostras apresentaram problemas de amplificação por PCR e/ou resultados inconclusivos provavelmente por problemas no transporte das amostras do Sul para o nosso laboratório, ou por uso incorreto do anticoagulante.

A determinação do subtipo de HIV-1 realizado através da análise filogenética das diferentes amostras e isolados referência. Nesta abordagem permitiu a classificação dos subtipo viral de mais cinco amostras provenientes de Porto Alegre. Quatro destas se agruparam com as amostras de referência do subtipo C e apenas uma com as amostras referência do subtipo B (Figura 12). Todas as amostras pertencentes ao subtipo C se agruparam em um braço único, sugestivo de uma origem monofilética das mesmas. Os resultados obtidos para confirmação de alguns subtipos virais foram concordantes com os dados obtidos através da técnica de HMA.

Figura 12: Árvore filogenética baseada no sequenciamento da região C2-V3 da região do envelope viral de amostras de gestantes soropositivas para o HIV-1 provenientes do Rio de Janeiro e de Porto Alegre.



Em azul as amostras das gestantes provenientes de PoA e em negrito as amostras provenientes do RJ.

Análise filogenética da região da polimerase viral

Das 148 amostras incluídas neste estudo obtivemos amplificação por PCR do fragmento completo da região da polimerase em 114 (78%) amostras, sendo 44 (38%) do Rio de Janeiro e 70 (62%) de Porto Alegre. Para uma amostra (RGS69) obtivemos somente o fragmento do gene da transcriptase reversa. Não foi possível a amplificação em 33 (22%) amostras, sendo 6 (18%) do RJ e 28 (82%) de PoA .

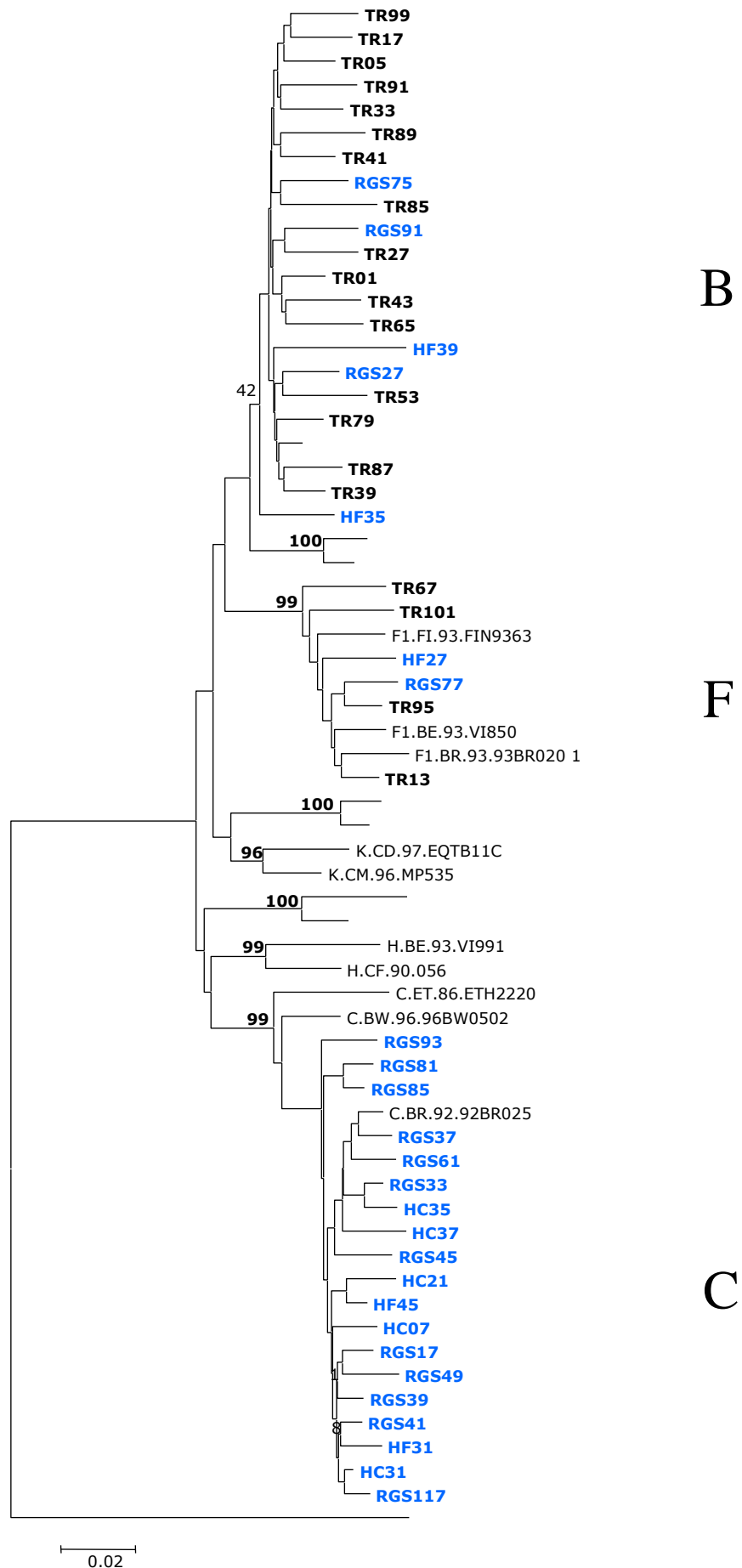
Os subtipos virais foram determinados através de construções filogenéticas usando o modelo de “neighbor-joining” mostrou que no total de 44 amostras seqüenciadas do Rio de Janeiro, 37 (84%) se agrupavam com as amostras referência do subtipo B, 5 subtipo F (11%), 2 apresentaram formas recombinantes F_{PR}/B_{RT} (5%).

Quando analisamos as 70 amostras de Porto Alegre, 19 (28%) se agruparam com as amostras referência do subtipo B, 47 subtipo C (66%), 2 subtipo F (3%), 2 com forma recombinantes F_{PR}/B_{RT} e B_{PR}/C_{RT} (3%).

Em relação às amostras caracterizadas como recombinantes pelo laudo de Stanford ou pela sua localização dos ramos na análise filogenética, suas seqüências moleculares foram utilizadas para construção novas árvores filogenéticas correspondentes aos segmentos da protease e da transcriptase reversa separadamente. Com base nesta análise as amostras previamente descritas como recombinante B/F, apresentaram resultados similares aos realizados através das análises filogenéticas das duas regiões. No entanto, as duas amostras que apresentaram o perfil D_{PR}/B_{RT} e D_{PR}/C_{RT} foram posteriormente classificadas como F_{PR}/B_{RT} e B_{PR}/C_{RT} com base na filogenia (dados não mostrados).

Devido ao grande número de amostras analisadas filogeneticamente, estamos apresentando neste trabalho uma árvore filogenética representativa do conjunto de amostras provenientes do Rio de Janeiro e de Porto Alegre (Figura 13).

Figura 13: Árvore filogenética representativa da região da polimerase viral das amostras de gestantes soropositivas para o HIV-1 provenientes do Rio de Janeiro e de Porto Alegre.



Em azul observamos os isolados de HIV-1 das gestantes provenientes de PoA e em negrito as amostras provenientes do RJ.

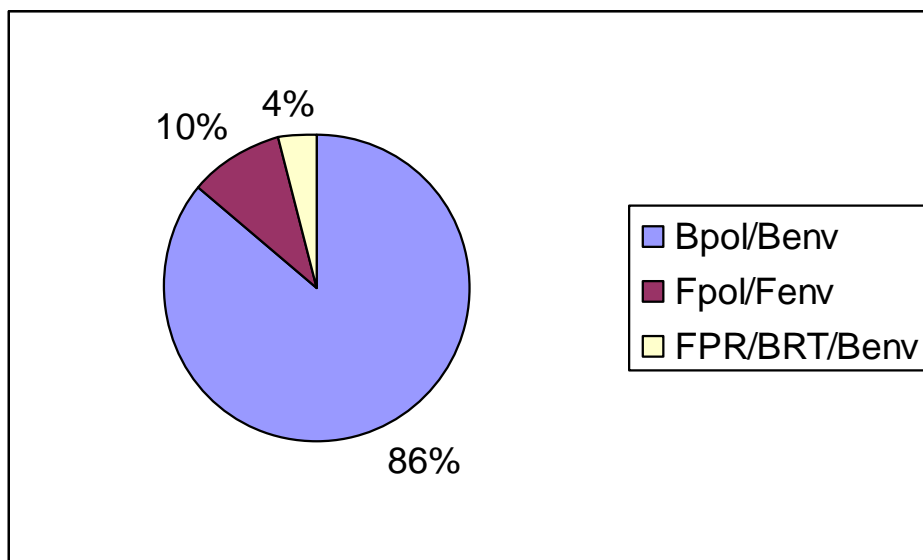
Considerando os resultados de subtipagem viral das regiões gênicas do envelope e da polimerase através do sequenciamento de nucleotídeos, verificamos que das 42 amostras do Rio de Janeiro, 36 (86%) apresentaram o perfil B_{pol}/B_{env} , 4 (10%) F_{pol}/F_{env} , 2 (4%) $F_{PR}/B_{RT}/B_{env}$.

Quando analisamos as 70 amostras da região Sul, verificamos que 15 (22%) apresentaram o perfil B_{pol}/B_{env} , 43 (63%) o perfil C_{pol}/C_{env} e o perfil F_{pol}/F_{env} em apenas uma amostra (1%). Observamos ainda, perfis discordantes pol/env , sugestivos de genomas recombinantes como: o perfil C_{pol}/B_{env} em 4 (6%) amostras, B_{pol}/C_{env} em três amostras (4%) e F_{pol}/C_{env} em apenas uma.

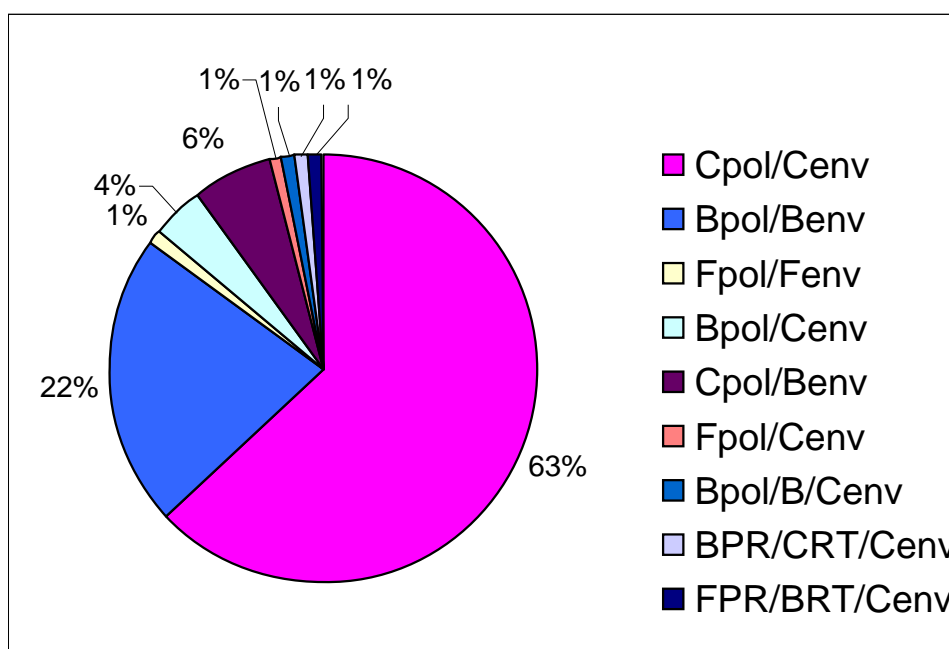
Observamos ainda, perfis genéticos que discordavam na região do envelope, como foi o caso de uma gestante com aparente infecção dupla $B_{pol}/B_{env}C_{env}$, e outra que discordava na região da polimerase viral entre os genes da PR e da RT, apresentando perfil $D_{PR}/C_{RT}/C_{env}$, pela filogenia esta passou a ser $B_{PR}/C_{RT}/C_{env}$. Tivemos a oportunidade de seqüenciar uma amostra (RGS51) onde encontramos todos os subtipos circulantes nas duas regiões do estudo, apresentando o perfil $F_{PR}/B_{RT}/C_{env}$. Estes dados se encontram sumarizados na figura 14 (A e B).

Figura 14: Distribuição dos subtipos virais identificados por sequenciamento em gestantes soropositivas para o HIV-1 provenientes do (A) Rio de Janeiro, RJ e (B) Porto Alegre, RS.

(A) Rio de Janeiro, RJ. (n = 42)



(B) Porto Alegre, RS. (n = 70)



Análise de presença de mutações de resistência do HIV-1 aos anti-retrovirais.

O sequenciamento genômico da região da polimerase viral, incluindo toda a protease e pelo menos 2/3 da região da transcriptase reversa, foi realizado também no intuito de verificar a presença de mutações associadas à resistência aos anti-retrovirais, em isolados circulantes na população de gestantes positivas virgens de tratamento. O programa utilizado pra edição das seqüências foi o Seqman incluído DNASTAR, utilizando como referencia a seqüência do isolado HXB2 do subtipo B do HIV-1.

Após a determinação de cada consenso, utilizamos o programa HIVdb, (www.hivdb.stanford.edu), algoritmo de interpretação de resistência genotípica, versão 4.1.2 disponibilizado no site da Universidade de Stanford para avaliação das mutações de resistência.

Os resultados desta análise genotípica da resistência do HIV-1 encontram-se sumarizados na tabela 3(A) das amostras do Rio de Janeiro e na tabela 3(B) os dados das amostras de Porto Alegre.

. Protease

Foi possível realizar a determinação do subtipo genético e genotipagem do gene da protease viral em 114 (77%) de 148 amostras testadas. Com base nas análises filogenéticas desta região, 57 (50%) das amostras pertenciam ao subtipo B, 47 (41%) do subtipo C e 10 (9%) do subtipo F.

Quatro (3,5%) gestantes virgens de tratamento incluídas no presente estudo apresentaram resistência primária aos inibidores da protease. Destas, duas eram do RJ e duas de Porto Alegre, indicando uma prevalência de resistência primária de 4,5% e 2,9%, respectivamente. Foram verificadas as mutações D30N, M46L e V82L que estão associadas à redução de susceptibilidade a medicamentos da classe dos IPs. Distribuindo estas mutações primárias encontradas de acordo com o subtipo viral, observamos que 3 destas amostras (5%) pertenciam ao subtipo B (n = 56) e 1 (2%) ao subtipo C (n = 47).

Estratificando estas mutações primárias em cada indivíduo, a amostra TR47 apresentou a mutação principal V82L juntamente com a mutação acessória L63P gerando uma redução de susceptibilidade ao ATV, IDV, LPV, NFV e RTV . As mutações M46L/I foram encontradas nas amostras TR65 e RGS 81, respectivamente. Estas mutações aumentam a resistência ao IDV, RTV, NFV, APV,

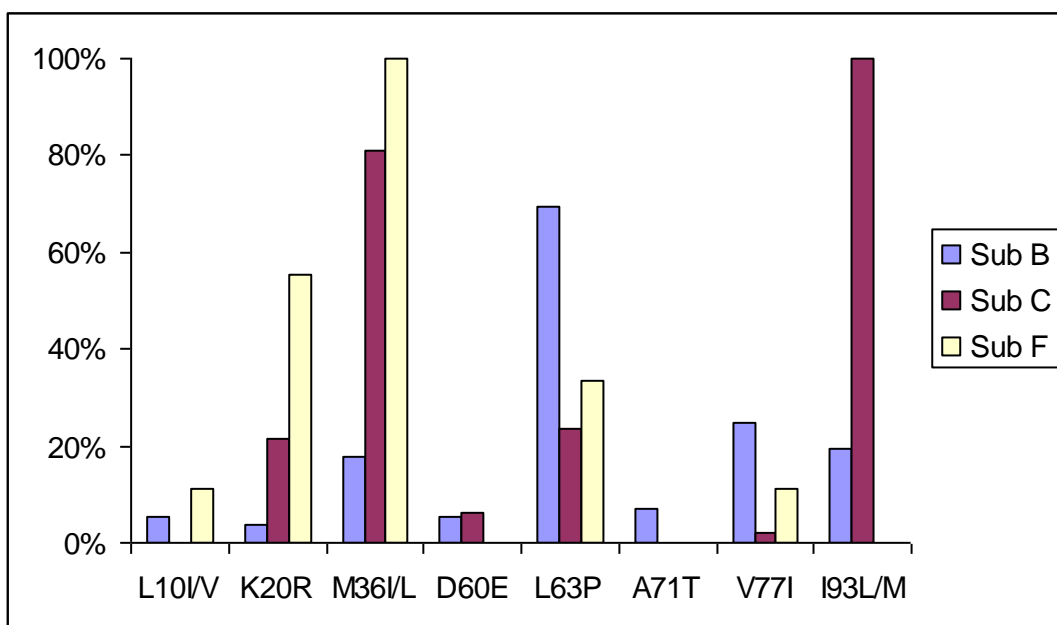
LPV E ATV e, possivelmente, ao SQV quando associadas com outras mutações acessórias. Na amostra HF39, de Porto Alegre, encontramos a mutação D30N que causa elevada resistência ao Nelfinavir.

Dentre as amostras do subtipo B, encontramos somente 8 (14%) com o genoma selvagem para a protease, ou seja, sem a presença de mutações associadas à resistência. Por outro lado, 48 gestantes (86%) apresentavam pelo menos uma mutação acessória de resistência aos inibidores da protease. As mutações acessórias mais encontradas foram M36I, L63P, V77I, dentre outras (Figura 15).

Todas as 47 amostras do subtipo C do HIV-1 apresentaram pelo menos uma mutação acessória, sendo que as mais frequentes foram a K20R, M36I, L63P e I93L (Figura 15). Uma amostra (HC25) apresentou as mutações G48R e G73S na protease. A mutação G48V causa resistência ao SQV, no entanto nesta amostra encontramos a substituição de uma valina na posição 48 por uma arginina sendo, portanto considerada como uma mutação atípica nesta posição. A mutação G73S é uma mutação acessória que ocorrendo isoladamente não acarreta perda de susceptibilidade, mas em conjunto com a mutação G48R podem apresentar redução de susceptibilidade ao ATV, IDV, NFV, RTV e SQV.

Entre as amostras do subtipo F nenhuma apresentou mutação principal na protease, no entanto, todas mostravam pelo menos uma mutação acessória, incluindo no seu genoma incluindo L10I, K20R, M36I, L63P e V77I (Figura 15). Dentre as mutações acessórias encontradas, as mutações L10I, K20R, M36I, A71V, I93L estão associadas com resistência aos IPs somente quando associadas à outras mutações. Muitas variantes nestas posições são assinaturas moleculares que ocorrem comumente em vírus do subtipo não-B. A tabela 3 indica todas as mutações encontradas nas amostras das gestantes virgens de tratamento incluídas neste estudo. Na população estudada a mutação L63P representa um polimorfismo comum, sendo associado à resistência aos IPs quando presente com outras mutações. Os efeitos de outras mutações nesta posição, como por exemplo, L63N, L63Q, L63C entre outras que ocorrem com frequência, ainda não foram estudados. Neste contexto, observamos alguns polimorfismos na posição 63 tais como a substituição da leucina (L) por diferentes aminoácidos (I, Q, C, A, H, N, V e T). A mutação V77I é um polimorfismo comum associado à resistência ao Nelfinavir quando presente com outras mutações. L33V é um polimorfismo que até o momento não está relacionado à resistência fenotípica aos antiretrovirais.

Figura 15: Prevalência de mutações acessórias encontradas na região da protease do HIV-1 associadas aos subtipos virais B, C e F.



. *Transcriptase reversa*

A análise do gene da transcriptase reversa foi possível em 115 amostras (78%) das 148 gestantes incluídas no estudo, sendo que 15 (13%) continham algum tipo de mutação de resistência, diminuindo a susceptibilidade aos inibidores de transcriptase reversa nucleosídicos (ITRN) e outras aos inibidores não-nucleosídicos (ITRNN) (Figura 16). Algumas substituições no gene da transcriptase reversa se apresentaram como polimorfismos genéticos não alterando necessariamente a susceptibilidade viral aos anti-retrovirais. Estes resultados encontra-se detalhados nas Tabelas 3 A e B.

Em relação aos ITRN, somente 3 (2,6%) das 115 amostras apresentaram as mutações M41L/I e M184V/I, que conferem elevados níveis de resistência aos compostos derivados da timidina (AZT e d4T) e da cisteína (3TC e FTC), respectivamente. Entre estas três amostras, duas pertenciam ao subtipo B (TR35 e RGS13) e uma ao subtipo C (HC25). A amostra RGS13 apresentou somente a mutação associada à timidina (TAM), M41L. As amostras TR35 e HC25 apresentaram as mutações M41I e M184I, respectivamente. A presença da mutação M184V/I pode diminuir também a susceptibilidade destes vírus ao ABC e DDI.

Outras quatro amostras (3,5%) apresentaram as mutações V118I (associada à resistência ao combinado de INRT) e a E44K, que ocorrem geralmente em 2% de indivíduos não tratados. Isoladamente, estas mutações não conferem resistência, mas quando ocorrem simultaneamente, ou associadas com outras TAMs conferem resistência a quase todos os ITRNs. Nenhuma das mulheres incluídas no estudo apresentou perfil de resistência completa ao AZT. Somente uma amostra (RGS13) apresentou perda de susceptibilidade a esta droga, colaborando para a eficácia observada na administração desta droga na prevenção da transmissão vertical.

Para a classe dos ITRNN que incluem a Delavirdina (DLV), o Efavirenz (EFV) e a Nevirapina (NVP). Três amostras (2,6%) continham mutações que conferem resistência aos medicamentos desta classe. Foram detectadas as mutações G190R, G190E e V179D conferem alguma resistência aos ITRNN. As amostras que apresentaram tais mutações foram: nas amostras TR35 e HF39 (G190R e G190E, respectivamente), que conferem elevada resistência a NVP e EFV, e perda de susceptibilidade a DLV. A amostra RGS57 apresentou a mutação V179D que reduz igualmente a susceptibilidade aos medicamentos dessa classe. Além disto, 5

amostras (4,3%) apresentaram as mutações V106I/L, K103R e V179A envolvidas na redução de susceptibilidade fenotípica aos ITRNN e 8 amostras (7%) apresentaram polimorfismo genéticos que isoladamente não conferem resistência à esta classe de drogas (Figura 16). Todas essas amostras pertenciam ao subtipo B do HIV-1.

Figura 16: Prevalência de mutações aos Inibidores da Transcriptase Reversa Nucleosídeos e Não – Nucleosídeos.

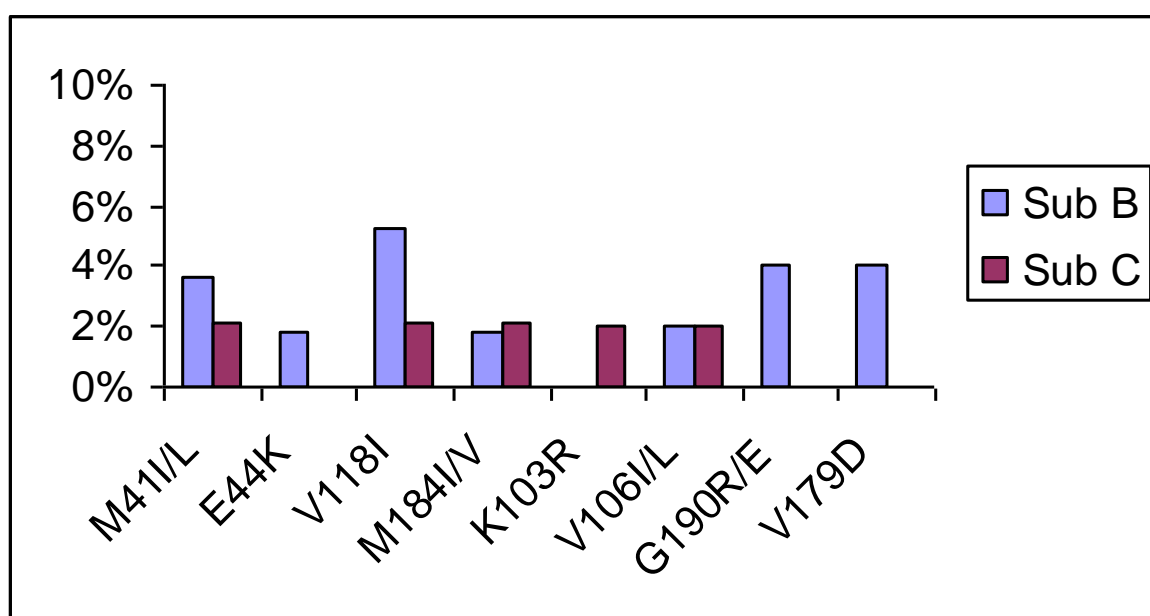


Tabela 3 (A): Distribuição dos subtipos virais e das mutações nos genes da protease e transcriptase reversa na população de gestantes da cidade do Rio de Janeiro

Id	Ano do diagnóstico	Sub env	Sub PR/RT	Mutações Protease	Mutações RT
TR 1	2000	B	B/B	M36I/L63P	nenhuma
TR 5	2000	B	B/B	L63P	nenhuma
TR 9	2000	B	B/B	V77I	nenhuma
TR 11	2000	B	B/B	V77I	nenhuma
TR 13	2000	F	F/F	K20R/M36I	nenhuma
TR 15	2000	F	F/F	K20R/M36I/L63P	nenhuma
TR 17	2000	B	B/B	K20R/L63P/V77I	nenhuma
TR 19	2000	B	B/B	L63P	V106I
TR 23	2000	B	B/B	L63P	nenhuma
TR 25	2000	B	B/B	L63P	nenhuma
TR 27	2000	B	B/B	L63P	nenhuma
TR 29	2000	B	B/B	L63P/V77I	nenhuma
TR 31	2000	B	F/B	M36I	nenhuma
TR 33	2000	B	B/B	L63P	V118I
TR 35	2000	NA	B/B	L63P	M41I/M184I/G190R
TR 41	2000	B	B/B	M36I/L63P	nenhuma
TR 45	2001	B	B/B	L63P	nenhuma
TR 47	2001	B	B/B	V82L /L63P	nenhuma
TR 53	2001	B	B/B	M36I	E44K
TR 55	2001	B	B/B	L63P	nenhuma
TR 59	2001	B	B/B	V77I	nenhuma
TR 61	2001	B	B/B	V77I	nenhuma
TR 65	2001	B	B/B	M46I / V77I	nenhuma
TR 67	2001	F	F/F	M36I	nenhuma
TR 69	2001	B	F/B	M36I	nenhuma
TR 71	2001	B	B/B	L63P/I93L	nenhuma
TR 73	2001	B	B/B	L63P/I93L	nenhuma
TR 75	2001	B	B/B	D60E	nenhuma
TR 83	2001	B	B/B	L63P	nenhuma
TR 85	2001	B	B/B	M36I/L63P/A71T/I93M	nenhuma
TR 89	2001	B	B/B	M36I/L63P/I93L	nenhuma
TR 91	2001	B	B/B	L63P/I93M	nenhuma
TR 93	2001	B	B/B	L63P/V77I/I93L	nenhuma
TR 95	2001	F	F/F	K20R/M36I	nenhuma
TR 99	2001	B	B/B	D60E/L63P	nenhuma
TR 101	2001	F	F/F	K20R/M36I	V106I

Tabela 3(B): Distribuição dos subtipos virais e das mutações nos genes da protease e transcriptase reversa na população de gestantes da cidade de Porto Alegre.

Id	Ano do diagnóstico	Sub env	Sub PR/RT	Mutações Protease	Mutações RT
RGS 5	2000	NA	C/C	K20R, M36I, V77I, I93L	nenhuma
RGS 7	2000	B	C/C	M36I, I93L	nenhuma
RGS 9	2000	C	C/C	K20R, M36I, I93L	nenhuma
RGS 11	2000	C	C/C	K20R, M36I, I93L	nenhuma
RGS 13	2000	B	B/B	V77I	M41L
RGS 15	2000	B	B/B	L33V	nenhuma
RGS 17	2000	C	C/C	M36I, I93L	nenhuma
RGS 21	2000	B	B/B	L10I, M36I, I93L	nenhuma
RGS 23	2000	C	C/C	M36I, L63P, I93L	nenhuma
RGS 25	2000	B	C/C	M36L, I93L	nenhuma
RGS 27	2000	B	B/B	L10V, M36I, I93L	nenhuma
RGS 29	2000	C	C/C	K20R, M36I, I93L	nenhuma
RGS 31	2000	B	B/B	L33V, I93L	nenhuma
RGS 33	2001	C	C/C	K20R, M36I, I93L	nenhuma
RGS 35	2001	B	B/B	K20R, L63P, A71T, V77I, I93L	nenhuma
RGS 37	2001	C	C/C	M36I, I93L	nenhuma
RGS 39	2001	C	C/C	M36I, I93L	nenhuma
RGS 41	2001	C	C/C	M36I, I93L	nenhuma
RGS 45	2001	C	C/C	K20R, M36I, I93L	nenhuma
RGS 47	2001	C	C/C	K20R, M36I, I93L	nenhuma
RGS 49	2001	B	C/C	L63P, I93L	nenhuma
RGS 51	2001	C	F/B	L10I, M36L	nenhuma
RGS 53	2001	B	B/B	L63P, A71T	V118I
RGS 55	2001	C	C/C	M36I, I93L	nenhuma
RGS 57	2001	B	B/B	nenhuma	V179D
RGS 59	2001	C	C/C	I93L	nenhuma
RGS 61	2001	C	C/C	M36I, I93L	K103R
RGS 63	2001	C	C/C	M36I, L63P, I93L	nenhuma
RGS 65	2001	B	B/B	V77I	V179A
RGS 67	2001	C	C/C	M36I, I93L	nenhuma
RGS 71	2001	C	C/C	M36I	nenhuma
RGS 73	2001	C	C/C	M36I, I93L	nenhuma
RGS 75	2001	B	B/B	M36I, L63P	nenhuma
RGS 77	2001	C	F/F	M36I	nenhuma
RGS 79	2001	C	C/C	I93L	nenhuma
RGS 81	2001	C	C/C	M46I , I93L	nenhuma
RGS 83	2002	C	C/C	I93L	nenhuma
RGS 85	2002	C	C/C	M36I, I93L	nenhuma
RGS 89	2002	C	C/C	M36I, I93L	nenhuma
RGS 91	2002	B	B/B	L63P, V77I	V118I
RGS 93	2002	C	C/C	M36I, I93L	nenhuma
RGS 97	2002	C	C/C	M36I, I93L	V118I
RGS 99	2002	C	C/C	L63P, I93L	nenhuma
RGS 101	2002	B	B/B	M36I	nenhuma

Continuação da tabela 3(B)

Id	Ano do diagnóstico	Sub env	Sub PR/RT	Mutações Protease	Mutações RT
RGS 105	2002	C	C/C	M36I, D60E, I93L	nenhuma
RGS 107	2002	C	C/C	M36I, L63P, I93L	nenhuma
RGS 113	2002	B	B/B	L10I, L63P, A71T, I93L	nenhuma
RGS 117	2002	C	C/C	K20R, M36I, I93L	nenhuma
RGS 121	2002	B	C/C	I93L	nenhuma
HF 21	2002	C	C/C	I93L	nenhuma
HF 25	2002	C	C/C	M36I/L63P/I93L	nenhuma
HF 27	2002	F	F/F	K20R/M36I/V77I	nenhuma
HF 31	2002	C	C/C	M36I/I93L	nenhuma
HF 35	2002	B	B/B	V77I	nenhuma
HF 39	2002	C	B/B	D30N/M36I	G190E
HF 45	2002	C	C/C	V82I/M36I/I93L	nenhuma
HC 01	2002	C	C/C	I93L	V106L
HC 07	2002	C	C/C	K20R/M36I/I93L	nenhuma
HC 09	2002	B/C	B/B	L63P	nenhuma
HC 11	2002	C	B/B	D60E/L63P/V77I/I93L	nenhuma
HC 19	2002	C	B/C	M36I	nenhuma
HC 21	2002	C	C/C	M36I/D60E/I93L	nenhuma
HC 23	2002	C	C/C	M36I/I93L	nenhuma
HC 25	2002	C	C/C	G48R/G73S/M36I/D60E/I93L	M41I/ M184I
HC 29	2002	C	C/C	M36I/L63P/I93L	nenhuma
HC 31	2002	C	C/C	M36I/I93L	nenhuma
HC 35	2002	C	C/C	K20R/M36I/I93L	nenhuma
HC 37	2002	C	C/C	M36I/I93L	nenhuma

As mutações em negrito indicam mutações primárias; NA – não analisada

As mães que não apresentavam mutações foram retiradas da tabela

Transmissão vertical do HIV-1

Das 148 gestantes incluídas neste estudo, a ocorrência da transmissão vertical do HIV-1 foi observada em 17 destas (11,5%), sendo 6 gestantes do Rio de Janeiro e 11 de Porto Alegre. No RJ, três casos de transmissão ocorreram intra-útero, segundo a positividade do PCR DNA do recém nascido na primeira amostra coletada nas primeiras 48 horas após o nascimento, e confirmada nas amostras subseqüentes. Em dois recém-nascidos detectamos a positividade para infecção por PCR-DNA, um mês após o parto (TR52 e TR 68) e na outra amostra TR100) essa detecção só foi realizada seis meses após o parto. Na casuística de gestantes de Porto Alegre, a transmissão intra-útero ocorreu em sete gestantes.

Analisando a contagem de células T CD4+ de 12 das 17 gestantes transmissoras encontramos uma mediana de 360 céls/mm³ [IC95% (265–582 céls/mm³)], enquanto que a mediana das gestantes não transmissoras foi de 476céls/ mm³ com IC95% (464 – 580). No entanto, o p-valor não mostrou significância. Podemos observar também que somente duas gestantes (TR 1 subtipo B e RGS 79 subtipo C) apresentaram contagem de células CD4 < 200 céls/mm³. Os valores da relação de células CD4/CD8 acompanharam esse perfil.

A distribuição das gestantes transmissoras e não – transmissora de acordo com as categorias de CD4, relação CD4/CD8 encontra-se na tabela 4. Não observamos diferenças estatisticamente significativas entre estes dois grupos quanto aos parâmetros analisados.

Nenhuma das mães transmissoras apresentou carga viral plasmática abaixo do limite de detecção. Os resultados de carga viral variaram desde 2,46 log₁₀ cópias/ml até 5,65 log₁₀ cópias/ml, sendo a mediana de 4,28 log₁₀ cópias/ml IC 95% (3,63 – 4,69). Quando comparamos a mediana das cargas virais das gestantes transmissoras com as gestantes não transmissoras não encontramos diferença significativa.

Tabela 4: Parâmetros laboratoriais das gestantes HIV positivas estratificadas em grupos de mães transmissoras e não-transmissoras, considerando os valores absolutos de contagem de células T CD4+, relação entre CD4/CD8, quantificação da carga viral e subtipo de HIV-1.

Parâmetros	Mães Transmissoras	Mães Não-Transmissoras	p valor
Linfócitos T CD4+			
< 200 céls/mm ³	2	12	
200 - 400 céls/mm ³	6	28	
> 400 céls/mm ³	4	59	
Total	12	99	0,470
Relação CD4/CD8			
< 0,8	10	63	
≥ 0,8	02	36	
Total	12	99	0,372
Carga Viral			
< 1.000	02	24	
1.000 - 10.000	04	45	
> 10.000	10	53	
Total	16	122	0,383
Subtipo			
B _{pol} /B _{env}	06	55	
C _{pol} /C _{env}	07	47	
F _{pol} /F _{env}	01	08	
B/C _{pol} /C _{env}	01	0	
Total	15	110	

Para análise da distribuição dos subtipos e presença de mutações de resistência realizamos o sequenciamento das regiões do envelope e da polimerase virais em 15 das 17 (85,5%) das amostras das mães transmissoras. Destas, 6(40%) apresentaram o perfil B_{pol}/B_{env}, 7 (47%) o perfil C_{pol}/C_{env}, uma (7%) o perfil F_{pol}/F_{env} e uma o perfil B/C_{pol}/C_{env}. Realizamos também o sequenciamento da região da polimerase viral de algumas amostras dos bebês positivos para o HIV-1, no intuito de avaliarmos a transmissão de mutações de resistência, assim como, as relações filogenéticas entre os vírus dos pares mães-filhos. De fato, observamos uma alta similaridade entre estas amostras, que se agruparam com altos valores de bootstrap (Figura 17).

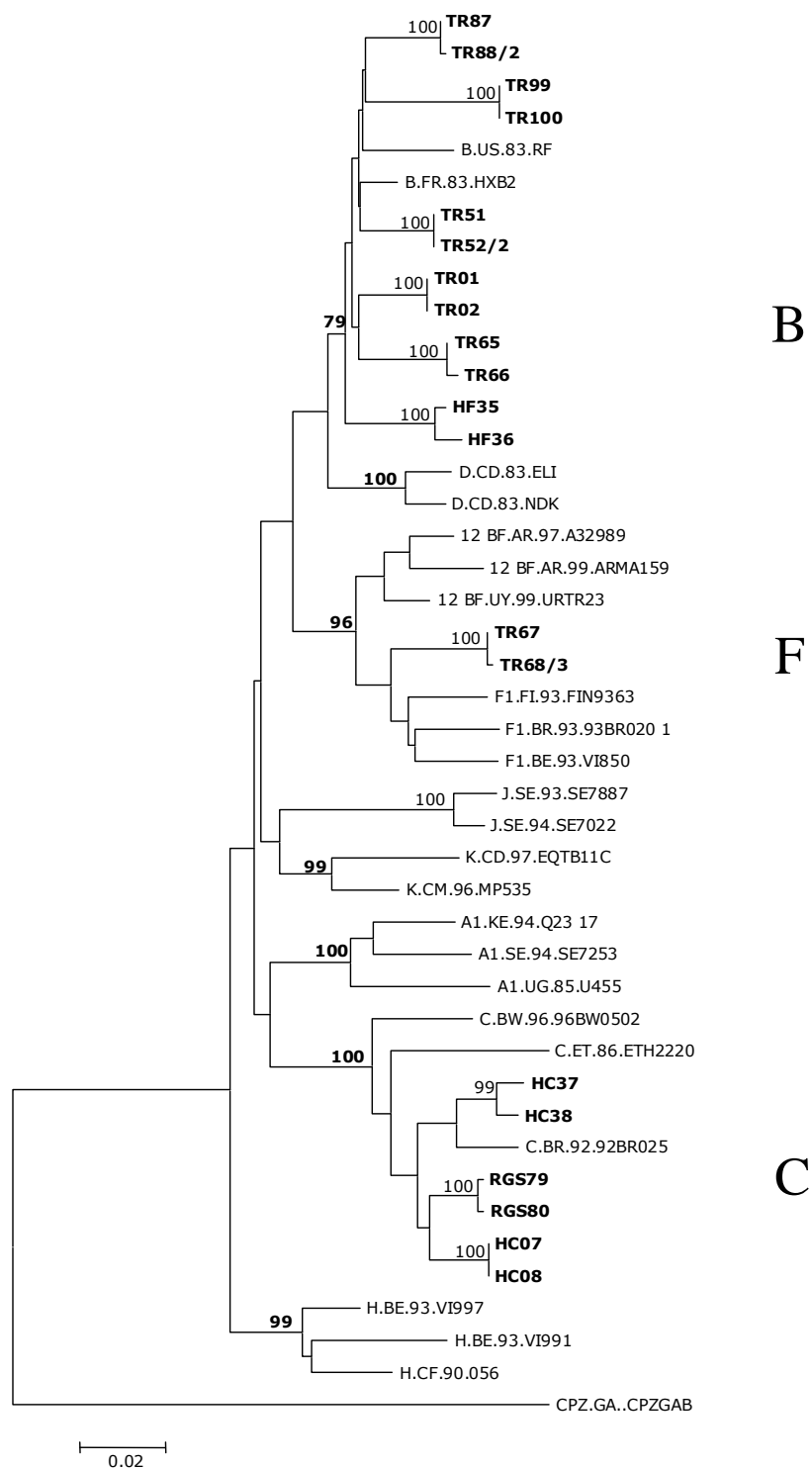


Figura 17: Árvore filogenética representativa da região da polimerase viral das amostras dos pares de mãe-filho.

No intuito de avaliar se a presença de mutações primárias de resistência aos anti-retrovirais interferem na transmissibilidade do vírus HIV-1, utilizamos o Teste de Fisher para comparar a presença destas mutações nas amostras de gestantes transmissoras e de gestantes não transmissoras. Contudo, não pudemos observar diferença significativa entre os dois grupos, visto que somente uma mãe transmissora (TR65) proveniente do Rio de Janeiro apresentou a mutação principal para o indinavir M46L, e as mutações acessórias L63A e V77I que estão associadas à resistência aos IPs quando ocorrem com outras mutações principais e/ou acessórias.

Entre as outras gestantes que transmitiram o vírus aos seus filhos, somente uma foi infectada por um vírus selvagem (TR87), e todas as outras tinham pelo menos uma mutação acessória na protease, entre elas as mutações K20R, M36I, L63P, V77I e I93L. Nenhuma das mães transmissoras apresentou mutações no gene da transcriptase reversa.

Tabela 5: Distribuição dos subtipos virais, dos parâmetros laboratoriais, da via de transmissão e das mutações nos genes da protease e transcriptase reversa na população de gestantes transmissoras do HIV-1.

Identificação	Sub env	Sub pol	CV log	CD4 mm3	Via transmissão	Mutações na Protease	Mutações na TR
TR 1	B	B	5.57	174	IU	M36I, L63P	Nenhuma
TR 51	B	B	4.20	640	PP	L63C	Nenhuma
TR 65	B	B	5.65	508	IU	M46L , L63A, V77I	Nenhuma
TR 67	F	F	2.88	826	PP	M36I, L63H	Nenhuma
TR 87	B	B	4.32	359	PP	Nenhuma	Nenhuma
TR 99	B	B	4.72	246	IU	D60E, L63P	Nenhuma
RGS 37	C	C	3.07	338	PP	M36I, I93L	Nenhuma
RGS 73	C	C	4.36	876	PP	M36I, I93L	Nenhuma
RGS 79	C	C	5.63	50	IU	I93L	Nenhuma
RGS 85	C	C	3.92	305	PP	M36I, I93L	Nenhuma
RGS 117	C	C	3.2	360	PP	K20R, M36I, I93L	Nenhuma
HF 35	B	B	4.41	400	IU	L63T, V77I	Nenhuma
HC 07	C	C			IU	K20R, M36I, I93L	Nenhuma
HC 37	C	C	5.62		IU	M36I, I93L	Nenhuma
HC 09	B/C	B	4.98		PP	L63P	Nenhuma
HC 17			3.71		PP		
HC 27			2.46		IU		

Discussão

Desde o advento do protocolo PACTG 076 em 1994, o controle da transmissão vertical do HIV-1 no Brasil tem sido uma das prioridades do governo junto ao Ministério da Saúde. O Brasil representa o primeiro país em desenvolvimento a implementar um programa para prevenção da Transmissão Vertical do HIV-1 desde 1997 fornecendo gratuitamente AZT a todas as gestantes infectadas (Marins e cols, 2003; Veloso e cols, 2005 manuscrito em preparação).

Os principais fatores envolvidos na transmissão vertical do HIV-1 são: fatores imunológicos, aleitamento materno, uso de anti-retrovirais, comportamento de risco e estágio nutricional da mãe, além de fatores obstétricos, fetais, placentários e virológicos. (revisto por Gianvechio e cols, 2005). O estágio avançado da doença materna também é fator de risco, pois taxas aumentadas de transmissão são encontradas entre mães com baixo CD4 ou com sintomas associados a AIDS (Orloff e cols, 1996).

Neste contexto tivemos a oportunidade de avaliar os parâmetros laboratoriais como contagem de linfócitos T CD4+ e quantificação da carga viral plasmática e a distribuição dos subtipos genéticos do HIV-1 utilizando a técnica de HMA e sequenciamento genômico de fragmentos do envelope e da polimerase do HIV-1 em duas coortes de mães HIV+, uma na região sul e outra na região sudeste.

Outros aspectos moleculares do HIV-1 como a análise filogenética e a genotipagem para identificação de resistência primária aos anti-retrovirais, foram também investigadas na tentativa de identificar possíveis associações entre estes dados e implicações na transmissão vertical do HIV-1, em duas regiões geográficas do Brasil.

No presente trabalho, analisamos 148 gestantes provenientes de duas regiões geográficas distintas do nosso país, Rio de Janeiro (Sudeste) e Porto Alegre (Sul), identificadas como positivas para o HIV-1 no momento da admissão para o parto, e, portanto, sem tratamento anti-retroviral prévio.

Análise dos parâmetros laboratoriais incluindo contagem de células T CD4+ e quantificação da Carga Viral

Estudos recentes têm demonstrado que a viremia plasmática materna na hora do parto representa um dos preditores mais consistentes para transmissão vertical do HIV-1. Em um estudo caso-controle realizado em 1997 com amostras coletadas entre 1990 e 1994, Thea e cols estudaram 51 mães transmissoras e um grupo controle de 54 mães não transmissoras, encontrando elevada associação entre a carga viral materna e a transmissão do HIV-1 aos seus filhos. Outro estudo mostrou também que para contagens semelhantes de CD4, aumentava-se aproximadamente em um terço, a probabilidade de transmissão vertical para cada log adicional de carga viral (Burns e cols, 1997).

No Brasil, em um estudo realizado no Rio de Janeiro em 2001, para determinar a taxa de transmissão vertical em gestantes com contagens baixas de CD4 e Carga viral alta em uso de terapia anti-retroviral em conjunto com AZT, Nogueira e cols relataram uma média de células T CD4 e de carga viral de 428,4 e 39,000 cópias, respectivamente.

A contagem de células T CD4+ inferior que 200cél/mm³ tem sido associada a um risco aumentado de transmissão vertical. (Burns, 1997; The European Collaborative Study, 1999). Embora em nosso estudo, a maioria das pacientes incluía-se na categoria laboratorial de contagem de células T CD4 maior que 400cél/mm³ de sangue observado em aproximadamente 89% das gestantes. Uma grande variabilidade de carga viral das gestantes acompanhadas foi observada, 80,5% tinham carga viral acima de 1.000 cópias/ml.

Não encontramos associação entre os parâmetros laboratoriais, contagem de células CD4 e carga viral quando comparamos casos de infecção pelos subtipos B e C.

Diversidade genética do HIV na transmissão vertical

Nosso grupo já vem trabalhando há vários anos na linha de pesquisa sobre a diversidade do HIV-1 nas duas regiões geográficas avaliadas por este estudo (Sudeste e Sul) onde um padrão de distribuição de subtipos particularmente distintos foi descrito (Guimarães e cols, 2002). Dados de nosso grupo e outros têm mostrado que na região sudeste, o subtipo B corresponde a 85% das infecções, enquanto que o subtipo F corresponde a 15% (Morgado e cols, 1994, 1998^a, 1998b; Tanuri e cols 1999, Brindeiro e cols, 2003). Já no Sul, dados de caracterização genética de amostras de Porto Alegre, analisados em nosso laboratório mostraram que 30% das amostras de HIV-1 pertenciam ao subtipo C, enquanto que 67% eram do subtipo B e 3% do subtipo F.

Assim, a possibilidade de analisar as amostras das gestantes provenientes de duas regiões geográficas com prevalência de subtipos de HIV-1 diferenciados, nos permitiu, não somente comparar as diferenças quanto à frequência dos subtipos virais nestes grupos, mas também a ocorrência da possível associação entre infecção por determinado subtipo viral e transmissão vertical do HIV.

Das 148 gestantes incluídas neste estudo conseguimos a amplificação das regiões do envelope e da polimerase viral de 115 destas. Alguns dos problemas de amplificação por PCR dos diferentes alvos gênicos podem ter sido devido à carga viral baixa, falta de pareamento dos iniciadores com algumas seqüências na reação da PCR, ou até mesmo algo que pudesse estar interferindo na amplificação destas amostras, como o uso de anticoagulantes não específicos para coleta de sangue para extração de DNA. A maior perda ocorreu entre as amostras de Porto Alegre, indicando que uma outra possibilidade seria o fato de ocorrerem alguns problemas relacionados ao processamento e transporte destas amostras.

Analisando os genes do envelope e da polimerase viral nas 42 das 50 amostras do Rio de Janeiro, vimos que 36(86%) apresentavam o perfil B_{pol}/B_{env}, 4(10%) o perfil F_{pol}/F_{env}, concordando com estudos previamente realizados sobre diversidade em envelope e polimerase (Brindeiro e cols, 2003; Soares e cols, 2004). Duas amostras apresentaram perfis discordantes, apresentando o perfil F_{PR}/B_{RT}/B_{env}. Não encontramos nenhuma gestante infectada com o subtipo C do HIV-1 dentre as amostras do Rio de Janeiro, confirmando a baixa prevalência deste subtipo no estado. Por outro lado, dados de subtipagem genética e resistência aos anti-retrovirais do HIV-1 em pacientes apresentando falha a TARV no Rio de Janeiro

mostram a presença de casos esporádicos do subtipo C e o surgimento crescente de formas recombinantes B/F na população estudada (Couto-Fernandez e cols, 2005). De fato, pudemos observar a presença desta forma recombinante em duas gestantes comprovando a circulação destes recombinantes B/F também em gestantes no Rio de Janeiro.

Já na região Sul, a análise das 70 gestantes nos permitiu demonstrar a expansão do subtipo C nesta região, representando 61,5% das gestantes infectadas apresentando o perfil C_{pol}/C_{env} , seguido pelo perfil B_{pol}/B_{env} com 21,5%, e uma amostra com o perfil F_{pol}/F_{env} . Algumas gestantes apresentaram perfis discordantes entre as regiões da polimerase e do envelope, sugestivos de genomas recombinantes, 4 apresentaram o perfil C_{pol}/B_{env} , 3 com o perfil B_{pol}/C_{env} , e uma perfil F_{pol}/C_{env} . Observamos um caso de dupla infecção com o perfil B_{pol} e B/C_{env} , e outro caso em que a amostra apresentou o perfil B/C entre os genes da PR e da TR. Tivemos a oportunidade de seqüenciar uma amostra (RGS51), onde encontramos todos os subtipos circulantes nas duas regiões do estudo, apresentando o perfil $F_{PR}/B_{RT}/C_{env}$. Estas amostras em conjunto representam 15,7% das amostras analisadas sugerindo a ocorrência de formas recombinantes únicas (URF) entre os subtipos C e B em maior proporção e entre os subtipos C e F em menor proporção na região sul.

De acordo com um relatório realizado pela Rede Internacional para Isolamento e Caracterização do HIV coordenada pela UNAIDS, a maioria das novas infecções é devida ao subtipo C, causando 47,2% das infecções no mundo. (Osmanov e cols, 2002).

A primeira amostra do subtipo C encontrada no Brasil foi oriunda da região Sul, identificada em 1994 através de um estudo multicêntrico coordenado pela Organização Mundial da saúde-OMS (WHO, 1994). Subseqüentemente, vários outros estudos têm mostrado a expansão deste subtipo nesta região em amostras colhidas no período de 1994 até 1998 (Guimarães e cols, 2002; de Martinez e cols, 2002). Soares e cols, 2003 caracterizando cepas do subtipo C que circulam no Brasil, especialmente aquelas que tiveram origem na região Sul do país, verificou que o vírus C brasileiro forma um grupo monofilético quando comparado a outras cepas do subtipo C em outros países, apresentando uma assinatura específica de aminoácidos.

Verificou também que recombinantes entre os subtipos B e C têm sido encontrados em áreas onde ambos os subtipos circulam. Neste estudo a prevalência do subtipo C era de aproximadamente 28,6%, seguido pelo subtipo B com 55,2% e 6,7% subtipo F. Dez seqüências mostraram evidências de recombinação entre dois ou mais subtipos (Soares e cols, 2003). Outro estudo realizado no Sul por de Martinez e cols em 2002 encontrou 75% das amostras pertencentes ao subtipo B, 22% sub C e 3% sub F, embora não tenham encontrado diferenças significativas entre as infecções pelos subtipos B e C.

A possibilidade de que o subtipo genético do HIV possa influenciar na transmissibilidade e patogenicidade do HIV-1 tem sido sugerida, no entanto, resultados de vários estudos não têm indicado associações entre os subtipos do HIV e sua transmissão e/ou patogênese (Kandathil e cols, 2005).

Dados de um estudo realizado na África do Sul (Van Harmelen e cols, 1997) mostraram que o subtipo B estaria mais associado com a transmissão homossexual, enquanto que o subtipo C com a transmissão heterossexual.

Por outro lado, um estudo realizado no Japão, Yoshino e cols (1998) não observaram diferenças significativas entre os subtipos B e E.

No entanto, em um estudo sobre transmissão vertical na Tanzânia, Renjifo e cols (2001) observaram que mães infectadas pelos subtipos A, C e recombinantes tinham mais tendência à transmissão vertical do que aquelas infectadas pelo subtipo D. Em 2003, Tàpia e cols realizaram um estudo para avaliar se o subtipo de HIV-1 poderia influenciar na transmissão vertical analisando 31 amostras de gestantes da Tanzânia (46% do subtipo A, 21% do subtipo C, 2,7% do subtipo D e 25% de formas recombinantes). Entre as oito mães transmissoras, 4 eram do subtipo A, 1 subtipo C, 3 recombinantes A/C e verificaram que não existia nenhuma diferença significativa na transmissibilidade do HIV-1 entre os subtipos A, C, D e formas recombinantes.

Em outro estudo do mesmo autor (Renjifo e cols, 2003) em Dar es Salaam, na África, analisando gestantes sem tratamento anti-retroviral e infectadas com os subtipos A, C e D, concluíram que houve uma maior transmissão intra-útero do subtipo C em relação aos subtipos A e D. A transmissão vertical ocorreu predominantemente no parto e durante amamentação com os subtipos A e D, enquanto que com o subtipo C, a transmissão intra-útero foi mais freqüente (OR 2,54 C vs subtipos A e D, $p=0,026$). Não houve diferença de carga viral materna por subtipo, sugerindo

maior capacidade do subtipo C de infectar células placentárias. A implicação prática deste estudo, conforme sugerida pelos autores, seria que, para o subtipo C, em especial, administração de anti-retrovirais somente durante o trabalho de parto será menos efetivo na redução da transmissão vertical do HIV-1 (Renjifo e cols, 2003). Dados brasileiros de Janini e cols em 1998 mostraram a transmissão vertical dos subtipos B e C a partir de mãe duplamente infectada.

Em nossa casuística detectamos a presença do subtipo C em 63% das gestantes. Esse fato pode servir como marcador fidedigno da prevalência deste subtipo na população infectada via heterossexual confirmando dados anteriores de uma alta prevalência deste subtipo na região sul.

Quando analisamos as 18 amostras das 21 gestantes transmissoras, encontramos 7 (39%) com o subtipo B, 8 (44,5%) com subtipo C, e 2 (11%) subtipo F. Apenas uma amostra (5,5%) apresentou divergência entre as regiões, apresentando subtipo C nas regiões do envelope e da transcriptase e B na região da protease. Não encontramos nenhuma associação entre transmissibilidade do HIV e o subtipo viral.

Entretanto, comparando gestantes infectadas pelos subtipos B e C do HIV-1, não houve nenhuma evidência de transmissão preferencial do subtipo C. De fato, em relação à transmissão intra-uterina 50% era do subtipo B e 50% do subtipo C.

Resistência primária aos anti-retrovirais

A transmissão e disseminação de cepas resistentes às drogas anti-retrovirais representam um importante problema de Saúde Pública, pela sua implicação na transmissão vertical, reduzindo a eficiência do tratamento para indivíduos HIV positivos, bem como na profilaxia contra casos de exposição acidental. Além disso, o rápido aparecimento de variantes resistentes à terapia anti-retroviral (TARV) é o principal obstáculo para o tratamento bem-sucedido da infecção pelo HIV-1.

Apesar da comprovada eficácia da nevirapina (NVP) na redução da transmissão vertical, foi evidenciado o desenvolvimento de mutações associadas à resistência aos inibidores da transcriptase reversa não nucleosídeos, quando

empregada como monoterapia em adultos e na prevenção da transmissão vertical em mulheres e recém-nascidos (Eshleman e cols, 2001; Jackson e cols, 2000).

Neste estudo, identificamos a presença de mutações principais de resistência aos inibidores da protease e inibidores da transcriptase reversa em 3,5% e 4,3%, respectivamente, das amostras de gestantes virgens de tratamento. Pudemos identificar também mutações secundárias ou acessórias, e a presença de polimorfismos naturais em 92% das amostras. Somente 8% das gestantes estavam infectadas com vírus do tipo selvagem, ou seja, sem nenhuma mutação em seu genoma. Comparando com dados de Brindeiro e cols, 2003, os autores encontraram em uma população de indivíduos soropositivos para o HIV-1, voluntários de centros de testagem e aconselhamento, virgens de tratamento, uma prevalência de 2,24% de mutações primárias relacionadas aos inibidores da protease e 4,42% aos inibidores da transcriptase reversa.

Na ausência de exposição às drogas as seqüências dos genes da protease da transcriptase reversa dos subtipos B e não-B são polimórficas em aproximadamente 40% nos primeiros 240 aminoácidos da RT e em 30% dos 99 aminoácidos da protease (Shafer, 2002). Muitas destas substituições de aminoácidos ocorrem em altas taxas em vírus subtipo não-B em posições associadas com resistência a drogas em vírus subtipo B, estas incluem as posições 10, 20, 36, 63, 71,77 e 93 na região da protease e nas posições 69, 75, 98, 106,118 e 179 na transcriptase reversa (Kantor e Katzenstein, 2003). Mutações nos códons 10, 20, 36 e 71 ocorrem entre 10% de pessoas não – tratadas infectadas com o subtipo B (Shafer, 2002). Estas mutações em sítios polimórficos e conservados estão associados com resistência às drogas em vírus do subtipo B, são encontrados em altas taxas em pessoas não tratadas infectadas com vírus HIV não B (Kantor e cols, 2005).

As mutações principais encontradas em nossa casuística foram M46I/L, V82L e D30N na região da protease, e M41L, V179D, M184I/V, G190E/R na região da transcriptase reversa. Em um estudo realizado na França em 2000, Vergne e cols analisaram o gene da polimerase de 142 indivíduos virgens de tratamento, não encontraram nenhuma mutação primária de resistência a nenhuma das drogas. No entanto, encontraram diversas mutações acessórias, principalmente no gene da protease, onde somente 5,6% das amostras não apresentaram mutações secundárias na protease, todas eram pertencentes

aos subtipos B e D. Foram encontradas as seguintes frequências de mutações: M36I (86,6%), L10I/V (26%), L63P (12,6%), K20M/R (11,2%), V77I (5,6%), A71V (2,8%) e M46I (0,7%).

Little e cols em 2002 realizaram um estudo durante cinco anos em 10 cidades norte americanas em 377 indivíduos virgens de tratamento. Estes autores concluíram que a proporção de novas infecções envolvendo a transmissão de HIV resistente às drogas esta aumentando na América do Norte, encontrando uma frequência de resistência primária de 3,4% durante o período entre 1995 a 1998, e 12,4% no período de 1999 a 2000. Um outro estudo (ANRS 1257) realizado na Costa do Marfím em 107 indivíduos sem terapia em 2001 e 2002, esta taxa foi de 5,6% (Toni e cols, 2003).

Em um estudo realizado no Vietnam em 2003 foi encontrada uma taxa de 6,5% de resistência primária (Lan e cols, 2003). Na Suíça a taxa de resistência primária em soroconvertedores recentes encontra-se entre 5 a 11%, 4 a 17% na França, 13% na Alemanha e entre 23 a 26% na Espanha (revisto por Soares e cols, 2004).

Quatro gestantes virgens de tratamento incluídas no presente estudo apresentaram resistência primária aos inibidores da protease (3,5%). Destas, duas eram procedentes do RJ e 2 de Porto Alegre, representando uma prevalência de 4,5% e 2,9%, respectivamente.

Em relação às mutações acessórias no gene da protease, observamos uma maior frequência de substituições dos resíduos 36, 63, 77 e 93 concordando com dados previamente descritos por Brindeiro e cols, 2003.

Polimorfismos nas posições 10, 20, 36, 63, 71, 77 e 93 não conduzem a uma resistência por si só, mas compensam a reduzida atividade da protease causada por mutações principais (Nijhuis e cols, 1999).

Tivemos a oportunidade de observar que certas substituições ocorreram de maneira diferenciada entre as amostras do subtipo B e não-B. A mutação acessória L63P ocorreu em 73,5% das amostras do subtipo B comparando com 26,5% em amostras do subtipo não - B. A presença da mutação M36I foi observada em 67% das amostras do subtipo C e em todas as amostras do subtipo F, estes resultados estão de acordo com estudos de genotipagem da resistência do HIV-1 no Rio de Janeiro (Renageno) que mostraram esse mesmo tipo de associação subtipo-específica (Couto-Fernandez e cols, 2005).

As mutações L10I/V e A71T foram identificadas somente em amostras do subtipo B. Soares e cols em 2003 concluíram que a mutação M36I estaria associada ao subtipo C e a mutação L63P ao subtipo B. Este aspecto diferenciado do padrão de mutações entre os subtipos virais já é conhecido (Kantor e cols, 2005).

Encontramos uma frequência de 46% correspondente a mutações no códon 63, envolvendo a troca da leucina pela prolina (L63P), entre outras substituições como isoleucina, glutamina, cisteína, alanina, histidina, valina e tirosina. Sendo que 73,5% foram presentes em amostras do subtipo B.

Identificamos também a presença de mais de uma mutação em 75 (65%) das 111 amostras nas quais não foram encontradas mutações primárias, apenas mutações secundárias, mostrando que é freqüente a existência de múltiplas mutações secundárias associadas à resistência no gene da protease. Esta alta prevalência de mutações secundárias observada no gene da protease pode ser explicada devido ao alto grau de diversidade genética nesta região, como previamente descrito (Wegner e cols, 2000).

No Brasil em 1999, Brindeiro e cols estudando a frequência de resistência primária em 32 amostras de bancos de sangue no Rio de Janeiro e no Rio Grande do Sul encontraram 9,38% de frequência de resistência primária as drogas principalmente relacionadas à resistência ao AZT. A mutação M41L foi encontrada em duas amostras das gestantes soropositivas. Estudo que avaliou também uma população de doadores de sangue do Rio de Janeiro em 1998 (Dumans e cols, 2002) não encontrou mutações principais nas regiões da protease e da transcriptase reversa para a resistência as drogas, no entanto 85% das amostras apresentaram mutações secundárias. A mutação L63P foi a substituição mais comum, seguida pela V77I, M36I, A71V/T. Neste estudo os autores encontraram baixa presença de cepas resistentes circulantes em indivíduos virgens de tratamento, e discutiram que estes dados não apoiavam indicação de genotipagem antes da terapia anti-retroviral.

A emergência de variantes resistentes ao AZT em mulheres grávidas e nas suas proles tem sido descrita em vários estudos (revisto por Brenner & Wainberg, 2000), embora a associação entre resistência ao AZT e a maior transmissibilidade para o feto seja ainda matéria controversa. Colgrove e cols (1998) estudando uma população de gestantes que fizeram uso de zidovudina

durante a gestação mostraram que as mães transmissoras tinham uma frequência maior de variantes resistentes do que as não-transmissoras. Por sua vez, Eastman e cols (1998) verificaram que o risco de transmissão não era maior para gestantes com baixo nível de resistência. Em um estudo realizado na França, Masquelier e cols (2001) mostraram que a ocorrência de resistência ao AZT nos isolados virais de recém-nascidos estava associada com o tempo de exposição à droga. Observamos nas amostras obtidas tanto das mães identificadas no parto como soropositivas para o HIV, assim como nas crianças expostas e que vieram a se infectar pelo vírus apesar da pronta introdução da terapia anti-retroviral, a presença de variantes virais já resistentes aos anti-retrovirais.

A possibilidade de seleção de variantes virais que são resistentes aos anti-retrovirais tem sido de grande preocupação, particularmente com respeito a nevirapina, porque uma única mutação pode induzir uma resistência de alto nível a nevirapina assim como a outros ITRNN (Coovadia, 2004). Uma das principais questões sobre o esquema terapêutico em gestantes na prevenção da transmissão vertical é a escolha de anti-retrovirais que poderão ser administrados a essas mulheres em tratamentos futuros a gestação (Jourdain e cols, 2004).

No geral, as mutações de resistência descritas para o subtipo B do HIV-1, que correspondem a grande maioria dos vírus que circulam na América do Norte e na Europa Ocidental, apresentam repercussões semelhantes para os vírus dos subtipos não-B. Fato não esclarecido é a existência de algumas mutações que aparecem com frequência no subtipo B e não são observadas nos subtipos não-B e a possibilidade de mutações que seriam exclusivas para subtipos não-B das quais ainda não se tem conhecimento. Dessa forma, não é incomum nos depararmos com pacientes que apresentem falha aos anti-retrovirais sem mutações detectadas na genotipagem, para os padrões de conhecimento atuais. Alguns polimorfismos que aparecem em cepas não-B podem contribuir para uma resistência natural aos anti-retrovirais.

Os subtipos do HIV-1 diferem um dos outros entre 10% a 15% dos seus nucleotídeos e de 5% a 6% de seus aminoácidos, respectivamente, na protease e na transcriptase reversa (Gonzáles e cols, 2001). Estas diferenças entre os subtipos podem influenciar no espectro das mutações desenvolvidas durante

a pressão seletiva das drogas anti-retrovirais. Alguns estudos mostram que as drogas anti-retrovirais atuam tão bem contra vírus do subtipo B quanto para vírus do subtipo não-B (Vergne e cols, 2002; Weidle e cols, 2003), no entanto, outros estudos avaliaram o mecanismo genético de resistência às drogas em vírus não-B, e algumas observações *in vitro* e *in vivo* sugerem que os vários subtipos podem responder de uma maneira diferente a certos anti-retrovirais. (Caride e cols, 2001; Grossman e cols, 2004). Em um estudo que resultou de uma colaboração global realizado por Kantor e cols, concluíram que a maioria das mutações encontradas nos vírus do subtipo B não foram também observados nos subtipos não-B (Kantor e cols, 2005).

Não há um fator de risco ou fator protetor que, isoladamente, determine a transmissão ou possa preveni-la. Por outro lado, as estratégias atualmente disponíveis, quando aplicadas precocemente, quase interrompem a cadeia de transmissão vertical do HIV-1.

As mutações de resistência às drogas em pacientes virgens de tratamento não são resultado de uma capacidade individual do vírus, muitas dessas mutações que ocorrem parecem ser deletérias para o vírus na ausência de pressão da droga. Por exemplo, as mutações M184I e G190E encontradas nas seqüências das gestantes TR35 e HF39, HC25, RGS13 são conhecidas por causar uma perda drástica de fitness viral na ausência da droga (Boyer e cols, 1998).

Em um estudo que investigou a freqüência de mutações associadas à resistência às classes de anti-retrovirais em pacientes não tratados na Grécia, onde a maioria das amostras pertencia ao subtipo B, foi observado o polimorfismo V118I em 8% das amostras analisadas (Magiorkinis e cols, 2002). Este polimorfismo foi descrito por estar associado à resistência a lamivudina na presença de mutações a zidovudina. (Hertogs e cols, 2000). No nosso trabalho encontramos 3 amostras apresentando a mutação V118I.

A resistência às drogas é o maior obstáculo para um tratamento efetivo da infecção pelo HIV-1. A resistência primária as drogas está se disseminando em muitos países onde a terapia anti-retroviral é utilizada. Pessoas infectadas com essas variantes resistentes às drogas podem apresentar um alto risco de falha terapêutica, mesmo sem nunca terem recebido tratamento.

Até o final do século 20, era estimado que aproximadamente 1,5 milhões de crianças estariam vivendo com HIV no mundo e que a cada ano 500 a 600 mil adquiriram a infecção de suas mães. Atualmente esses números chegam a 2,2 milhões de crianças infectadas e 640.000 novos casos por ano. (UNAIDS, 2005). Em nosso estudo comprovamos a transmissão vertical da infecção em 17 das 148 (11%) gestantes, sendo 6(35%) no Rio de Janeiro e 11(65%) em Porto Alegre. A transmissão do vírus da mãe para seu filho pode ocorrer em três momentos: intra-útero, intraparto e no pós-parto, através do aleitamento materno (Bryson, 1996; Orloff e cols, 1996).

Na nossa casuística, a transmissão intra-útero ocorreu em dez bebês. Neles a positividade ao HIV foi definida por PCR DNA nos primeiros dias de vida, com duas amostras subseqüentes confirmatórias indicando transmissão intra-útero. Nos outros 7 casos de transmissão perinatal, não podemos precisamente determinar o real momento em que houve a transmissão, se foi durante o trabalho de parto ou através da amamentação, por não ter os dados de acompanhamento destas crianças.

Em 1998 o risco de transmissão vertical em gestantes soropositivas na cidade de São Paulo foi estimado em 16%, os autores sugerem que a maior parte das transmissões ocorreu devido à doença avançada da mãe e amamentação (Tess e cols, 1998). Nogueira e cols em 2001 encontraram uma taxa de 2,75% de transmissão vertical em gestantes acompanhadas no Rio de Janeiro, todas com tratamento anti-retroviral.

Resultados de um estudo no qual a testagem para o HIV foi oferecida a gestantes no momento do parto demonstraram uma prevalência de positividade entre 0,4–7,2% nas várias cidades brasileiras (Veloso e cols, 2002).

Posteriormente, em 2003 João e cols estudaram uma coorte de 297 gestantes durante cinco anos, a taxa de transmissão ficou em torno de 3,57%, verificaram também apesar do tratamento anti-retroviral durante a gestação não houve risco mais baixo de transmissão vertical (João e cols, 2003). Análise apresentada neste estudo utilizando amostras representativas de gestantes provenientes de diferentes espectros da epidemia no Brasil mostraram 1,3% de prevalência no RJ e 6% em PoA. Estes dados estão sendo analisados e serão discutidos no manuscrito em preparação (Veloso e cols, 2005).

Com este estudo tivemos a oportunidade de avaliar a diversidade genética do HIV-1 em gestantes infectadas com diferentes dos subtipos virais nas regiões Sul e

Sudeste do Brasil. Estes resultados poderão contribuir para futuros estudos sobre vacinas e tratamento anti-HIV/AIDS. Mostramos também, o atual panorama epidemiológico quanto a transmissão vertical do HIV-1, onde encontramos baixas taxas nesta categoria de exposição, sem associação entre o subtipo viral e a via de transmissão.

Nossa casuística de estudo pode servir como um sistema de monitoramento da diversidade viral do HIV, assim como, no controle da transmissão vertical no Brasil. O estudo dos níveis de resistência e susceptibilidade as drogas nesta população contribuirá igualmente para escolha da terapia anti-retroviral futura nesta população, assim como, monitorar a transmissão desta resistência através da avaliação de variantes virais resistentes circulantes na população de gestantes soropositivas para o HIV-1.

Conclusões

► Verificamos a presença de vários subtipos circulando nas duas regiões (Sul e Sudeste) do nosso país, e também a presença de genomas potencialmente recombinantes, justificando o monitoramento epidemiológico destas regiões estudadas.

► A presença de mutações de resistência entre mulheres sem tratamento anti-retroviral comprova a transmissão de variantes resistentes entre indivíduos infectados pelo HIV-1, e possivelmente aos seus filhos, enfatizando a importância do monitoramento desses níveis de resistência primária na população.

► Não foram observadas diferenças significativas quanto ao status imunológico, carga viral e subtipo viral em relação a transmissão vertical em mulheres infectadas com os subtipos B e C do HIV-1.

► Polimorfismos específicos a determinados subtipos podem influenciar na emergência de resistência as drogas e no impacto no tratamento e desenvolvimento de vacinas para o HIV-1 no país.

► A identificação precoce da infecção pelo HIV-1 é crucial para a implementação de estratégias para prevenção da transmissão vertical do HIV-1 de mãe para filho.

Referências Bibliográficas

Abbas KA, Lichtman AH, Pober JS 2000 Cellular and Molecular immunology 3rd edition

Alaeus A. 2000 Significance of HIV-1 genetic subtypes. *Scand J Infect Dis*.32:455-463.

[Apetrei C](#), [Buzdugan I](#), [Mitroi I](#), [Iancu L](#), [Duca M](#) 1994. Nosocomial HIV-1 transmission and primary prevention in Romania. *Lancet* 344(8928):1028-1029.

[Barbour JD](#), [Grant RM](#) 2005. The Role of Viral Fitness in HIV Pathogenesis. *Curr HIV/AIDS Rep*.2(1):29-34.

Barré-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F 1983. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for AIDS. *Science* 220:868-871

Bennett, D, Zaidi I, Heneine W. Prevalence of mutations associated with anti-retroviral drug resistance among recently diagnosed persons with HIV. 1998-2000. In: Program and abstracts of the 9th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections; February 24-28, 2002 Seattle. Abstract 372-M.

- Bobat R, Moodley D, Coutsooudis A, Coovadia H 1997. Breastfeeding by HIV-1 infected women and outcome in their infants: a cohort study from Durban, South Africa. *AIDS* 11(13):1627-1633.**
- Bobkov AF, Kazennova EV, Selimova LM, Khanina TA, Ryabov GS, Bobkova MR, Sukhanova AL, Kravchenko AV, Ladnaya NN, Weber JN, Pokrovsky VV 2004. Temporal trends in the HIV-1 epidemic in Russia: predominance of subtype A. *J Med Virol.* 74(2):191-6**
- Bongertz V. 2001. Vertical Human Immunodeficiency Virus Type-1- HIV-1 – transmission – A Review. *Mem Inst Oswaldo Cruz,* 96(1): 1-14**
- Boyer PL, Gao HQ, Hughes SH 1998. A mutation at position 190 of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase interacts with mutations at positions 74 and 75 via the template primer. *Antimicrob Agents Chemother,* 2(2):447-52 .**
- [Brenner BG](#), [Wainberg MA](#). 2000. The role of antiretrovirals and drug resistance in vertical transmission of HIV-1 infection. *Ann N Y Acad Sci.* 918:9-15.**
- Brindeiro R, Vanderborght B, Caride E, Correa L, Oravec RM, Berro O, Stuyver L, Tanuri A 1999. Sequence Diversity of the Reverse Transcriptase of Human Immunodeficiency Virus Type 1 from Untreated Brazilian Individuals. *Antimicrob Agents Chemother* 43(7) 1674-1680.
- Brindeiro RM, Diaz RS, Sabino EC, Morgado MG, Pires IL, Brigido L, Dantas MC, Barreira D, Teixeira PR, Tanuri A and the Brazilian Network for Drug Resistance Surveillance 2003. Brazilian Network for Drug Resistance Surveillance (HIV-BResNet): a survey of chronically infected individuals. *AIDS* 17(7):1063-1069.
- Bryson YJ 1996. Perinatal HIV-1 transmission: recent advances and therapeutic interventions *AIDS. Dec; 10 Suppl 3: S33-42.*

Burns DN, Landesman S, Wright DJ, Waters D, Mitchell RM, Rubinstein A, Willoughby A, Goedert JJ 1997. Influence of other maternal variables on the relationship between maternal viral load and mother-to-infant transmission of human immunodeficiency virus type 1. *J Infect Dis* 175(5):1206-1210.

[Campodonico M](#), [Janssens W](#), [Heyndrickx L](#), [Fransen K](#), [Leonaers A](#), [Fay FF](#), [Taborda M](#), [Van der Groen G](#), [Fay OH](#) 1996. HIV type 1 subtypes in Argentina and genetic heterogeneity of the V3 region. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1996 Jan 1;12(1):79-81.

Caride E, Brindeiro R, Hertogs K, Lader B, Dehertogh P, Machado E, Moraes-de-Sá CA, Eyer-Silva WA, Sion FS, Passioni LF, Menezes JÁ, Calazans AR, Tanuri A 2000. Drug-resistance reverse transcriptase genotyping and phenotyping of B and non-B subtypes (F and A) of human immunodeficiency virus type 1 found in Brazilian patients failing HAART. *Virology* 15;275(1):107-115.

[Caride E](#), [Hertogs K](#), [Lader B](#), [Dehertogh P](#), [Brindeiro R](#), [Machado E](#), [de Sa CA](#), [Eyer-Silva WA](#), [Sion FS](#), [Passioni LF](#), [Menezes JA](#), [Calazans AR](#), [Tanuri A](#). 2001 Genotypic and phenotypic evidence of different drug-resistance mutation patterns between B and non-B subtype isolates of human immunodeficiency virus type 1 found in Brazilian patients failing HAART. *Virus Genes* 23(2):193-202.

[Castro E](#), [Echeverria G](#), [Deibis L](#), [Gonzalez de Salmen B](#), [Dos Santos Moreira A](#), [Guimaraes ML](#), [Bastos FI](#), [Morgado MG](#) 2003. Molecular epidemiology of HIV-1 in Venezuela: high prevalence of HIV-1 subtype B and identification of a B/F recombinant infection. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 32(3):338-344.

Centers for Disease Control and Prevention. HIV/AIDS Surveillance General Epidemiology. 1982, www.cdc.gov

Centers for Disease Control and Prevention. HIV/AIDS Surveillance General Epidemiology. 17 July 2000, www.cdc.gov

Chuachoowong R, Shaffer N, Siriwasin W, Chaisilwattana P, Young NL, Mock PA, Chearskul S, Waranawat N, Chaowanachan T, Karon J, Simonds RJ, Mastro TD. 2000. Short-course antenatal zidovudine reduces both cervico-vaginal human immunodeficiency virus type 1 RNA levels and risk of perinatal transmission. *J Infect Dis* 181(1):99-106.

Clavel F, [Guétard D](#), [Brun-Vezinet F](#), [Chamaret S](#), [Rey MA](#), [Santos-Ferreira MO](#), [Laurent AG](#), [Dauguet C](#), [Katlama C](#), [Rouzioux C](#) 1986. Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science* 233(4761):343-346

Coffin JM 1995. HIV population dynamics in vivo: implications for genetic variation, pathogenesis and therapy. *Science* 267:438-488.

[Cohen EA](#), [Subbramanian RA](#), [Gottlinger HG](#) 1996. Role of auxiliary proteins in retroviral morphogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol* 214:219-35.

Cohen MS, Miller WC 1998. Sexually transmitted diseases and human immunodeficiency virus infection: cause, effect, or both? *Int J Infect Dis* (1):5-11

Colgrove RC, Pitt J, Chung PH, Welles SL, Japour AJ 1998. Selective vertical transmission of HIV-1 anti-retroviral resistance mutations. *AIDS* 12:2281-2288.

Coovadia H 2004. Anti-retroviral Agents – How Best to protect Infants from HIV and Save their mothers from AIDS. *N Engl J Med* 351:289-292.

Connor EM, Sperling RS, Gelber R, Kiselev P, Scott G, O'Sullivan MJ, VanDyke R, Bey M, Shearer W, Jacobson RL 1994. Reduction of maternal-infant transmission of human immunodeficiency virus type 1 with zidovudine treatment. Pediatric AIDS Clinical Trial Group Protocol 076 Study Group. *N Engl J Med* 331:1173-1180.

Corbitt G, Bailey AS, 1990. AIDS in Manchester, 1959? 1995. *Lancet* 336(8706):51

Cornelissen M, Kampinga G, Zorgdragen F, Goudsmit J, UNAIDS Network for HIV Isolation and Characterization 1996. Human immunodeficiency virus type 1 subtypes defined by *env* show high frequency of recombinant *gag* genes. *J Virol* 70:8209-8212.

[Couto-Fernandez JC](#), [Morgado MG](#), [Bongertz V](#), [Tanuri A](#), [Andrade T](#), [Brites C](#), [Galvao-Castro B](#) 1999. HIV-1 subtyping in Salvador, Bahia, Brazil: a city with African sociodemographic characteristics. *J Acquir Immune Defic Syndr*.22(3):288-293.

[Couto-Fernandez JC](#), [Silva-de-Jesus C](#), [Velooso VG](#), [Rachid M](#), [Gracie RS](#), [Chequer-Fernandez SL](#), [Oliveira SM](#), [Arakaki-Sanchez D](#), [Chequer PJ](#), [Morgado MG](#) 2005 Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) genotyping in Rio de Janeiro, Brazil: assessing subtype and drug-resistance associated mutations in HIV-1 infected individuals failing highly active antiretroviral therapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2005 Feb;100(1):73-8. Epub 2005 Apr 12.

Couturier E, Damond F, Roques P, Fleury H, Barin F, Brunet J-B, Brun-Vénizet F, Simon F 2000. HIV-1 diversity in France, 1996-1998. The AC 11 laboratory network. *AIDS* 14:289-296.

Covas DT, Biscaro TA, Kashina S, Duarte G, Machado A 1998. A high frequency of the GWG (pro Trp) envelope variant of HIV-1 in Southern Brasil. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 19(1):74-79.

Damond F, Worobey M, Campa P, Farfara I, Colin G, Matheron S, Brun-Vezinet F, Robertson DL, Simon F 2004. Identification of a highly divergent HIV type 2 and

proposal for a change in HIV type 2 classification. *AIDS Res Hum Retrovir* 20(6):666-72

Dean M, Carrington M, Winkler C, Huttley G, Smith M, Allikmets R, Goedert J, Buchbinder S, Vittinghoff E, Gomperts E, Donfield S, Vlahov D, Kaslow R, Saah A, Rinaldo C, Detels R, O'Brien S 1996. Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the CKCR5 structural gene. *Science* 273:1856-1862.

Delwart E, Shpaer EG, Louwagie J, McCutchan FE, Grez M, Rubsamen-Waigmann H, Mullins JI 1993. Genetic Relationships Determined by a DNA Heteroduplex Mobility Assay: Analysis of HIV-1 env genes. *Science* 262:1257-1261.

de Martinez AMB, Barbosa EF, Ferreira PC, Cardoso FA [Silveira J](#), [Sassi G](#), [da Silva CM](#), [Mendonca-Signorini V](#), [Antunes CM](#) 2002. Molecular epidemiology of HIV-1 in Rio Grande, RS, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 35(5):471-476.

Diaz RS, Filho AC 2004. HIV 50 FAQ Frequently Asked Questions.

Dumans AT, Soares MA, Pieniazek D, Kalish ML, De Vroey V, Hertogs K, Tanuri A 2002. Prevalence of protease and transcriptase reverse drug resistance mutations over time in drug-naive human immunodeficiency virus type 1 positive individuals in Rio de Janeiro, Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 46(9):3075-3079.

Dunn DT, Newell ML, Mayaux MJ, Kind C, Hutto C, Goedert JJ, Andiman W 1994. Mode of delivery and vertical transmission of HIV-1: a review of prospective studies. Perinatal AIDS Collaborative Transmission Studies. *J Acquir Immune Defic Syndr* 7:1064-1066.

Eastman PS, Shapiro DE, Coombs RW, [Frenkel LM](#), [McSherry GD](#), [Britto P](#), [Herman SA](#), [Sperling RS](#). 1998. Maternal viral zidovudine resistance and infrequent failure of zidovudine therapy to prevent perinatal transmission of human immunodeficiency virus type 1 in Pediatric AIDS Clinical Trials Group Protocol 076. *J Infect Dis* 177:557-564.

- Eshleman SH, Mracna M, Guay LA, Deseyve M, Cunningham S, Mirochnickb M, Fleming T, Fowlere MG, Mofenson LM, Mmirog J, Brooks J 2001. Selection and fading of resistance mutations in women and infants receiving nevirapine to prevent HIV-1 vertical transmission (HIVNET012). *AIDS* 15:1951-1957.
- Freed EO and Martin MA HIV and their replication In: *Fields Virology* Authors: Knipe DM, Howley PM Volume 2 4^a edição 2001pp:1971-2041.
- Frankel AD, Young JA 1998. HIV-1: Fifteen proteins and an RNA. *Annu Rev Biochem* 67:1-25.
- Freed EO, Martin MA 1994. Evidence for a functional interaction between the V1/V2 and C4 domains of Human Immunodeficiency Virus Type 1 envelope glycoprotein gp120. *J. Virology* 68:2503-2512.
- Froland SS, Jenum P, Lindboe CF, Wefring KW, Linnestad PJ, Bohmer T 1988. HIV-1 Infection in Norwegian family before 1970. *Lancet* 1(8598):1344-1345
- Galvão-Castro B, Ivo-dos-Santos J, Couto-Fernandez JC, Chequer-Bou-Habib D, Sion FS, Barth OM, Pereira H, Pereira MS 1987. Isolation and antigenic characterization of human immunodeficiency vírus (HIV) in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 82:453-456.
- Gao F, Yue L, White AT, Pappas PG, Barchue J, Hanson AP, Greene BM, Sharp PM, Shaw GM, Hahn BH 1992. Human infection by genetically diverse SIV SM-related HIV-2 in West Africa. *Nature* 358 (6386):495-499.
- Gao F, Bailes E, Robertson DL, Chen Y, Rodenburg CM, Michael SF, Cummins LB, Arthur LO, Peeters M, Shaw GM, Sharp PM, Hahn B 1999. Origin of HIV-1 in the chipanzee *Pan Troglodytes troglodytes*. *Nature* 397:436-441.
- Gao F, Vidal N, Li Y, Trask SA, Chen Y, Kostrikis LG, Ho DD, Kim J, Oh MD, Choe K, Salminem M, Robertson DL, Shaw GM, Hahn BH, Peeters M 2001. Evidence for two distinct sub-subtypes within the HIV-1 subtype A radiation. *AIDS Res Human Retro* 17(8):675:688.
- Gianvecchio RP, Goldberg TB 2005. Protective and risk factors related to vertical transmission of the HIV-1. *Cad Saúde Pública* 21(2):581-588.
- 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.

Gonzales MJ, Machekano RN, Shafer RW 2001. Human immunodeficiency virus type 1 reverse-transcriptase and protease subtypes: classification, amino acid mutation patterns, and prevalence in a northern California clinic-based population. *J Infect Dis.* 184(8):998-1006.

[Grossman Z](#), [Istomin V](#), [Averbuch D](#), [Lorber M](#), [Risenberg K](#), [Levi I](#), [Chowers M](#), [Burke M](#), [Bar Yaacov N](#), [Schapiro JM](#); [Israel AIDS Multi-Center Study Group](#). 2004 Genetic variation at NNRTI resistance-associated positions in patients infected with HIV-1 subtype C. *AIDS.* 18(6):909-915.

Guimarães ML, Moreira AS, Loureiro R, Galvão-Castro B, Morgado MG, Brazilian Network for HIV Isolation and Characterization 2002. High frequency of recombinant genomes in HIV type 1 samples from Brazilian southeastern and southern regions. *AIDS Res Hum Retroviruses* 18(17):1261-1269.

Grant RM, Hecht FM, Wardermam M, [Liu L](#), [Liegler T](#), [Petropoulos CJ](#), [Hellmann NS](#), [Chesney M](#), [Busch MP](#), [Kahn JO](#) 2002. Time trends in primary HIV-1 drug resistance among recently infected persons. *JAMA* 288:181-188.

Hahn BH, Shaw GM, De Cock KM, Sharp PM 2000. AIDS as a zoonosis: scientific and public health implications. *Science* 287:607-614.

Hertogs K, Bloor S, Kemp SD, Van den Eynde C, Alcorn TM, Pauwels R, Van Houtte M, [Staszewski S](#), [Miller V](#), [Larder BA](#). 2000. Phenotypic and genotypic analysis of clinical HIV-1 isolates reveals extensive protease inhibitor cross-resistance: a survey of over 6000 samples. *AIDS* 14(9):1203-1210.

[Hirsch MS](#), [Conway B](#), [D'Aquila RT](#), [Johnson VA](#), [Brun-Vezinet F](#), [Clotet B](#), [Demeter LM](#), [Hammer SM](#), [Jacobsen DM](#), [Kuritzkes DR](#), [Loveday C](#), [Mellors JW](#), [Vella S](#), [Richman DD](#). 1998 Antiretroviral drug resistance testing in adults with HIV infection: implications for clinical management. International AIDS Society--USA Panel *JAMA* 279(24):1984-1991

Ho DD, Neumann AU, Perelson AS, Chen W, Leonard JM, Markowitz M 1995. Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature* 373:123-126.

[Hope TJ](#) 1997. Viral RNA export. *Chem Biol.* (5):335-44.

Hu DJ, Dondero TJ, Rayfield MA, [George JR](#), [Schochetman G](#), [Jaffe HW](#), [Luo CC](#), [Kalish ML](#), [Weniger BG](#), [Pau CP](#), [Schable CA](#), [Curran JW](#) 1992. The emerging genetic diversity of HIV. The importance of global surveillance for diagnosis, research and prevention. *JAMA* 275(3):210-216.

[Jackson JB](#), [Becker-Pergola G](#), [Guay LA](#), [Musoke P](#), [Mracna M](#), [Fowler MG](#), [Mofenson LM](#), [Mirochnick M](#), [Mmiro F](#), [Eshleman SH](#). 2000 Identification of the K103N resistance mutation in Ugandan women receiving nevirapine to prevent HIV-1 vertical transmission. *AIDS* 14(11):111-115

Jaffe HW, Bregman DJ, Selik RM 1983. Acquired Immune Deficiency Syndrome in the United States: The first 1.000 cases. *J. Infectious Diseases* 148(2):339-345.

Jaffe HW, Schochetman G 1998. Group O human immunodeficiency virus-1 infectious. *Infect Dis Clin North Am* 12:39-46.

Janssen W, Buvé A, Nkengasong JN 1997. The puzzle of HIV-1 subtypes in África. *AIDS* 11:705-712.

Jett JR, Kuritsky JN, Katzmann JA, Homburger HA 1983. Acquired immunodeficiency syndrome associated with blood-product transfusions. *Ann Inter Med* 99(5):621-624.

João EC, Cruz MLS, [Menezes JA](#), [Matos HJ](#), [Calvet GA](#), [D'Ippolito MM](#), [Salgado T](#), [Silva SS](#), [Bazin GR](#), [Braga RC](#) 2003. Vertical transmission of HIV in Rio de Janeiro, Brazil. *AIDS* 17(12):1853-1856.

Jourdain G, Ngo-Giang-Huong N, Le Couer S, [Bowonwatanuwong C](#), [Kantipong P](#), [Leechanachai P](#), [Ariyadej S](#), [Leenasirimakul P](#), [Hammer S](#), [Lallemant M](#); [Perinatal](#)

[HIV Prevention Trial Group](#) 2004. Intrapartum exposure to nevirapine and subsequent maternal response to a nevirapine-based anti-retroviral therapy. *N Engl J Med* 351:229-240.

Kakuda TN, Struble KA, Piscitelli SC 1998. Protease inhibitors for the treatment of human immunodeficiency virus infection. *Am J Health Syst Pharm* 55(3):233-254.

Kalish LA, [Pitt J](#), [Lew J](#), [Landesman S](#), [Diaz C](#), [Hershow R](#), [Hollinger FB](#), [Pagano M](#), [Smeriglio V](#), [Moye J](#) 1997. Defining the time of fetal or perinatal acquisition of human immunodeficiency virus type 1 on the basis of age at first positive culture. *J Infect Dis* 175(3): 712 – 715.

Kandathil AJ, Ramalingam S, Kannangai R, David S, Sridharan G 2005. *Molecular epidemiology of HIV. Indian J Med Res* 121(4):333-344.

[Kantor R](#), [Katzenstein D](#) 2003 Polymorphism in HIV-1 non-subtype B protease and reverse transcriptase and its potential impact on drug susceptibility and drug resistance evolution. *AIDS Rev.* 5(1):25-35

Kantor R, Katzenstein DA, Efron B, Carvalho AP, Wynhoven B, [Cane P](#), [Clarke J](#), [Sirivichayakul S](#), [Soares MA](#), [Snoeck J](#), [Pillay C](#), [Rudich H](#), [Rodrigues R](#), [Holguin A](#), [Ariyoshi K](#), [Bouzas MB](#), [Cahn P](#), [Sugiura W](#), [Soriano V](#), [Brigido LF](#), [Grossman Z](#), [Morris L](#), [Vandamme AM](#), [Tanuri A](#), [Phanuphak P](#), [Weber JN](#), [Pillay D](#), [Harrigan PR](#), [Camacho R](#), [Schapiro JM](#), [Shafer RW](#) 2005. Impact of HIV-1 subtype and anti-retroviral therapy on protease and reverse transcriptase genotype: results of a global collaboration. *PLoS Med.* Apr;2(4):e112. Epub 2005 Apr 26 www.plosmedicine.org

[Kaplan AH](#), [Krogstad P](#), [Kempf DJ](#), [Norbeck DW](#), [Swanstrom R](#) 1994. Human immunodeficiency virus type 1 virions composed of unprocessed Gag and Gag-Pol precursors are capable of reverse transcribing viral genomic RNA. *Antimicrob Agents Chemother* (12): 2929 -2933.

Katzenstein TL 2003. Molecular biological assessment methods and understanding the course of the HIV infection. *APMIS Suppl*(114): 1-37

[Korber BT](#), [Allen EE](#), [Farmer AD](#), [Myers GL](#) 1995. Heterogeneity of HIV-1 and HIV-2
AIDS9SupplA:5-18.

Korber B, Muldoon M, Theiler J, Gao F, Gupta R, Lapedes A, Hahn BH, Wolinsky S, Bhattacharya T 2000. Timing the ancestor of the HIV-1 pandemic strains. *Science* 288:1789-1796.

Lallemant M, [Jourdain G](#), [Le Coeur S](#), [Kim S](#), [Koetsawang S](#), [Comeau AM](#), [Phoolcharoen W](#), [Essex M](#), [McIntosh K](#), [Vithayasai V](#) 2000. A trial of shortened zidovudine regimens to prevent mother-to-child transmission of human immunodeficiency virus type 1. Perinatal HIV-1 Prevention Trial (Thailand) Investigators. *N Engl J Med* 343(14):982-991.

Lan NT, Recordon-Pinson P, Hung PV, [Uyen NT](#), [Lien TT](#), [Tien HT](#), [Garrigue I](#), [Schrive MH](#), [Pellegrin I](#), [Lafon ME](#), [Aboulker JP](#), [Barre-Sinoussi F](#), [Fleury HJ](#) 2003. HIV type 1 isolates from 200 untreated individuals in Ho Chi Minh City (Vietnam): ANRS 1257 Study. Large Predominance of CRF01_AE and presence of major resistance mutations to anti-retroviral drugs. *AIDS Res Hum Retr.* 19:925-928.

[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.

Liu R, Paxton A, Choe S, Ceradini D, Martin SR, Horuk R, MacDonald ME, Stuhlmann H, Koup RA, Landau NR 1996. Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell* 86:367-377.

Magiorkinis E, Paraskevis D, Magiorkinis G, Chryssou S, [Chini M](#), [Lazanas M](#), [Paparizos V](#), [Saroglou G](#), [Antoniadou A](#), [Giamarellou E](#), [Karafoulidou A](#), [Hatzakis A](#) 2002. Mutations associated with genotypic resistance to anti-retroviral therapy in treatment naive HIV-1 infected patients in Greece. *Virus Res.* 85(1):109-115.

Mammano F, Petit C, Clavel F 1998. Resistance-associated loss of viral fitness in human immunodeficiency virus type 1: phenotypic analysis of protease and gag coevolution in protease inhibitor-treated patients. *J Virol* 72(9):7632-7637.

[Marins JR](#), [Jamal LF](#), [Chen SY](#), [Barros MB](#), [Hudes ES](#), [Barbosa AA](#), [Chequer P](#), [Teixeira PR](#), [Hearst N](#) 2003. Dramatic improvement in survival among adult Brazilian AIDS patients. *AIDS* 17:1675-1682

Marmor M, Friedman-Kien AE, Laubenstein L, Byrun RD, William DC, D'Onofrio S, Dubin N 1982. Risk factors for Kaposi's sarcoma in homosexual men. *Lancet* 1(8281):1083-1087.

Martinez-Picado J, Savara AV, Sutton L, D'Áquila RT 1999. Replicative fitness of protease inhibitor-resistant mutants of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 73(5):3744-3752.

Masquelier B, Chaix ML, Burgard M, Lechenadee J., Doussin A, Simon F, Cottalorda J, Izopet J, Tamalet C, Douard D, Fleury H, Mayaux MJ, Blanche S, Rouzioux C & French Pediatric HIV Infection Study Group. Zidovudine genotypic resistance in HIV-1 infected newborns in the French perinatal cohort 2001. *JAIDS* 27: 99-104.

[Mellors JW](#), [Rinaldo CR Jr](#), [Gupta P](#), [White RM](#), [Todd JA](#), [Kingsley LA](#) 1996. Prognosis in HIV-1 infection predicted by the quantity of virus in plasma. *Science* 272(5265):1167-1170.

[Miller V](#) 2001. Structured treatment interruptions in anti-retroviral management of HIV-1. *Curr Opin Infect Dis* (1):29-37.

Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Coordenação Nacional de DST e AIDS. Boletim Epidemiológico AIDS. Ano XIII N° 01-Semana Epidemiológica 48/99 a 22/00-Dezembro de 1999 a Junho de 2000. Brasília, 2000.

Ministério da Saúde. Recomendações para Profilaxia da Transmissão Vertical do HIV e Terapia Anti-retroviral em Gestantes 2004, Brasília.

Minkoff H, Burns DN, Landesman S, Youchah J, Goedert JJ, Nugent RP, Muenz LR, Willoughby AD 1995. The relationship of the duration of ruptured membranes to vertical transmission of human immunodeficiency virus. *Am J Obstet Gynecol* 173:585-589.

Morgado MG, Sabino E, Sphaer E, Bongertz V, Brígido L, Guimarães MD, Castilho EA, Galvão-Castro B, Mullins J, Hendry RM, Mayer A. 1994 Polymorphism in the V3 region of the envelope protein of HIV-1 in Brazil: Divergence from prevalent North American/European subtype B strains and identification of newly described F subtype. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*.10: 569-576.

Morgado MG, Guimarães ML, Neves Jr I, Veloso VG, Linhares-Carvalho MI, Bastos FI, Castilho EA, Galvão-Castro B, Bongertz, V & HEC AIDS Clin Res Group 1998. Molecular epidemiology of HIV in Brazil: polymorphism of the antigenically distinct B subtype B” isolates. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 93: 383-386.

Morgado MG, Guimarães ML, Gripp CBWG, Costa CI, Neves Jr I, Veloso VG, Carvalho MI, Castello-Branco LR, Bastos FI, Kuiken C, Castilho EA, Galvão-Castro B, Bongertz V & HEC AIDS Clin Res Group 1998. Molecular epidemiology of HIV in Brazil: High prevalence of B subtype and identification of an HIV-1 subtype D infection in Rio de Janeiro City. *J. of AIDS & Human Retrov*, 18: 488-494.

Morgado MG, Guimarães ML, Galvão-Castro B 2002. HIV-1 Polymorphism: a challenge for vaccine development – a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97(2):143-50.

Nijhuis M, Schuurman R, de Jong D, Erickson J, Gustchina E, Albert J, Schipper P, Gulnik S, Boucher CA 1999. Increased fitness of drug resistant HIV-1 protease as a result of acquisition of compensatory mutations during suboptimal therapy. *AIDS* 13(17):2349-59.

Nogueira SA, Abreu T, Oliveira R, Araújo L, Costa T, Andrade M, [Garcia Psic MF](#), [Machado](#), [Rodrigues K](#), [Mercadante R](#), [Fernandes](#)

[I](#), [Sapia MC](#), [Lambert JS](#) 2001. Successful prevention of HIV transmission from mother to infant in Brazil using a multidisciplinary team approach. *Braz J Infect Dis* 5(2):78-86.

[O'Donovan D](#), [Ariyoshi K](#), [Milligan P](#), [Ota M](#), [Yamuah L](#), [Sarge-Njie R](#), [Whittle H](#) 2000. Maternal plasma viral RNA levels determine marked differences in mother-to-child transmission rates of HIV-1 and HIV-2 in The Gambia. MRC/Gambia Government/University College London Medical School working group on mother-child transmission of HIV. *AIDS* 14(4):441-8.

Orloff SL, Simonds RJ, Steketee RW, Louis ME 1996. Determinants of perinatal HIV-1 transmission. *Clin Obstet Gynecol* 39:386-395.

Osmanov S, Pattou C, Walker N, Schwardlander B, Esparza J, WHO-UNAIDS Network for HIV Isolation and Characterization 2002. Estimated global distribution and regional spread of HIV-1 genetic subtypes in 2000. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 29:184-90.

Pantaleo G, Fauci AS 1996. Immunopathogenesis of HIV infection. *Annu Rev Microbiol* 50:825-854.

[Peeters M](#), [Sharp PM](#).2000 Genetic diversity of HIV-1: the moving target *AIDS* 14 Suppl 3 129-140

Pieniazek D, Rayfield M, Hu DJ, Nkengasong J, Wiktor SZ, Downing R, Biryahwaho B, Mastro T, Tanuri A, Soriano V, Lal, R, Dondero T, The HIV Variant Working Group 2000. Protease sequences from HIV-1 group M subtypes A-H reveal distinct amino acid mutation patterns associated with

protease resistance in protease inhibitor-naive individuals worldwide. *AIDS* 14(11):1489-1495.

Pires IL, Soares MA, Esperanza FA, Ishii Sk, Vieira MCG, Gouvêa MIFS 2004. Prevalence of HIV-1 drug resistance mutations and subtypes in drug-naive infected individuals in the Army Health Service of Rio de Janeiro, Brazil. *J Clin Microbiol* 42(1):426-430.

[Poignard P](#), [Klasse PJ](#), [Sattentau QJ](#). 1996 Antibody neutralization of HIV-1. *Immunol Today*. 17(5):239-46.

Poignard P, Shapire EO, Parren PWHI, Burton DR 2001. Gp120: Biologic aspects of structural features. *Ann Rev Immunol* 19:253-274.

Popovic M, Sargadharan 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(4648):497-500.

Potts KE, Kalish ML, Lott T, Orloff G, Luo CC, Bernard MA, Alves CB, Badaró R, Suleiman J, Ferreira O, Schochetman G, Johnson Jr WD, Ou C-Y, Ho JL, Brazilian Collaborative AIDS Research Group 1993. Genetic heterogeneity of the V3 region of the HIV-1 envelope glycoprotein in Brazil. *AIDS* 7:1191-1197.

[Puglisi JD](#), [Tan R](#), [Calnan BJ](#), [Frankel AD](#), [Williamson JR](#) 1992. Conformation of the TAR RNA-arginine complex by NMR spectroscopy. *Science* 257(5066):76-80.

Quinones-Mateu ME and EJ Arts. 2002. Fitness of drug resistant HIV-1: methodology and clinical implications. *Drug Resist.Updat.* 5:224-233.

Rambaut A, Posada D, Crandall KA, Holmes EC 2004. The causes and consequences of HIV evolution. *Nature* 5:52-61.

[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](#), [Chung M](#), [Gilbert P](#), [Mwakagile D](#), [Msamanga G](#),
[Fawzi W](#), [Essex M](#) 2003. In-utero transmission of quasispecies among
human immunodeficiency virus type 1 genotypes. *Virology* 307(2):278-82.

Robertson DL, Sharp PM, McCutchan FE, Hahn B 1995. Recombination in HIV-
1. *Nature* 374:124-126.

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, Wolinski S,
Korer B 2000. HIV-1 nomenclature proposal. *Science* 288(5463):55-56.

Sabino EC, Shaper EG, Morgado MG, Korber BTM, Diaz RS, Bongertz V,
Cavalcante S, Galvão-Castro B, Mullins JI, Mayer A 1994. Identification of
human immunodeficiency virus type 1 envelope genes recombinant between
subtypes B and F in two epidemiologically linked individuals from Brazil. *J*
Virol 10:6340-6346.

Saitou N, Nei M 1987. The neighbor-joining method: a new method for
reconstructing phylogenetic trees. *Mol BiolEvol* 4(4):406-425.

[Santos V](#), [Cunha CSC](#), [Vasconcelos ALR](#), [Sudo E](#), [Chequer PJN](#). The challenge to reduce HIV
vertical transmission in Brazil. Abstract Book. *12th World AIDS Conference* - Geneve - June 28-July
3, 1998. Abstract 23295, p.400.

[Santos VV](#), [Bastos FI](#), [Nielsen K](#), [Morgado M](#), [Pilotto JH](#), [Joao E](#), [Grinzstejn B](#), [Busch B](#), [Derrico M](#),
[Mello D](#), [Calvet G](#) & [Bryson Y](#). *A prospective study of the feasibility of rapid HIV testing in pregnant*
women during the peripartum period in Rio de Janeiro, Brazil. 2001 8th Conference on Retrovirus
and Opportunistic Infections. Chicago, EUA.

[Shaffer N, Chuachoowong R, Mock PA, Bhadrakom C, Siriwasin W, Young NL, Chotpitayasunondh T, Chearskul S, Roongpisuthipong A, Chinayon P, Karon J, Mastro TD, Simonds RJ](#) 1999. Short-course zidovudine for perinatal HIV-1 transmission in Bangkok, Thailand: a randomised controlled trial. *Bangkok Collaborative Perinatal HIV Transmission Study Group Lancet* 353:773-780.

[Shafer RW](#) 2002. Genotypic testing for human immunodeficiency virus type 1 drug resistance. *Clin Microbiol Rev.* (2):247-77.

Shaffer RW 2003. Genotyping Testing for HIV-1 Drug Resistance. Stanford HIV RT and Protease Sequence Database.

Simons F, Maucière P, Roques P, Loussert-Ajaka I, Muller-Trutwin MC, Saragosti S, Georges-Courbot MC, Barré-Sinoussi F, Brun-Vezinet F 1998. Identification of a new human immunodeficiency virus type 1 distinct from group M and group O. *Nature Medicine* 4:1032-1037.

Soares MA, Oliveira T, Brindeiro RM, Diaz RS, Sabino EC, Brigido L, Pires IL, Morgado MG, Dantas MC and The Brazilian Network for Drug Resistance Surveillance 2003. A specific subtype C of human immunodeficiency virus type 1 circulates in Brazil. *AIDS* 17:11-21.

[Soares MA, Brindeiro RM, Tanuri A](#). 2004. Primary HIV-1 drug resistance in Brazil. *AIDS*. 18 Suppl 3:9-13.

[Spira S, Wainberg MA, Loemba H, Turner D](#), Brenner BG 2003.

Impact of clade diversity on HIV-1 virulence, anti-retroviral drug sensitivity and drug resistance. *J Antimicrob Chemother* (2):229-40.

[Stefani MM, 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* (2):205-207.

[Strack B, Calistri A, Craig S, Popova E, Göttlinger, H.G](#) 2003. AIP1/ALIX is a binding partner for HIV-1 p6 and EIAV p9 functioning in virus budding. *Cell* 114: 689-699.

- Szwarcwald CL; Bastos FI; Esteves MAP, Andrade CLT 2000. A disseminação da epidemia da AIDS no Brasil, no período de 1987-1996: uma análise espacial. *Cad. Saúde Pública* 16(Sup.1):7-19.
- Tanuri A, Swanson P, Devare S, Berro OJ, Savedra A, Costa LJ, Telles JG, Brindeiro R, Schable C, Pieniazek D, Rayfield M 1999. HIV-1 subtypes among blood donors from Rio de Janeiro, Brazil. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 20: 60-66.
- Tanuri A, Vicente AC, Otsuki K, Ramos CA, Ferreira OC Jr, Schechter M, Janini LM, Pieniazek D, Rayfield MA 1999. Genetic variation and susceptibilities to protease inhibitors among subtype B and F isolates in Brazil. *Antimicro Agents Chemother* 43(2):253-8.
- Tápia N, Franco S, Puig-Basagoiti F, Menéndez C, Alonso PL, Mshinda H, Clotet B, Saiz JC, Martinez MA 2003. Influence of human immunodeficiency virus type 1 subtype on mother-to-child transmission. *J Gen Virol.* 84:607-613.
- Takebe Y, Kusagawa S, Motomura K 2004. Molecular epidemiology of HIV: tracking AIDS pandemic. *Pediatr Int* 46(2):236-244
- Tess BH, Rodrigues LC, Newell ML, Dunn DT, Lago TDG and the Sao Paulo Collaborative Study for Vertical Transmission of HIV-1 1998. Breastfeeding, genetic, obstetric and other risk factors associated with mother-to-child transmission of HIV-1 in Sao Paulo State, Brazil. *AIDS* 12:513-520.
- The European Collaborative Study 1999. Maternal viral load and vertical transmission of HIV-1: an important factor but not the only one. *AIDS* 13:1377-85.
- Thea DM, Steketee RW, Pliner V, Bornschlegel K, Brown T, Orloff S Matheson PB, Abrams EJ, Bamji M, Lambert G, Schoenbaum EA, Thomas PA, Heagarty M, Kalish ML 1997. The effect of maternal viral load on the risk of perinatal transmission of HIV-1. New York City Perinatal HIV Transmission Collaborative Study Group. *AIDS* 11(4):437-444.
- Thomsom MM, Perez-Alvarez L, Najera R 2002. Molecular epidemiology of HIV-1 genetic forms and its significance for vaccine development and therapy. *Lancet Infect Dis* 2(8):461-471.
- Thomsom MM, Casado G, Posada D, Sierra M, Najera R 2005. Identification of a novel HIV-1 complex circulating recombinant form (CRF_18cpx) of Central African origin in Cuba. *AIDS* 19(11):1155-1163.
- Toni TD, Recordon-Pinson P, Minga A, Ekouevi D, Bonard D, Bequet L, Huet C, Chenal H, Rouet F, Dabis F, Lafon ME, Salamon R, Masquelier B, Fleury HJ 2003. Presence of key drug resistance mutations in isolates from untreated patients of Abidjan, Côte d'Ivoire: ANRS 1257 Study. *AIDS Res Hum Retr* (8) 713:717.

Triques K, Bourgeois A, Saragosti S, Vidal N, Mpoudi-Ngole E, Nzilambi N, Apetrei C, Ekwilanga M, Delaporte E, Peeters M 1999. High diversity of HIV-1 subtype F strains in Central África. *Virology* 259(1): 99-109.

Triques K, Bourgeois A, Vidal N, Mpoudi-Ngole E, Mulanga-Kabeya C, Nzilambi N, Torimiro N, Saman E, Delaporte E, Peeters M 2000. Near-full-length genome sequencing of divergent African HIV type 1 subtype F viruses leads to the identification of a new HIV type 1 subtype designated K. *AIDS Res Hum Retrov* 16(2):139-151.

van Harmelen J, Wood R, Lambrick M, Rybicki EP, Williamson AL, Williamson C. 1997 An association between HIV-1 subtypes and mode of transmission in Cape Town, South Africa. *AIDS* 11(1):81-87

Velarde-Dunois KG, Guimaraes ML, La Fuente C, Andrade R, Arevalo R, Pantoja S, Mariscal R, Sandoval R, Iriarte F, Chamon V, Melgar ML, Carvajal R, Morgado MG 2000. Molecular characterization of human immunodeficiency virus type 1-infected individuals from Bolivia reveals the presence of two distinct genetic subtypes B and F. *AIDS Res Hum Retroviruses*16(17):1921-1926.

Veloso VG, Morgado MG, Nielsen K, Bastos FI, João EC, Kreitchmann R. HIV rapid testing during the peripartum period followed by perinatal interventions in Brazil. In: *XIVth International AIDS Conference*. Barcelona, Spain, 7-12 July, 2002 [Abstract ThPeB 7248].

Vergne L, Peeters M, Mpouli-Ngole E, Bourgeois A, Liegeois F, Toure-Kane C, Mboup S, Mulanga-Kabeya C, Saman E, Jourdan J, Reynes J, Delaporte E 2000. Genetic diversity of protease and reverse transcriptase sequences in non-subtype-B human immunodeficiency virus tpe 1 strains: evidence of many minor drug resistance mutations in treatment naive patients. *J. Clin Microb* 38(11):3919-3925.

Vergne L, Malonga-Mouellet G, Mistoul I, Mavoungou R, Mansaray H, Peeters M, Delaporte E. 2002. Resistance to antiretroviral treatment in Gabon: need for implementation of guidelines on antiretroviral therapy use and HIV-1 drug resistance monitoring in developing countries. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 29(2):165-168.

Vicente AC, Otsuki K, Silva NB, Castilho MC, Barros FS, Pieniazek D, Hu D, Rayfield MA, Bretas G, Tanuri A 2000. The HIV epidemic in the Amazon Basin is driven by prototypic and recombinant HIV-1 subtypes B and F. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 23(4):327-31

Wegner SA, Brodine Sk, Mascola JR, Tasker SA, Shaffer RA, Starkey MJ, Barile A, Martin GJ, Aronson N, Emmons WW, Stephan K, Bloor S, Vingerhoets J, Hertogs K, Larder B 2000. Prevalence of genotypic and phenotypic resistance to anti-retroviral drugs in a cohort of therapy-naïve HIV-1 infected US military personnel. *AIDS*14(8):1009-1015.

Wei X, Ghosh SK, Taylor ME, Johnson VA, Emini EA, Deutsch P, Lifson JD, Bonhoeffer S, Nowak MA, Hahn BA, Saag MS, Shaw GM 1995. Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Nature* 373:117-122.

Weidle PJ, Downing R, Sozi C, Mwebaze R, Rukundo G, Malamba S, Respass R, Hertogs K, Larder B, Ochola D, Mermin J, Samb B, Lackritz E. 2003 Development of phenotypic and genotypic resistance to antiretroviral therapy in the UNAIDS HIV Drug Access Initiative--Uganda. *AIDS*. 17 Suppl 3:39-48.

Welker R, Hohenberg H, Tessmer U, Huckhagel C, Krausslich HG 2000. Biochemical and structural analysis of isolated mature cores of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol*. 74(3):1168-77.

WHO Network for HIV Isolation and Characterization 1994. HIV type 1 variation in the World Health Organization-sponsored vaccine evaluation sites: genetic screening, sequence analysis, and preliminary biological characterization of selected viral strains. *AIDS Res Hum Retroviruses* 10:1327-1343.

Wolinsky SM, Wike CM, Korber BT, Hutto C, Parks WP, Rosenblum LL, Kunstman KJ, Furtado MR, Munoz JL 1992. Selective transmission of human immunodeficiency virus type-1 variants from mothers to infants. *Science* 255: 1134-1137.

Yamaguchi J, Bodelle P, Kaptue L, Zekeng L, Gurtler LG, Devare SG, Brennan CA 2003. Near full-length genomes of 15 HIV type 1 group O isolates. *AIDS Res Hum Retroviruses*. (11):979-88.

Yang C, Li M, Newman RD, Shi YP, Ayisi J, van Eijk AM, Otieno J, Misore AO, Steketee RW, Nahlen BL, Lal RB 2003. Genetic diversity of HIV-1 in western Kenya: subtype-specific differences in mother-to-child transmission. *AIDS* (11):1667-74.

Yoshino N, Naganawa S, Nakasone T, Imura S, Kita, Honda M 1998. Vertical transmission of human immunodeficiency virus type 1 in Japan, 1989-1997: presence of two subtypes B and E with subtype E predominance. National Cooperative Study Investigators on Vertical Transmission of HIV-1. *Acta Paediatr Jpn* 40(5):503-509.

Zazzi M, Romano L, Peruzzi F, Toneatto S, De Milito A, Botta G, Valensin PE 1993. Optimal conditions for detection of human immunodeficiency virus type 1 DNA by polymerase chain reaction with nested primers. *Mol Cell Probes*. 1993 Dec;7(6):431-7.

Zhang L, Busch MP, Mosley JW, Mayer A 1997. Divergence of HIV-1 quasispecies in an epidemiologic cluster. *AIDS* 11(4):415-22.

Zhu T, Korber BT, Nahmias AJ, Hooper E, Sharp M, Ho DD 1998. An African HIV-1 sequence from 1959 and implications for the origin of the epidemic. *Nature* 391:594-597.

Zorrilla CD 2000. Anti-retroviral combination therapy in HIV-1 infected women and men: are their responses different? *Int J Fertil Womens Med*. 45(2):195-199.