



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA EVANDRO CHAGAS



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA EVANDRO CHAGAS  
DOUTORADO EM PESQUISA CLÍNICA

JOSÉ HENRIQUE PILOTTO

**PERFIL DE RESISTÊNCIA GENOTÍPICA DO HIV-1  
AOS ANTI-RETROVIRAIS EM UMA POPULAÇÃO DE  
MULHERES INFECTADAS PELO HIV-1 EXPOSTAS A  
QUIMIOPROFILAXIA COM ANTI-RETROVIRAIS  
PARA PREVENÇÃO DA TRANSMISSÃO VERTICAL  
DO HIV-1 DURANTE A GESTAÇÃO**

Rio de Janeiro

2008

Ficha catalográfica elaborada pela  
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

P643

Pilotto, José Henrique

Perfil de resistência genotípica do HIV-1 aos anti-retrovirais em uma população de mulheres infectadas pelo HIV-1 expostas a quimioprofilaxia com anti-retrovirais para a prevenção da transmissão vertical do HIV -1 durante a gestação / José Henrique Pilotto. – Rio de Janeiro, 2008.  
xxii, 197 f. : il. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas, 2008.  
Bibliografia: f. 156-185

1. HIV. 2. Gestantes. 3. Quimioprofilaxia. 4. Antirretrovirais. 5. Resistência genotípica. I. Título.

CDD 616.9792

JOSÉ HENRIQUE PILOTTO

**PERFIL DE RESISTÊNCIA GENOTÍPICA DO HIV-1 AOS ANTI-RETROVIRAIS EM  
UMA POPULAÇÃO DE MULHERES INFECTADAS PELO HIV-1 EXPOSTAS A  
QUIMIOPROFILAXIA COM ANTI-RETROVIRAIS PARA PREVENÇÃO DA  
TRANSMISSÃO VERTICAL DO HIV-1 DURANTE A GESTAÇÃO**

Dissertação apresentada ao Curso de Doutorado  
do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas  
para obtenção do grau de Doutor em Pesquisa  
Clínica em Doenças Infecciosas.

Orientadora: Dra. Mariza Gonçalves Morgado  
Dra. Beatriz Grinsztejn

Aprovado em 30 de Setembro de 2008.

BANCA EXAMINADORA

---

Dra. Ruth Khalili Friedman  
IPEC/FIOCRUZ

---

Dra. Norma de Paula Motta Rubini  
UNIRIO

---

Dra. Heloisa Helena de Souza Marques  
USP

---

Dr. Rodrigo de Moraes Brindeiro  
UFRJ

---

Dr. Carlos Brites  
UFBA

Rio de Janeiro, 2008

**PERFIL DE RESISTÊNCIA GENOTÍPICA DO HIV-1  
AOS ANTI-RETROVIRAIS EM UMA POPULAÇÃO DE  
MULHERES INFECTADAS PELO HIV-1 EXPOSTAS A  
QUIMIOPROFILAXIA COM ANTI-RETROVIRAIS  
PARA PREVENÇÃO DA TRANSMISSÃO VERTICAL  
DO HIV-1 DURANTE A GESTAÇÃO**

JOSÉ HENRIQUE PILOTTO

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas para obtenção do grau de Doutor em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas.

Orientadoras: Dra. Mariza Gonçalves Morgado  
Dra. Beatriz Grinsztejn

Rio de Janeiro

2008

Trabalho realizado no Hospital Geral de Nova Iguaçu, Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas – IPEC/FIOCRUZ e no Laboratório de AIDS & Imunologia Molecular do Departamento de Imunologia do Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, sob orientação da Dra. Mariza Gonçalves Morgado e Dra. Beatriz Grinsztejn.

Esta tese de doutorado é dedicada ao meu Pai, verdadeiro Doutor e modelo em quem tento me espelhar. Pai, obrigado por orientar o meu caminho. Meu coração e pensamentos estão sempre contigo.

## **AGRADECIMENTOS**

Às Doutoradas Mariza Morgado e Beatriz Grinsztejn, pela amizade, carinho, orientação competente, críticas e sugestões durante o processo de construção desta tese de doutorado. Obrigado por terem mergulhado comigo nas análises, resultados e tabelas.

À Dra. Valdiléa Veloso, pela amizade e estímulo para continuar sempre. Obrigado pelas sugestões valiosas e revisão na análise dos resultados.

À Ruth, Luciane, Cynthia, Ronaldo e Gelson, por toda a atenção e carinho dispensados, pelas críticas que propiciaram um maior aprofundamento nas questões polêmicas da pesquisa. Obrigado pela ajuda nas análises, resultados e tabelas.

Ao Carlos Augusto, Ingebourg, Daniel, José Cleber, Jociane, Loredana e Sabrina, por terem executado toda a parte de sorologias desta tese.

Ao Jorge Eurico, pela amizade, ajuda no acompanhamento da coorte de gestantes, pelas constantes revisões do banco de dados, formatação do texto e pelo tempo em que estive ausente das minhas obrigações.

À Marília, pela amizade, força e por ter dado sugestões valiosas durante a execução dessa pesquisa.

À Elizângela, Aline Ramalho, Sandra Muri e Maria Isabel, pela forma carinhosa e competente no acompanhamento das gestantes.

Ao Serafim, Tatiane e Cinthia, pela ajuda na aplicação dos questionários.

A toda a equipe do HGNI, especialmente Adriana Flores, Braulio, Kelly, Maicon e Adriana pelo aconchego e carinho no tratamento das nossas gestantes.

A toda a equipe do IPEC, pelo carinho e paciência durante a execução desse projeto.

A toda a equipe do Laboratório de AIDS e Imunologia Molecular, principalmente à Adriana Pedro, Geanne e Vanessa, pela valiosa ajuda durante todos esses anos no recebimento, processamento e armazenamento das amostras, assim como execução dos exames de CD4, RNA do HIV-1 e genotipagem.

A todos os amigos, pela torcida pela conclusão dessa tese e pela minha ausência.

Ao Rudy e Felipe, companheiros da minha vida, que estão sempre ao meu lado me incentivando e fazendo acreditar que precisamos sonhar e crescer. Desculpe pela minha ausência, principalmente nos finais de semana e feriados.

À minha mãe e irmãos, pela paz e sabedoria transmitidas durante todos esses anos; somos uma Grande Família.

A todas as mulheres que foram objeto dessa pesquisa.

“O homem é diferente da mulher, e ainda bem porque as diferenças enriquecem as relações desde que ambos se sintam capazes. Um tem o direito de gerar, o outro de fecundar. E autorizados a exercer este mistério, a lógica sem a sensibilidade tende a ser cruel. E a emoção sem o poder de raciocínio tende a ser piegas”.

Aratangy.

Pilotto, J H. **Perfil de resistência genotípica do hiv-1 aos anti-retrovirais em uma população de mulheres infectadas pelo hiv-1 expostas a quimioprofilaxia com anti-retrovirais para prevenção da transmissão vertical do hiv-1 durante a gestação.** Rio de Janeiro, 2008. 197 f. Tese [Doutorado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas] – Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas.

## RESUMO

**Introdução:** As diretrizes do Ministério da Saúde recomendam que as gestantes que iniciam esquemas anti-retrovirais de alta potência (HAART) para prevenção da transmissão vertical do HIV-1, e que não necessitam destes para a sua saúde, interrompam o uso dos medicamentos após o parto. Entretanto, pouco se sabe sobre a emergência de mutações de resistência com esta estratégia.

**Objetivos:** avaliar a prevalência de mutações de resistência primária em gestantes virgens de terapia anti-retroviral na visita de inclusão em uma coorte de gestantes virgens de terapia anti-retroviral; avaliar o desenvolvimento de novas mutações após a interrupção do esquema HAART após o parto; avaliar os subtipos do HIV-1; avaliar infecção recente pelo HIV-1 usando o Calypte BED Incidence EIA; avaliar a taxa de transmissão vertical do HIV-1 nessa população de gestantes.

**Métodos:** Desde março de 2005, foi iniciada uma coorte de gestantes portadoras de infecção pelo HIV-1 no Hospital Geral de Nova Iguaçu. Terapia anti-retroviral de alta potência (HAART) foi usada para prevenção da transmissão vertical de acordo com as diretrizes Brasileiras. As seguintes avaliações imunológicas e virológicas (CD4, RNA do HIV-1 e genotipagem) foram realizadas na visita de inclusão na coorte, 6 a 8 semanas após o início dos anti-retrovirais, parto e pós-parto [15 dias, 1 mês e 6 meses].

**Resultados:** 250 gestantes foram incluídas e seguidas no HGNI. A idade média foi de 25,3 anos; 69,8% das gestantes não brancas, mediana da idade gestacional no início do pré-natal foi de 24 semanas. A mediana de CD4 na visita de inclusão na coorte foi 518 células/mm<sup>3</sup> e do RNA do HIV-1 7.800 cópias/mL. Esquemas anti-retrovirais contendo ITRNN e IP foram prescritos em 22,3% e 77,7% das gestantes, respectivamente. A mediana de tempo de uso dos anti-retrovirais foi de 84 dias; 76% das gestantes tinham RNA do HIV-1 < 400 cópias/ml no parto. A prevalência de resistência primária foi 11,3%; 13,8% das gestantes desenvolveram mutações de resistência após a introdução e interrupção dos anti-retrovirais no parto. Infecção recente pelo HIV-1 foi detectada em 13,9% das gestantes no momento de inclusão na coorte. Na análise multivariada a presença de resistência primária mostrou ser um fator independentemente associado à incidência de mutações no parto e após a interrupção dos anti-retrovirais. Mulheres com RNA do HIV-1 detectável no momento do parto apresentaram um risco de detecção de mutação no parto/pós-parto 3,5 vezes aquele observado entre as mulheres com RNA do HIV-1 indetectável neste mesmo momento. O tempo de uso de HAART mostrou-se independentemente associado à incidência de resistência após a introdução da quimioprofilaxia para a prevenção da transmissão vertical nessa coorte, sendo que quanto maior o tempo de uso desse esquema maior a chance de detecção de mutações.

**Conclusão:** Alta prevalência de mutações de resistência primária no momento da inclusão na coorte; 13,8% das gestantes desenvolveram mutações de resistência após a introdução e interrupção dos anti-retrovirais no parto. Infecção recente pelo HIV-1 foi detectada em 13,9% das gestantes no momento de inclusão na coorte. O subtipo B to HIV-1 foi o mais prevalente. Não houve transmissão vertical do HIV-1 nessa população estudada.

**Palavras-chave:** 1. HIV. 2. Gestantes. 3. Quimioprofilaxia. 4. Anti-retrovirais. 5. Resistência genotípica.

Pilotto, J H. **HIV-1 Genotypic resistance profile to antiretroviral drugs in women infected by HIV and exposed to antiretroviral prophylaxis for the prevention of HIV vertical transmission during pregnancy.** Rio de Janeiro, 2008. 197 f. PhD Thesis [PhD thesis in clinical research in Infectious Diseases] – Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas.

## ABSTRACT

**Background:** Brazilian guidelines stipulate that HIV+ pregnant women initiating HAART for PMTCT, who do not otherwise need ARV for their own health, discontinue antiretrovirals after delivery. However, it is unknown how frequent drug resistance is with this strategy.

**Objectives:** to evaluate HIV-1 primary resistance at baseline visit, the impact of antiretroviral discontinuation, following delivery for the emergence of genotypic resistance, HIV-1 subtype, HIV-1 recent infection using the Calypte BED Incidence EIA, and the rates of HIV-1 vertical transmission in this population of HIV-1 pregnant women.

**Methods:** Since January 2005, an HIV+ pregnant women cohort has been established at Hospital Geral de Nova Iguaçu. HAART for PMTCT was used according to the Brazilian Guidelines. Clinical/lab evaluations (CD4, HIV-RNA and genotyping were performed at baseline, 6-8 weeks after HAART, delivery and postpartum [15 days, 1 month and 6 months]).

**Results:** 250 women/babies have been enrolled and followed. Median age is 25.3 years; 69.8% women are non-white, median gestational age at prenatal care initiation is 24 weeks. Median CD4 cell count at baseline is 518 cells/mm<sup>3</sup> and HIV-1 VL 7.800 copies/mL. A NNRTI and PI based regimen was prescribed for 22.3% and 77.7% of the women, respectively. The median time on ART was 84 days; 76% had HIV-1 RNA <400 copies/ml at delivery. The prevalence of HIV primary drug resistant was 11.3% at baseline visit and 13.8% of the women developed new mutations after ART interruption at delivery. HIV-1 recent infection was detected in 13.9% pregnant women at baseline visit. In the multivariate analysis, HIV-1 primary resistance was independently associated with the development of new resistance mutations at delivery/post-partum. Pregnant women with detectable HIV-1 RNA at delivery had a RR of detection of mutations at delivery/post-partum 3.5 times the one for women with undetectable HIV-1 RNA at delivery. The exposure to HAART was independently associated with the incidence of resistance after ART initiation for PMTCT.

**Conclusion:** High prevalence of HIV-1 primary resistance at baseline visit; 13.8% of the women developed new mutations after ART interruption after delivery. HIV-1 recent infection was detected in 13.9% pregnant women at baseline visit. HIV subtype B was the most prevalent. There was no HIV-1 vertical transmission.

**Keywords:** 1. HIV. 2. Pregnancy. 3. Chemoprophylaxis. 4. Antiretroviral. 5. Genotypic resistance.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	- Modelo estrutural da enzima Transcriptase Reversa do HIV-1 com mutações para os ITRNs	14
Figura 2	- Modelo estrutural da enzima Transcriptase Reversa do HIV-1 com mutações para os ITRNNs.	15
Figura 3	- Modelo estrutural da protease do HIV-1 com mutações de resistência aos Inibidores da Protease.	16
Quadro 1	- Recomendações para teste de resistência genotípica antes do início da terapia em pacientes virgens de tratamento anti-retroviral.	22
Figura 4	- Incidência e persistência de resistência a nevirapina em 157 mulheres e 21 crianças após uma única dose da droga durante o parto	23
Quadro 2	- Barreira genética e facilidade com que a mutação é selecionada	34
Figura 5	- Distribuição dos subtipos no mundo	40
Figura 6	- Distribuição dos subtipos no Brasil.	42
Quadro 3	- Prevalência de Mutações de Resistência a anti-retrovirais em mulheres que fizeram uso de HAART durante a gestação	55
Figura 7	- Fluxograma da Coorte incluída no estudo	70
Quadro 4	- Procedimentos do estudo - Mãe	71
Quadro 5	- Procedimentos do estudo - Bebê	76
Figura 8	- Esquema do princípio metodológico do teste HIV-1 Incidence BED-CEIA	77

Figura 9	- Categoria de exposição ao HIV das gestantes acompanhadas no HGNI. Rio de Janeiro, 2005-2008 (N = 139).	94
Figura 10	- Prevalência de ISTs diagnosticadas na visita de inclusão das gestantes acompanhadas no HGNI. Rio de Janeiro, 2005-2008 (N=133).	95
Quadro 6	- Prevalência de infecção por <i>toxoplasma goondi</i> , pelo vírus da rubéola e por citomegalovírus nas gestantes no momento da visita de inclusão na coorte (n = 135)	95
Figura 11	- Medianas e intervalo interquartilico (Boxplot) do Log10 da carga viral, segundo momento de coleta, das gestantes acompanhadas no HGNI. Rio de Janeiro, 2005-2008 (N = 139)	102
Figura 12	- Subtipos do HIV-1 e genomas recombinantes identificados nas gestantes acompanhadas no HGNI. Rio de Janeiro, 2005-2008 (N = 123).	105
Figura 13	- Representação gráfica da análise de seqüências nucleotídicas do gene pol de genomas puros e recombinantes BF do HIV-1	106
Figura 14	- Representação gráfica da análise de seqüências nucleotídicas do gene pol de genomas recombinantes do HIV-1 associados ao subtipo K.	107
Figura 15	- Análise filogenética do gene pol de amostras de HIV-1	108
Quadro 7	- Perfil de mutações de resistência primária nos genes da protease e da transcriptase reversa e a sensibilidade aos anti-retrovirais na população de gestantes infectadas pelo HIV-1 com resistência primária (n = 19)	111

Quadro 8	- Prevalência de mutações acessórias polimórficas e não polimórficas detectadas na região da protease do HIV-1 nas amostras da visita de inclusão das gestantes na Coorte do HGNI	114
Quadro 9	- Prevalência de mutações acessórias polimórficas detectadas na região da Transcriptase Reversa de acordo com o subtipo do HIV nas amostras da visita de inclusão das gestantes na Coorte do HGNI	116
Quadro 10	- Incidência de mutações detectadas após a introdução de HAART em cada visita, de acordo com a classe de ARV e com as mutações específicas	117
Quadro 11	- Gestantes com mutação principal de resistência primária que desenvolveram novas mutações após a introdução dos anti-retrovirais (n = 14)	118
Quadro 12	- Gestantes sem mutações principais de resistência primária na amostra de inclusão na coorte que desenvolveram mutações após a introdução de HAART. Fonte: Elaborado pelo Autor.	120
Quadro 13	- Prevalência do polimorfismo <b>G335CD</b> na visita de inclusão na coorte de acordo com subtipo do HIV, e desenvolvimento de mutações após a introdução da terapia anti-retroviral	121

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Codificação da variável-desfecho, variável de exposição e cováriaveis analisadas no modelo multivariado	90
Tabela 2	Características sócio-demográficas e comportamentais das gestantes com HIV/AIDS acompanhadas no HGNI. Rio de Janeiro, 2005-2008 (N = 139)	93
Tabela 3	Características relacionadas à infecção pelo HIV/AIDS das gestantes acompanhadas no HGNI. Rio de Janeiro, 2005-2008 (N = 139).	97
Tabela 4	Características relacionadas ao parto das gestantes com HIV/AIDS acompanhadas no HGNI. Rio de Janeiro, 2005-2008 (N = 139).	99
Tabela 5	Características relacionadas aos recém-natos das gestantes com HIV/AIDS acompanhadas no HGNI. Rio de Janeiro, 2005-2008 (N = 139).	100
Tabela 6	Médias e medianas da contagem de linfócitos CD4 das gestantes nas visitas de inclusão e de seguimento na coorte.	101
Tabela 7	Mediana, intervalo interquartilico e resultado do teste de Wilcoxon dos valores observados de Linfócito CD4 e Carga viral nas coletas pré-HAART e 6 meses após interrupção do HAART.	103

Tabela 8	Risco relativo não ajustado para detecção de qualquer mutação nas gestantes infectadas pelo HIV da coorte do HGNI, 2005-2008 (N = 111)	123
Tabela 9	Fatores preditores de detecção de mutação após a introdução de HAART apenas para PMTCT nas gestantes com HIV/AIDS acompanhadas no HGNI. Rio de Janeiro, 2005-2008 (N = 111)	126

## LISTA DE ABREVIATURAS

AIDS - Acquired Immunodeficiency Syndrome ou Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

ABC – abacavir

ATV - atazanavir

AZT – zidovudina

CCR5 – co-receptor.

CD4 – glicoproteína de superfície das células T

CRF – Circulating Recombinant Form ou Forma recombinante circulante

CXCR4 - co-receptor.

ddl – Didanosina

ddC – Zalcitabina

ddNTP – Didesoxirribonucleotídeos trifosfato

dNTP – Desoxirribonucleotídeos trifosfato

d4T - Estavudina

DNA - Desoxirribonucleic acid ou Ácido desoxirribonucléico

EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético

EFV - Efavirenz

Env – gene que codifica as glicoproteínas do envelope viral

ETR - etravirina

FPV – fosamprenavir

FTC - emtricitabina

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 Anti-retroviral Altamente Ativo

HIV - Human Immunodeficiency Vírus ou Vírus da Imunodeficiência Humana

HXB2 – isolado viral do HIV-1

IDV – indinavir

IN - Integrase

IST – Infecções Sexualmente Transmissíveis

ITRNN – Inibidor de Transcriptase Reversa Não Análogo aos Nucleosídeos

ITRN – inibidor de Transcriptase Reversa Análogo aos Nucleosídeos  
IP – Inibidor da protease  
LPV – lopinavir  
LTR - Long Terminal Repeats ou Longas repetições terminais  
M - molar  
 $\mu$ l - microlitro  
 $\mu$ g – micrograma  
M – ácido mirfístico  
MA - matriz  
ml – mililitros  
mM – milimolar  
ng – nanograma  
NFV – nelfinavir  
NSI – não indutores de sincício  
NVP – nevirapina  
pb- pares de bases  
PCR - Polymerase Chain Reaction ou Reação em Cadeia da Polimerase  
PMTCT – Prevenção da transmissão vertical  
Pol – gene que codifica as enzimas que participam na replicação viral  
PR – Protease  
RNA – Ribonucleic Acid ou Ácido Ribonucléico  
RNAm – RNA mensageiro  
Rpm – rotações por minuto  
RT- Transcriptase Reversa  
RTV – ritonavir  
SI – indutores de sincício  
SIV-Vírus da Imunodeficiência Símia  
SLT – Soroconversor de longo termo  
SQV – saquinavir  
SR – Soroconversor recente  
TDF - tenofovir  
TR -Transcriptase Reversa ou Reverse Transcriptase  
ZDV - zidovudina  
3TC - lamivudina

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b>	<b>5</b>
2.1	INFECÇÃO PELO HIV EM MULHERES	5
2.2	TRANSMISSÃO VERTICAL DO HIV	8
2.3	RESISTÊNCIA VIRAL	12
2.4	RESISTÊNCIA PRIMÁRIA E SECUNDÁRIA AOS ANTI-RETROVIRAIS	17
2.5	TESTES DE RESISTÊNCIA ANTES DO INÍCIO DO TRATAMENTO	21
2.6	FARMACOCINÉTICA DOS ANTI-RETROVIRAIS E RESISTÊNCIA	23
2.7	SELEÇÃO DE RESISTÊNCIA	24
2.7.1	<b>Mutações para os Inibidores de Protease</b>	<b>24</b>
2.7.2	<b>Mutações para os Inibidores de Transcriptase Reversa Nucleosídeos</b>	<b>26</b>
2.7.3	<b>Mutações para os Inibidores de Transcriptase Reversa Não Nucleosídeos</b>	<b>30</b>
2.8	BARREIRA GENÉTICA PARA RESISTÊNCIA AOS ANTI-RETROVIRAIS	33
2.8.1	<b>Barreira genética e número de mutações</b>	<b>33</b>
2.8.2	<b>Barreira genética e facilidade na seleção de mutações</b>	<b>33</b>
2.8.3	<b>Barreira genética e associação de anti-retrovirais</b>	<b>34</b>
2.9	ADESÃO AO TRATAMENTO E RESISTÊNCIA ANTI-RETROVIRAL	35
2.10	DISTRIBUIÇÃO DOS SUBTIPOS DO HIV-1 NO MUNDO	39

2.10.1	Diversidade Genética do HIV-1 no Brasil	42
2.10.2	Subtipos virais e transmissão vertical do HIV	43
2.10.3	Resistência Viral e Subtipos genéticos do HIV-1	44
2.11	TESTES DE GENOTIPAGEM	46
2.12	INTERVENÇÕES PARA PREVENÇÃO DA TRANSMISSÃO VERTICAL E EMERGÊNCIA DE RESISTÊNCIA ANTI-RETROVIRAL	47
2.13	DETECÇÃO DE INFECÇÃO RECENTE PELO HIV-1	62
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	66
3.1	OBJETIVO GERAL	66
3.2	OBJETIVOS SECUNDÁRIOS	66
<b>4</b>	<b>PACIENTES E MÉTODOS</b>	68
4.1	DESENHO DO ESTUDO	68
4.2	SELEÇÃO DA INSTITUIÇÃO	68
4.3	SELEÇÃO DOS SUJEITOS DA PESQUISA	69
4.3.1	<b>Critérios de inclusão</b>	69
4.3.2	<b>Critérios de exclusão</b>	69
4.4	PROCEDIMENTOS DO ESTUDO	71
4.4.1	<b>Procedimentos referentes à gestante</b>	71
4.4.1.1	Visita de inclusão na coorte de gestantes	72
4.4.1.1.1	Obtenção do consentimento	72
4.4.1.1.2	Entrevista e coleta de dados	72
4.4.1.1.3	Avaliação clínica	72
4.4.1.1.4	Prescrição de antiretrovirais para quimioprofilaxia da TV	72
4.4.1.1.5	Coleta de sangue e processamento das amostras	72
4.4.1.1.6	Avaliações Laboratoriais	73
4.4.1.2	Visita 6 a 8 semanas após início dos antiretrovirais	73
4.4.1.2.1	Coleta de sangue e processamento das amostras	74

4.4.1.2.2	Avaliações laboratoriais	74
4.4.1.3	Visita pós-parto imediato	74
4.4.1.3.1	Coleta de sangue e processamento das amostras	74
4.4.1.3.2	Avaliações laboratoriais	74
4.4.1.3.3	Suspensão dos anti-retrovirais após o parto	74
4.4.1.4	Visita duas semanas, quatro semanas, seis meses e 12 meses após o parto	75
4.4.1.4.1	Coleta de sangue e processamento das amostras	75
4.4.1.4.2	Avaliações laboratoriais	75
<b>4.4.2</b>	<b>Procedimentos referentes ao bebê</b>	<b>75</b>
4.4.2.1	Coleta de sangue e processamento das amostras	75
4.4.2.2	Avaliações Laboratoriais	75
4.5	<b>CRITÉRIOS E TÉCNICAS UTILIZADOS PARA DIAGNÓSTICO E ESTADIAMENTO DA INFECÇÃO PELO HIV</b>	<b>76</b>
4.5.1	<b>Infecção pelo HIV</b>	<b>76</b>
4.5.2	<b>Avaliação materna de infecção recente pelo HIV-1 através do teste Calypte® HIV-1 BED Incidence EIA</b>	<b>76</b>
4.5.3	<b>Classificação dos casos de AIDS</b>	<b>78</b>
4.5.4	<b>Avaliação do Perfil Imunológico</b>	<b>78</b>
4.5.5	<b>Avaliação do RNA do HIV_1</b>	<b>78</b>
4.5.6	<b>Extração, amplificação e sequenciamento de nucleotídeos do gene da Polimerase (protease e transcriptase reversa) do HIV-1</b>	<b>79</b>
4.5.7	<b>Determinação do Subtipo Viral</b>	<b>80</b>
4.5.8	<b>Determinação das mutações de resistência</b>	<b>80</b>
4.5.8.1	<b>Análise de mutações de resistência primária</b>	<b>81</b>
4.5.9	<b>Diagnóstico de infecção por Chlamydia trachomatis e/ou Neisseria gonorrhoeae</b>	<b>82</b>
4.5.10	<b>Diagnóstico de sífilis</b>	<b>82</b>

4.5.11	Diagnóstico de hepatite B	82
4.5.12	Diagnóstico de hepatite C	82
5.5.13	Diagnóstico de Herpes simplex 2 (HSV-2)	83
4.5.14	Diagnóstico de exposição aos agentes causais da Toxoplasmose /Rubéola/ Citomegalovirus	83
4.6	LOCAL DA REALIZAÇÃO DOS EXAMES LABORATORIAIS	83
4.7	ASPECTOS ÉTICOS	84
4.8	REGISTRO E GERAÇÃO DA BASE DE DADOS	85
4.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA	86
4.9.1	Análise descritiva	86
4.9.2	Análise comparativa da contagem de linfócitos CD4 e do RNA do HIV_1, segundo classificação de infecção recente pelo Calypte BED EIA	86
4.9.3	Análise comparativa da contagem de linfócitos CD4 e do RNA do HIV_1 entre as amostras obtidas antes do início de HAART e 6 meses após a interrupção da HAART	86
4.9.4	Cálculo das prevalências de resistência primária e de polimorfismos na visita pré- HAART	88
4.9.5	Cálculo das incidências cumulativas de detecção de mutação após a introdução de HAART	88
4.9.6	Análise dos fatores preditores de detecção de mutação após a introdução da HAART	89
4.9.6.1	Codificação das covariáveis seleccionadas	89
4.9.6.2	Medida de associação	90
4.9.6.3	Modelo de Poisson não ajustado e ajustado	91
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>92</b>
5.1	CARACTERÍSTICAS SÓCIODEMOGRÁFICAS E COMPORTAMENTAIS	92
5.2	CATEGORIA DE EXPOSIÇÃO AO HIV	94

5.3	OUTRAS INFECÇÕES SEXUALMENTE TRANSMISSÍVEIS	94
5.4	OUTRAS TESTAGENS SOROLÓGICAS NO PRÉ-NATAL	95
5.5	CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS, IMUNOLÓGICAS E DA GESTAÇÃO	96
5.6	CARACTERÍSTICAS RELACIONADAS AO PARTO	98
5.7	CARACTERÍSTICAS RELACIONADAS AOS RECÉM-NATOS DAS GESTANTES	98
5.8	ANÁLISES DA CONTAGEM DE LINFÓCITOS CD4 E DA QUANTIFICAÇÃO DO RNA HIV-1	100
5.8.1	<b>Médias e medianas da contagem de linfócitos CD4 e RNA do HIV-1 nas visitas de inclusão (pré-HAART), 6-8 semanas pós-HAART, parto e 6 meses após o parto</b>	100
5.8.2	<b>Análise comparativa por teste pareado de Wilcoxon da contagem de linfócitos CD4 nas visitas de inclusão (pré-HAART) e de 6 meses após interrupção de HAART</b>	102
5.9	ANÁLISE DE INFECÇÃO RECENTE PELO CALYPTTE HIV-1 BED EIA	104
5.10	ANÁLISE FILOGENÉTICA DA REGIÃO DA POLIMERASE VIRAL	104
5.11	ANÁLISE DA PRESENÇA DE MUTAÇÕES DE RESISTÊNCIA DO HIV-1 AOS ANTI-RETROVIRAIS	109
5.11.1	<b>5.11.1 Análise de Resistência Primária</b>	109
5.11.1.1	Resistência Primária aos Inibidores da Transcriptase Reversa Análogo aos Nucleosídeos	109
5.11.1.2	Resistência Primária aos Inibidores da Transcriptase Reversa Não Análogo aos Nucleosídeos	110

5.11.1.3	Resistência Primária aos Inibidores da Protease	110
<b>5.11.2</b>	<b>Análise de mutações acessórias polimórficas e não polimórficas na região da Protease e da Transcriptase Reversa</b>	<b>112</b>
5.11.2.1	Mutações acessórias da região da Protease	112
5.11.2.2	Mutações acessórias na região da Transcriptase Reversa	115
<b>5.11.3</b>	<b>Análise das mutações detectadas após a introdução dos anti-retrovirais</b>	<b>116</b>
<b>5.11.4</b>	<b>Mutações de resistência secundária em gestantes que tinham mutação de resistência primária na visita de inclusão na coorte (n = 14)</b>	<b>117</b>
<b>5.11.5</b>	<b>Análise de mutações de resistência secundária em gestantes que não tinham mutação de resistência primária na entrada na coorte (n = 109)</b>	<b>118</b>
<b>5.11.6</b>	<b>Análise de mutações de resistência secundária na presença de polimorfismo G335C/D na visita de inclusão na coorte (n = 12)</b>	<b>121</b>
<b>5.12</b>	<b>FATORES PREDITORES DE NOVAS MUTAÇÕES APÓS A INTRODUÇÃO DE HAART PARA PMTCT</b>	<b>122</b>
<b>5.12.1</b>	<b>Análise univariada</b>	<b>122</b>
<b>5.12.2</b>	<b>Análise multivariada</b>	<b>124</b>
<b>6</b>	<b>Discussão</b>	<b>127</b>
6.1	DADOS DEMOGRÁFICOS	128
6.2	AVALIAÇÃO IMUNOLÓGICA E VIROLÓGICA	131
6.3	INFECÇÃO RECENTE PELO HIV-1	133
6.4	DIVERSIDADE GENÉTICA DO HIV-1	134
6.5	RESISTÊNCIA PRIMÁRIA AOS ANTI-RETROVIRAIS	136
6.6	DETECÇÃO DE MUTAÇÕES APÓS A INTERRUPÇÃO DOS ANTI-RETROVIRAIS NO PARTO	143
6.7	DISCUSSÃO DO MODELO MULTIVARIADO	151

<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	154
<b>8</b>	<b>RECOMENDAÇÕES</b>	155
	BIBLIOGRAFIA	156
	ANEXO A	187
	ANEXO B	188

## 1 INTRODUÇÃO

Apesar dos importantes avanços no conhecimento sobre a patogênese da infecção pelo HIV e do advento da terapia anti-retroviral potente, a epidemia de HIV/AIDS continua a crescer, especialmente na população feminina (UNAIDS 2007).

De acordo com a última atualização global sobre a epidemia de AIDS pela UNAIDS (Joint United Nations Programme on HIV/AIDS), o número total de mulheres vivendo com HIV/AIDS cresceu de 1.2 milhões entre 2004 e 2006 para um total de 17.7 milhões de mulheres, representando 48% da população total de adultos vivendo com HIV/AIDS em 2007 (UNAIDS 2007). Esse aumento da prevalência nas mulheres tem sido observado em cada região e continente.

A morbidade e mortalidade relacionadas ao HIV/AIDS têm tido impacto crescente entre os mais pobres e desfavorecidos e entre os mais jovens, estando as mulheres sempre extensivamente representadas nestes grupos. O número crescente de mulheres vivendo com HIV/AIDS é um achado dominante na evolução desta epidemia no Brasil (MS 2007). A epidemia de AIDS no Brasil conta hoje com cerca de 470 mil casos confirmados da doença, dos quais 160 mil são mulheres, estimando-se que há cerca de 600 mil infectados vivendo com HIV e AIDS.

Anualmente, 3 milhões de mulheres dão à luz no Brasil. Segundo estudo realizado em 2004, numa amostra representativa de parturientes de 15 a 49 anos de idade de todas as regiões do país, a taxa de prevalência de infecção pelo HIV em mulheres no momento do parto é de 0,42%, o que corresponde a uma estimativa de cerca de 13 mil parturientes com HIV/AIDS por ano (MS 2007). Diante desta situação epidemiológica e da existência de esquema profilático altamente eficaz contra a transmissão materno-infantil do HIV, torna-se de grande importância o

conhecimento, o mais precocemente possível, do estado sorológico das gestantes, a fim de iniciar a terapêutica da doença e/ou profilaxia adequada da transmissão vertical do vírus.

O uso de quimioprofilaxia com anti-retrovirais para mulheres grávidas infectadas pelo HIV-1 representou um importante avanço na prevenção da transmissão vertical (Connor, Sperling et al. 1994; 1998; Dabis, Msellati et al. 1999; Pieniazek, Ellenberger et al. 1999; Shaffer, Chuachoowong et al. 1999; Shaffer, Roongpisuthipong et al. 1999), tendo aumentado a expectativa de vida entre os portadores de infecção pelo HIV (Palella, Delaney et al. 1998) e redução do risco de transmissão materno infantil do HIV para menos de 1% nos países desenvolvidos (Study 2005; Craft, Delaney et al. 2007). Como resultado, mulheres com HIV não devem diferir substancialmente das mulheres não portadoras do vírus no que diz respeito às questões reprodutivas e a intenção de ter filhos (Craft, Delaney et al. 2007; Heard, Sitta et al. 2007; Ogilvie, Palepu et al. 2007; Stanwood, Cohn et al. 2007; van Leeuwen, Prins et al. 2007).

Entretanto, o amplo uso de agentes anti-retrovirais e o aumento da prevalência de cepas do HIV resistentes às drogas anti-retrovirais trazem questionamentos sobre as possíveis implicações da resistência aos anti-retrovirais quando utilizados no âmbito da prevenção da transmissão perinatal do HIV-1 (Colgrove and Japour 1999; Masquelier, Descamps et al. 1999).

O desenvolvimento de resistência é motivo especial de preocupação no caso de esquemas de quimioprofilaxia com barreira genética limitada, tais como os que contêm Nevirapina. Tal situação poderia acarretar o desenvolvimento de resistência à este medicamento, e conseqüentemente a outros anti-retrovirais da mesma classe. Já está bem documentado que regimes de dose única de nevirapina para prevenção da transmissão materno infantil do HIV podem resultar em resistência anti-retroviral, mesmo virgens para terapia anti-retroviral (Jackson, Becker-Pergola et al. 2000; Eshleman, Becker-Pergola et al. 2001).

O desenvolvimento de resistência pode, potencialmente, comprometer futuras opções terapêuticas para as mulheres expostas à quimioprofilaxia com anti-

retrovirais, bem como comprometer o uso posterior de quimioprofilaxia em gestações subseqüentes.

Existem poucos dados disponíveis na literatura que esclareçam as possíveis repercussões da utilização da terapia anti-retroviral de alta potência (HAART), no que diz respeito à toxicidade para o feto, mudanças na história natural da infecção pelo HIV na mulher, desenvolvimento de resistência viral, eventual transmissão de cepas virais resistentes para o feto e limitação de futuras opções terapêuticas para a mulher e para a criança infectada verticalmente (Lyons, Coughlan et al. 2005).

O Brasil se destaca entre os países em desenvolvimento por oferecer acesso universal ao tratamento anti-retroviral. Além disso, são disponibilizados também, gratuitamente, exames de contagem de linfócitos CD4+/TCD8+, quantificação de RNA-HIV-1 e testes de resistência aos anti-retrovirais. Ao final de 2007, cerca de 160.000 indivíduos infectados pelo HIV se encontravam em tratamento anti-retroviral.

As recomendações do Ministério da Saúde de quimioprofilaxia com anti-retrovirais para gestantes portadoras de infecção pelo HIV-1, embora permitam o uso de terapia anti-retroviral potente (HAART) para mulheres com carga viral para o HIV-1 maior que 1.000 cópias/mL, continuam admitindo o uso isolado de Zidovudina para aquelas que apresentam Carga Viral do HIV-1 até 1.000 cópias/mL. Além disso, é recomendada, como em outros países, a suspensão da quimioprofilaxia anti-retroviral após o parto para as mulheres que não necessitem do uso de anti-retrovirais para tratamento da infecção pelo HIV. Devido à logística em realizar exames de carga viral na rede pública, na maior parte das vezes, a suspensão dos anti-retrovirais ocorre sem que a quantificação de RNA viral seja de fato avaliada, e, em alguns casos, sem que a carga viral para o HIV-1 esteja indetectável no plasma (MS 2006).

O Hospital Geral de Nova Iguaçu (HGNI) é um centro de referência para acompanhamento de gestantes portadoras de infecção pelo HIV e seus bebês expostos, para toda a Baixada Fluminense. Em 2005, foi estruturada uma coorte de gestantes infectadas pelo HIV, com o objetivo principal de estudar a história natural da infecção pelo HIV nesta população e o impacto da quimioprofilaxia anti-retroviral

para prevenção da transmissão vertical do HIV-1 na indução e desenvolvimento de mutações de resistência aos anti-retrovirais, nas gestações subseqüentes e no momento em que houver necessidade de início de terapia anti-retroviral. Os resultados aqui apresentados são fruto de um trabalho realizado em colaboração com diversos pesquisadores da Fundação Oswaldo Cruz e do Hospital Geral de Nova Iguaçu (HGNI).

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 INFECÇÃO PELO HIV EM MULHERES

A epidemia de HIV/AIDS no Brasil assumiu dimensões nacionais, não se restringindo aos grandes centros urbanos. Atinge atualmente mais da metade dos municípios brasileiros, sendo que, nos últimos anos, avançou entre os municípios pequenos, que têm a menor renda per-capita. Apesar do registro de casos de AIDS em todos os estados, a epidemia não se distribui de forma homogênea, observando-se uma maior concentração nas regiões Sudeste e Sul, as mais desenvolvidas do país (MS 2007).

Desde o início dos anos 90, a transmissão heterossexual passou a ser a principal via de transmissão do HIV, promovendo crescimento considerável na frequência de casos entre mulheres, tendência que vem se mantendo até os dias atuais. Dentro deste perfil atual da epidemia, onde a transmissão heterossexual é predominante, a AIDS deixou de ser uma doença exclusiva ou predominantemente de segmentos populacionais sob particular risco e disseminou-se progressivamente na população geral, obedecendo a dinâmicas distintas nos diferentes segmentos populacionais.

Nos últimos anos, a epidemia de AIDS no Brasil vem apresentando importantes mudanças no seu perfil, caracterizando-se pela interiorização, feminilização, juvenilização e pauperização. De 1980 a junho de 2007, foram identificados um total de 474.273 casos de AIDS, sendo 314.294 (66%) casos no sexo masculino e 159.793 (34%) no sexo feminino (MS 2007). Observa-se que a razão de sexo (Homens: Mulheres) no Brasil vem diminuindo ao longo da série histórica, passando de 15 homens para cada mulher (15,1: 1) em 1986 para 15 homens para cada 10 mulheres (1,5: 1) em 2005. A partir de 1998 houve inversão da razão de sexo dos casos de AIDS em jovens de 13 a 19 anos, tendo por referência a totalidade dos casos do Brasil em que o sexo masculino predomina. Em

2005, esse indicador atingiu o valor de 0,6: 1 (H:M), ou seja, 6 homens para cada 10 mulheres, representando uma taxa de incidência de 1,7/100.000 hab. e 2,8/100.000 hab., respectivamente. Em jovens de 20 a 24 anos a inversão da razão de sexo não foi observada. É importante ressaltar que na faixa etária de 13 a 19 anos há uma clara inversão na razão de sexo a partir do ano de 1998. Entre 1980 e 2007 observa-se que, do total de casos identificados em homens, 78% estão na faixa etária de 25 a 49 anos. Para as mulheres, essa proporção corresponde a 71%. Atualmente a AIDS é uma das principais causas de morte entre as mulheres nos municípios de São Paulo e Rio de Janeiro.

Em nível mundial, a transmissão heterossexual é responsável pela infecção de quase 90% das pessoas que vivem com HIV/AIDS, tendo a maior parte dos indivíduos infectados pelo HIV adquirido a infecção através de exposição sexual a fluidos seminais ou secreções cérvico-vaginais (Mostad and Kreiss 1996). Vários fatores comportamentais e biológicos estão associados à transmissão do vírus e sugerem um risco potencialmente maior de transmissão heterossexual para a mulher a partir de seu parceiro infectado pelo HIV (Plummer, Simonsen et al. 1991). As mulheres são biologicamente mais vulneráveis, por serem a parte receptiva na relação heterossexual. Uma extensa superfície da mucosa vaginal é exposta ao sêmen, que contém maior quantidade de vírus que as secreções cérvico-vaginais. Isto as torna mais vulneráveis que o homem à infecção pelo HIV ou a qualquer outro patógeno sexualmente transmissível.

As mulheres representam atualmente 48% dos adultos vivendo com HIV/AIDS no mundo, sendo esta proporção crescente ao longo do tempo (UNAIDS 2007). A infecção pelo HIV atinge as mulheres em idade mais precoce que os homens e o crescimento dos casos de AIDS na população feminina, especialmente entre as mulheres em idade reprodutiva, tem resultado no aumento dos casos de AIDS em crianças adquiridos através da transmissão vertical, sendo esta categoria responsável pela quase totalidade dos casos de AIDS ocorridos em crianças (MS 2007).

Para obter mais conhecimento sobre essa situação em nosso país, o Ministério da Saúde (MS) vem realizando, desde 1997, através de seu Programa Nacional de DST/AIDS, estudos de prevalência do HIV em parturientes. O último

estudo, realizado em 2004 (MS 2007), demonstrou uma prevalência média de 0,41%, o que corresponde a cerca de 12.635 gestantes infectadas/crianças expostas ao HIV por ano, no Brasil (estimativa baseada no número de nascidos vivos — SINASC). Com o mesmo objetivo foi instituída também pelo Ministério da Saúde a vigilância epidemiológica da gestante portadora de HIV. Desde sua implantação, em 2000, foram notificados no SINAN 36.326 casos. Em 2005, as regiões Sul e Sudeste apresentaram maiores coeficientes de detecção de gestante HIV+, respectivamente, 4,8 e 2,3/1.000 nascidos vivos (MS 2007).

Em média, 55% dos casos notificados estão entre as gestantes de 20 a 29 anos e não existem variações significativas na tendência da distribuição dos casos por faixa etária nos anos analisados. Com relação à escolaridade, observa-se que 51% do total de casos têm entre um e sete anos de estudos concluídos, 23,8% tem oito anos ou mais e 3,4% nenhum, ressaltando-se que existem 22% de casos em que essa informação encontra-se ignorada, o que compromete a análise das tendências temporais desse indicador. Quanto à variável raça/cor, 39,5% são não brancas ou pardas, 46,1% brancas, 0,2% indígenas e 0,8% amarelas (MS 2007).

De acordo com dados da Organização Mundial de Saúde e da UNAIDS, estimava-se que, até o final de 2007, 2,5 milhões de crianças em todo o mundo com idade inferior a 15 anos estivessem vivendo com HIV/AIDS (UNAIDS 2007). Em 2007, 330.000 crianças menores que 15 anos morreram com HIV/AIDS ou com patologias associadas.

No Brasil, o primeiro caso de transmissão vertical foi notificado em 1985, no estado de São Paulo. O número de casos notificado nessa categoria aumentou até 1999, quando passou a ser observado um declínio do número absoluto de novos casos. Em relação aos casos de AIDS em menores de 13 anos notificados no Sistema de Informações de Agravos de Notificação (SINAN) de 1980 a 2007, na categoria de exposição transmissão sexual, em 2005, observou-se maior proporção na subcategoria heterossexual, representando 9,2% dos casos. Essa subcategoria vem crescendo proporcionalmente ao longo do período observado. A categoria de exposição transmissão vertical é responsável por 81,6% dos casos.

Embora a síndrome da imunodeficiência adquirida, com o avanço da epidemia, tenha se tornado a causa que lidera a morbi-mortalidade materna em muitas regiões do planeta, com o advento da terapia anti-retroviral (TARV), usada na rotina da assistência às gestantes infectadas pelo HIV e seus recém-nascidos, o mundo vem assistindo a desfechos bem diferentes para mães e bebês que residem em países desenvolvidos e não-desenvolvidos. Com base em evidências provenientes de diversos estudos, aceita-se hoje que a gravidez cause quase nenhum efeito na progressão da infecção pelo HIV em mulheres com infecção recente ou portadoras assintomáticas, causando progressão mais rápida da doença apenas em mulheres com infecção em estágios mais avançados (Johnston and Hoth 1993; Bakas, Zarou et al. 1996; Johnston 1996; Brocklehurst and French 1998).

Em relação aos efeitos da infecção pelo HIV na evolução da gestação, alguns autores encontraram os seguintes desfechos indesejáveis da gravidez em mulheres infectadas: abortamentos espontâneos precoces; natimortalidade; partos prematuros; recém-nascidos (RN) de baixo peso ao nascer; ruptura prematura das membranas amnióticas; co-infecções com outras doenças de transmissão sexual; infecções bacterianas e outras complicações infecciosas. Os coeficientes de complicações variam de estudo a estudo, refletindo talvez a extensão da epidemia e a natureza das doenças relacionadas ao HIV nos diferentes países, reflexo de uma interação complexa entre condições médicas e sociais que afetam a gravidez (Miotti, Dallabetta et al. 1992; Johnston and Hoth 1993; Temmerman, Chomba et al. 1994; Langston, Lewis et al. 1995; Shearer, Quinn et al. 1997; D'Ubaldo, Pezzotti et al. 1998).

## 2.2. TRANSMISSÃO VERTICAL DO HIV

As taxas de transmissão vertical do HIV variam nas diferentes regiões geográficas do mundo, sendo que nos EUA estas taxas variavam entre 15-30% antes da introdução de qualquer intervenção específica. Na Europa estas taxas eram um pouco mais baixas, situando-se entre 13-15%. Por outro lado, na África, num contexto em que as intervenções preventivas ainda são pouco sistemáticas, a

transmissão perinatal do HIV ainda mostra-se bastante elevada, situando-se entre 40-50% (UNAIDS 2007).

A taxa de transmissão vertical do HIV, sem qualquer intervenção, situa-se em torno de 20% (Connor, Sperling et al. 1994). No entanto, diversos estudos publicados na literatura médica demonstram a redução da transmissão vertical do HIV para níveis entre zero 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 (CDC 2000).

Estima-se que a transmissão ocorra antes do nascimento em aproximadamente 30 a 50% dos bebês infectados (em média 38%), definida através de cultura positiva ou Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) ao nascimento e que as 50 a 70% infecções restantes ocorram durante o processo de trabalho de parto e parto em populações que não praticam aleitamento materno (Kind, Rudin et al. 1998).

Com relação aos fatores relacionados à transmissão vertical do HIV, os estudos têm demonstrado que são vários os associados ao aumento do risco dessa transmissão, dentre os quais pode-se citar: (a) fatores virais: carga viral materna; genótipo, fenotipo viral e diversidade viral circulante; resistência viral; (b) fatores maternos: estado clínico e imunológico; estado nutricional; (c) fatores obstétricos: via de parto; condições das membranas amnióticas e tempo de ruptura; hemorragia intraparto; uso de procedimentos invasivos; (d) fatores comportamentais: prática sexual; uso de drogas; (e) fatores inerentes ao RN: prematuridade; baixo peso ao nascer; amamentação.

A associação entre carga viral materna e risco de transmissão materno-infantil do HIV foi demonstrada por vários autores (Sperling, Shapiro et al. 1996; Cao, Krogstad et al. 1997; Coll, Hernandez et al. 1997; Mayaux, Dussaix et al. 1997; Thea, Steketee et al. 1997; O'Shea, Newell et al. 1998; Shaffer, Chuachoowong et al. 1999). A taxa de transmissão aumenta proporcionalmente à viremia materna, sendo maior nos casos de doença materna avançada e no período entre a aquisição da infecção e a soroconversão, ocasião em que se observam altos níveis do antígeno p24 na corrente sangüínea da mãe (Mayaux, Blanche et al. 1995; 2002).

Vários estudos demonstraram que o AZT foi capaz de reduzir a transmissão materno-infantil em todos os níveis de carga viral apresentados pelas mães (Dickover, Garratty et al. 1996; Sperling, Shapiro et al. 1996; Newell, Gray et al. 1997). O uso de TARV combinada, em virtude de promover maior redução na carga viral materna, é mais efetivo na prevenção dessa transmissão (Bulterys and Lepage 1998).

A presença de carga viral detectável nas secreções cervicovaginais e no leite materno tem se mostrado importante determinante de risco de transmissão intraparto e pela amamentação (John and Kreiss 1996). Foi demonstrado que os níveis de HIV nesses fluidos estão correlacionados com os níveis de carga viral e de linfócitos T-CD4+ no sangue (Nduati and John 1995; Nduati, John et al. 1995; John and Kreiss 1996; John, Nduati et al. 1997). Outros estudos (Fang, Burger et al. 1995; Thea, Steketee et al. 1997) demonstraram que mais da metade das mulheres com carga viral maior que 50.000 cópias de RNA viral/mL, no momento do parto, transmitem o vírus para seus filhos. Mulheres com maiores chances de transmissão apresentam em média carga viral de 16.000 cópias de RNA viral/mL, enquanto que as com menores chances de transmissão apresentam em média carga viral de 6.600 cópias de RNA viral/mL. Após controle pelos valores de contagem dos linfócitos T-CD4+ (Thea, Steketee et al. 1997), esse estudo demonstrou que as mulheres com carga viral mensurável foram quase seis vezes mais transmissoras que aquelas com carga viral indetectável. Outro estudo demonstrou que, com o decréscimo de linfócitos T-CD4+, a transmissão vertical do HIV aumenta quase que linearmente (1996), demonstrando outros estudos associação semelhante (Lallemant, Le Coeur et al. 1994; Pitt, Brambilla et al. 1997).

Sendo o momento do parto a ocasião de maior exposição da criança ao sangue e secreções infectados de sua mãe, vários fatores obstétricos foram identificados como importantes para essa transmissão. Dentre eles: hemorragia intraparto; procedimentos obstétricos invasivos e parto prematuro (Mandelbrot, Mayaux et al. 1996).

Vários estudos demonstraram que crianças prematuras têm mais chances de se infectarem pelo HIV que as de termo (Datta, Embree et al. 1994; 1996; Tovo, de Martino et al. 1996; Newell, Gray et al. 1997). A duração do parto, embora

relevante, tem menos importância ao ser comparada à duração de ruptura das membranas amnióticas (Minkoff, Burns et al. 1995; Pitt and Cotton 1997). A ruptura prolongada das membranas amnióticas foi citada como importante fator de risco para transmissão do HIV (1994; Biggar, Miotti et al. 1996; Mandelbrot, Mayaux et al. 1996). Foi demonstrado que, independentemente do tipo de parto realizado, a duração de ruptura das membranas amnióticas por período maior que 4 horas quase que dobrou o risco de infecção por transmissão vertical (1994). O hábito de fumar e o uso de drogas ilícitas, embora sejam fatores que de forma independente se associam com maior taxa de transmissão vertical do HIV, também colaboram com esse resultado por favorecer rupturas na placenta (Mofenson 1997).

A cirurgia cesariana eletiva (CCE) foi demonstrada como fator de proteção para a transmissão vertical do HIV (1994; Dunn and Newell 1994; 1996; Kuhn, Bobat et al. 1996; Read, Frasch et al. 1998; 1999; Study 2005). Outros estudos demonstraram que a CCE representa ação protetora adicional mesmo quando essa intervenção é realizada em mulheres que receberam tratamento anti-retroviral e apresentavam carga viral baixa no momento do parto (Kind, Rudin et al. 1998; Mandelbrot, Le Chenadec et al. 1998).

Outros importantes fatores de risco para a transmissão vertical do HIV são: co-infecções por outros patógenos, tais como a sífilis; nutrição fetal deficiente (refletida no baixo peso ao nascer); estado imunológico fetal deficiente (Stiehm, Mofenson et al. 1995), presente nas condições mencionadas e na prematuridade. No Brasil, estudo sobre sífilis em parturientes realizado em 2004 mostrou prevalência de 1,6% de mulheres com sífilis no momento do parto. A partir desses dados foi possível estimar a ocorrência de 50.000 casos de sífilis em gestantes no país para o ano de 2005 (MS 2007).

São aceitas pela comunidade científica mundial como verdadeiras contribuintes para a redução da transmissão vertical do HIV as medidas de intervenção capazes de: reduzir a carga viral materna (uso de anti-retrovirais durante a gestação); proporcionar profilaxia pós-exposição ao RN (uso do AZT intravenoso durante o trabalho de parto e o parto propriamente dito e do AZT em solução oral pelos recém-nascidos); propiciar a realização rápida do parto (CCE) e a não amamentação.

A amamentação aumenta substancialmente o risco de transmissão do HIV-1 da mãe para o filho; a taxa de transmissão pela amamentação está estimada em pelo menos 16% e a amamentação prolongada quase que dobra a taxa de infecção pelo HIV-1 para os bebês (Tess, Rodrigues et al. 1998).

De acordo com as recomendações para profilaxia da transmissão vertical do HIV e terapia anti-retroviral do Ministério da Saúde brasileiro as gestantes portadoras de infecção pelo HIV deverão receber sempre profilaxia com medicamentos anti-retrovirais, com o objetivo de reduzir a transmissão vertical. A orientação de tratamento, e não apenas de profilaxia, irá depender de critérios clínicos e laboratoriais. A zidovudina, sempre que possível, deverá integrar qualquer esquema terapêutico que venha a ser adotado para a gestante infectada pelo HIV. O uso de profilaxia com anti-retrovirais deve ser iniciado a partir da 14ª semana de gestação e prosseguir durante o trabalho de parto e parto, até o clampeamento do cordão umbilical (MS 2006).

No intuito de diminuir o risco de desenvolvimento de resistência viral quando a mulher apresenta carga viral alta, recomenda-se que o esquema profilático com três drogas seja o escolhido para mulheres que apresentem carga viral do HIV maior que 1.000 cópias/mL (MS 2007).

## 2.3 RESISTÊNCIA VIRAL

Os vírus RNA possuem taxa de replicação mais elevadas quando comparados aos demais patógenos, tais como bactérias ou mesmo outros vírus. Este fenômeno é particularmente observado no HIV-1, que apresenta alta taxa de replicação e utiliza a enzima viral Transcriptase Reversa (RT) para seu ciclo replicativo, acumulando erros de transcrição que vão sendo passados ao longo de gerações virais, dando origem a um repertório vasto de formas genéticas heterogêneas conhecidas como “*quasiespécies*” (Zhang, Carruthers et al. 1997).

O acúmulo de mutações causado pela alta taxa de erro da enzima RT, além de elevada frequência de replicação, leva à formação de diferentes populações

virais que vão se diversificando ao longo do tempo, formando um conjunto de variantes virais distintas, porém relacionadas entre si (Saag, Hahn et al. 1988), presentes não apenas em diferentes indivíduos infectados, como coabitando em um mesmo organismo. Algumas populações de vírus que contém estas mutações podem ser prejudicadas quanto à sua capacidade de transmissão, infecção e replicação (“*fitness*”), porém outras populações que sofrem diferentes mutações podem utilizar este fato a seu favor, permitindo que determinados vírus mutantes consigam escapar do sistema imune e mesmo de tratamentos anti-retrovirais utilizados previamente (Hirsch, Conway et al. 1998).

Sabe-se que a supressão total da replicação viral durante um longo período é um evento raro e a supressão parcial, mesmo com replicação ocorrendo em baixos níveis, parece levar ao surgimento de resistência aos medicamentos (Powderly, Saag et al. 1999). Desta forma, a aderência ao tratamento é um fator crítico no sucesso e uma peça chave na duração da supressão virológica (DHHS 2008), considerando que eventuais falhas ao tratamento ocasionam acúmulo de mutações de resistências aos anti-retrovirais em pacientes portadores de infecção pelo HIV-1.

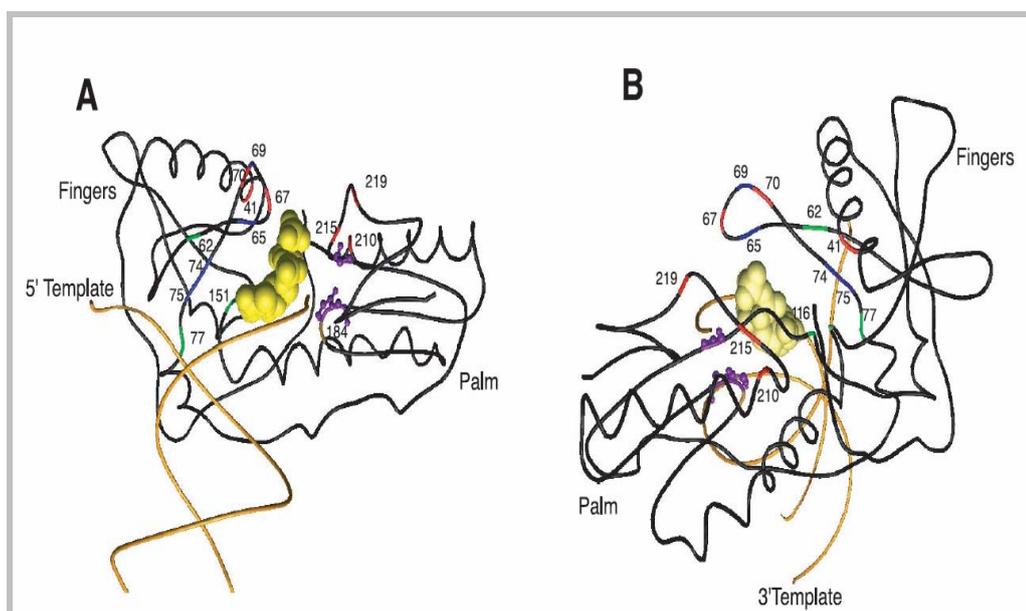
Alguns estudos mostram que 73% dos pacientes HIV-1 positivos e virgens de tratamento são susceptíveis à terapia anti-retroviral, mantendo a replicação viral suprimida por um período de diversos anos (Gallant 2004). Por outro lado, sabe-se que mesmo sem a utilização prévia de nenhum esquema de tratamento anti-retroviral, um paciente infectado pode albergar vírus resistentes à terapia, sendo este evento conhecido como resistência primária.

A resistência aos medicamentos pode ser descrita como um mecanismo de seleção natural, onde a pressão seletiva do meio ambiente, causada pelo emprego de medicamentos, seleciona positivamente uma determinada população de vírus existentes que irá replicar-se de forma mais eficiente e continuará a se expandir. Em pessoas infectadas pelo HIV-1, nas quais a diversidade de populações virais é enorme, serão selecionados os vírus que, de alguma forma, escapam da ação supressora do tratamento empregado (Vella and Palmisano 2005).

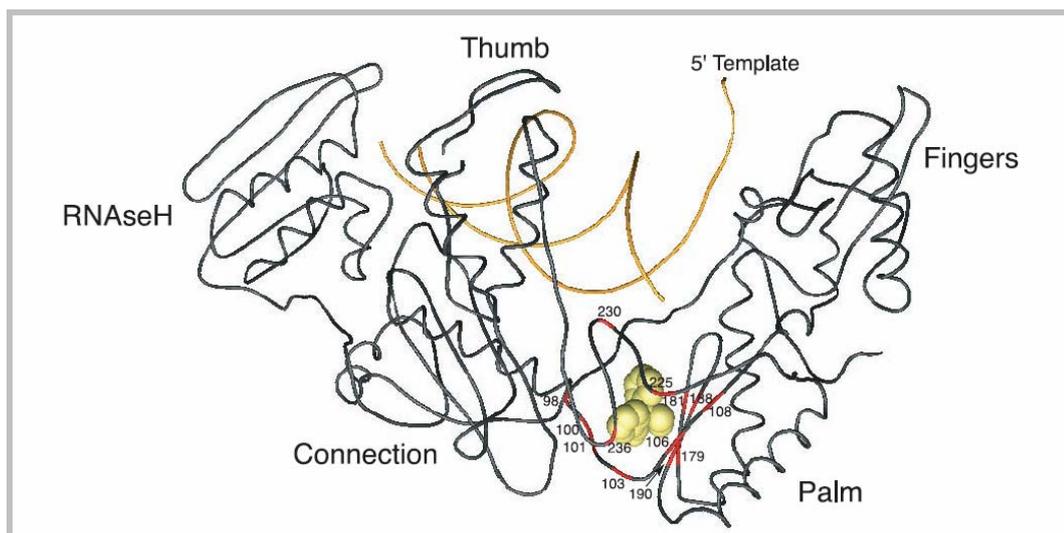
Existem dois tipos de mutações relacionadas à resistência aos anti-retrovirais: as mutações principais e as acessórias. A mutação principal é aquela que confere perda significativa de susceptibilidade ao anti-retroviral cuja presença selecionou as populações virais que a apresentavam. A mutação acessória ou secundária é a que emerge naturalmente para recuperar o “*fitness*” perdido pelo aparecimento da mutação principal, propiciando uma perda de susceptibilidade ao anti-retroviral que a selecionou. Um acúmulo de mutações secundárias pode levar a uma perda de sensibilidade ao medicamento equivalente à proporcionada por uma mutação principal (Shafer 2002).

Quando analisamos as mutações que conferem resistência parcial ou total a uma determinada classe de medicamentos, além das mutações principais são descritas mutações acessórias relacionadas ao “*fitness*” viral. Em pacientes virgens de tratamento muitas destas mutações não chegam a conferir resistência, mas facilitam o surgimento de resistência posterior até mesmo às demais classes de medicamentos anti-retrovirais.

As mutações na região do genoma viral que codifica a transcriptase reversa (TR) implicam no surgimento de resistência aos inibidores nucleosídicos da transcriptase reversa (ITRN) e aos inibidores não-nucleosídeos da transcriptase reversa (ITRNN), enquanto as mutações na região codificadora da protease implicam no surgimento de resistência aos inibidores de protease (Figuras 1 e 2).



**Figura 1** - Modelo estrutural da enzima Transcriptase Reversa do HIV-1 com mutações para os ITRN. Visão frontal em **A** e dorsal em **B** (Shafer 2002).

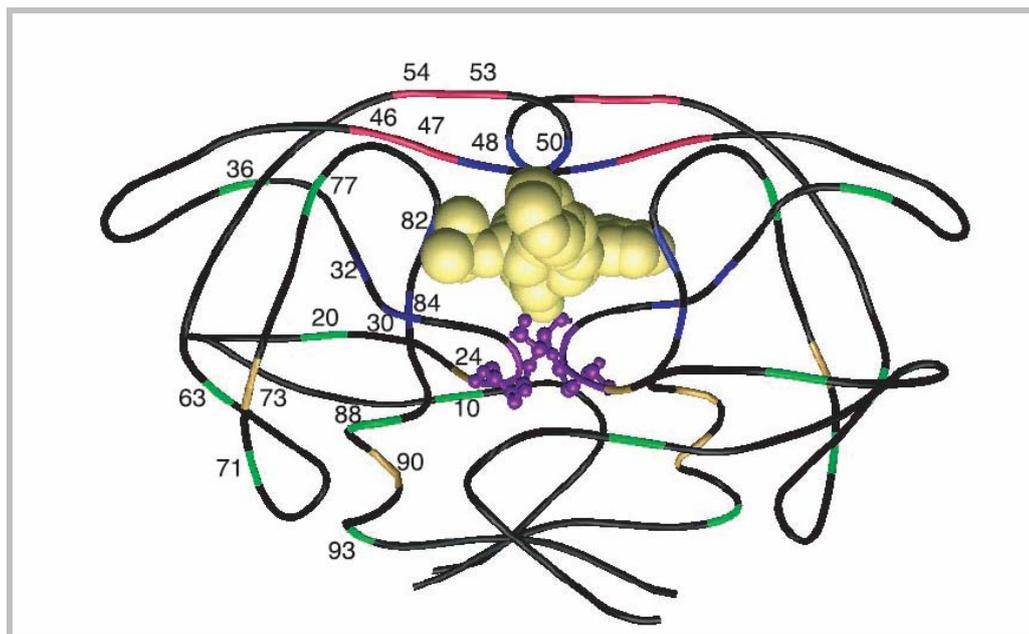


**Figura 2** - Modelo estrutural da enzima Transcriptase Reversa do HIV-1 com mutações para os ITRNN. As posições associadas com a resistência aos ITRNN estão indicadas, posicionadas próximo ao domínio hidrofóbico de ligação a estes fármacos (Shafer 2002)

Os inibidores da transcriptase reversa atuam inibindo a ação desta enzima, responsável pela conversão do RNA viral de fita simples em DNA de fita dupla. A RT é composta por um heterodímero e a estrutura espacial do domínio que exerce a atividade de polimerase pode ser comparada à mão humana, com subdomínios referentes aos dedos, à palma da mão e ao polegar (Shafer 2002).

Os ITRN atuam como terminadores de cadeia que bloqueiam a extensão adicional do DNA proviral durante a etapa de transcrição reversa. Os ITRNN competem com os deoxinucleosídeos trifosfatos naturais (dNTPs) na incorporação durante a síntese de novas cadeias de DNA, promovendo o término da cadeia, interferindo assim na replicação viral por meio de inibição competitiva da RT (Huang, Chopra et al. 1998).

Os inibidores de protease (IP) atuam na enzima protease viral (PR), responsável pelo processo tardio de maturação do vírion. A enzima reconhece e cliva diferentes substratos para dar origem as proteínas de matriz, capsídeo, nucleocapsídeo e enzimas essenciais, transcriptase reversa, integrase e protease (Peng, Ho et al. 1989). A enzima contém uma aba flexível que se fecha sobre o sítio ativo após a ligação do substrato. As estruturas tridimensionais da protease viral selvagem e de várias formas mutantes resistentes (Figura 3) já foram determinadas por cristalografia (Ala, Huston et al. 1997; Mahalingam, Louis et al. 2001).



**Figura 3** - Modelo estrutural da protease do HIV-1 com mutações de resistência aos Inibidores da Protease. Os polipeptídeos das duas subunidades da protease são representadas de 1 a 99. O sítio ativo está compreendido entre as posições 25 e 27 de ambas as subunidades (Shafer 2002).

Os inibidores da protease podem atuar diretamente no sítio ativo de ligação do substrato com a enzima, ou ainda fora do sítio, causando uma mudança conformacional na estrutura espacial da mesma, impedindo que ela desempenhe sua função, resultando na produção de precursores protéicos não-processados e vírions não infecciosos com capsídeos imaturos e defectivos.

A resistência a esta classe de medicamentos é mediada por pelo menos dois diferentes tipos de mecanismos. Mutações no substrato causam resistência por reduzir a afinidade de ligação entre o inibidor e a enzima mutante. Outras mutações presentes fora do sítio de ligação da droga com a enzima, tanto em sua aba flexível (Shafer 2002) quanto fora dela (Foulkes-Murzycki, Scott et al. 2007) conferem polimorfismos conformacionais que também podem contribuir para o surgimento de resistência.

## 2.4 RESISTÊNCIA PRIMÁRIA E SECUNDÁRIA AOS ANTI-RETROVIRAIS

Um aumento na frequência de isolamento de HIV com mutações de resistência aos anti-retrovirais, tanto em pacientes extensamente tratados quanto em pacientes virgens de tratamento, embora a frequência nestes últimos seja bem menor (Grant, Hecht et al. 2002; Little, Holte et al. 2002).

A resistência do HIV aos anti-retrovirais pode ser primária ou secundária. A resistência primária é aquela já presente mesmo antes do uso da medicação pelo indivíduo infectado, que pode ocorrer pela transmissão de cepas resistentes ou mesmo pela geração e fixação de mutantes resistentes em um indivíduo infectado decorrente do alto índice replicativo do HIV-1. A presença de resistência primária está provavelmente mais relacionada à transmissão de cepas de HIV-1 resistentes aos anti-retrovirais do que à geração espontânea. Um estudo realizado entre 2000 e 2002, que analisou 395 pacientes infectados por vírus resistentes, verificou que 23% dos pacientes tiveram sexo desprotegido nos últimos 3 meses, o que resultou em 1.126 eventos de sexo desprotegido com 191 parceiros (Kozal, Amico et al. 2004). Esses dados ajudam a explicar a crescente prevalência de resistência primária e enfatizam a necessidade e a importância da implementação de estratégias para redução do risco de transmissão entre as pessoas infectadas. Resistência secundária é aquela que emerge em decorrência da pressão de seleção exercida pela medicação anti-retroviral.

Casos de transmissão de vírus resistentes têm sido relatados nos últimos 10 anos (Erice, Mayers et al. 1993; Conlon, Klenerman et al. 1994; de Ronde, de Rooij et al. 1996; de Ronde, Schuurman et al. 1996; Quigg, Rebus et al. 1997; Rubio, Leal et al. 1997; Conway, Montessori et al. 1999; Garcia-Lerma and Heneine 2001; Johnson, Petropoulos et al. 2001). Como o primeiro anti-retroviral a ser utilizado foi a zidovudina, os primeiros relatos de transmissão de vírus com mutação de resistência relacionavam-se a mutações que conferem resistência a este composto (Kamkamidze, Sullivan et al. 2001). Com a disponibilização de outros anti-retrovirais, iniciaram-se também os relatos de transmissão de vírus com mutações relacionados

a esses fármacos (Imrie, Beveridge et al. 1997; Hecht, Grant et al. 1998; Conway, Montessori et al. 1999).

A determinação da prevalência de resistência primária em diferentes localidades do mundo é de extrema importância para o monitoramento da epidemiologia molecular do HIV-1, podendo teoricamente orientar a terapêutica empírica inicial dos pacientes de determinada área geográfica, variando de 0% a 32% dependendo do país e da localidade estudados. Ressalta-se a alta prevalência (16%) de resistência primária aos ITRNN em indivíduos com infecção recente no sul da Califórnia, EUA (Little, Daar et al. 1999). Outro dado importante é o aumento, ao longo do tempo, da prevalência de resistência primária nos EUA entre indivíduos com infecção primária/recente, de 3,5% entre 1995-1998 a 14% nos anos de 1999-2000 (Little, Holte et al. 2002).

No Brasil, um estudo conduzido pelo Ministério da Saúde que avaliou 535 pacientes cronicamente infectados e provenientes dos Centros de Testagem e Aconselhamento para o HIV-1 de todo o país, revelou que a resistência primária não ultrapassou no total a prevalência de 7%, sendo 2,2% para os IP, 2,4% para os ITRN e 2,1% para os ITRNN (Brindeiro, Diaz et al. 2003).

Um estudo conduzido com 100 pacientes com infecção recente pelo HIV-1 na cidade de Santos revelou prevalência de 22% de resistência aos ITRN, 15% aos ITRNN e 13% aos IP, com índice de resistência cumulativa de 36% (Sucupira 2004).

Alguns estudos demonstram que a taxa de transmissão de HIV com resistência primária a um ou mais anti-retrovirais tem crescido no decorrer dos últimos anos. As taxas de transmissão entre os soroconvertidores recentes variam entre diferentes países: 5% na Suíça; 10% na França; 13% na Alemanha; 14% no Reino Unido; 16,5% em um pool de 9 cidades Americanas; 21% em Quebec e 26% em Madrid (Brenner, Wainberg et al. 2000; Briones, Perez-Olmeda et al. 2001; Duwe, Brunn et al. 2001; Yerly, Rickenbach et al. 2001; Grant, Hecht et al. 2002; Little, Holte et al. 2002).

Estudos longitudinais realizados nos Estados Unidos da América em pacientes com infecção primária demonstraram que após um aumento crescente da prevalência de resistência primária de 1996 a 2000 (Little, Holte et al. 2002), houve redução de 12,4% para 6,7% de 2000 a 2002. O mesmo foi demonstrado na coorte Suíça, onde a resistência genotípica foi de 8,6% em 1996, 14,6% em 1997, 8,8% em 1998 e 5,0% em 1999 (Yerly, Rickenbach et al. 2001). Na Europa, de forma geral, o mesmo tem ocorrido (Vernazza, Troiani et al. 2000; Wensing and Boucher 2003). Estas análises são de difícil interpretação, visto que as pesquisas têm dificuldade de avaliar os fatores de risco para aquisição do HIV-1 nas populações estudadas.

Nos estudos europeus, a queda na prevalência de resistência primária pode ter influência sobre o crescente número de pessoas infectadas por vírus subtipo não-B, uma vez que pacientes nesta situação normalmente são originários de países africanos, onde o uso de anti-retrovirais é bastante restrito. Outro possível fator implicado nas recentes quedas observadas na prevalência de resistência primária é o uso de esquemas de tratamento compostos por medicamentos cada vez mais potentes. Pacientes tratados com esquemas mais potentes terão uma chance menor de transmissão do HIV, uma vez que a viremia desses pacientes é muito reduzida, ficando dessa forma diminuído o risco de transmissão.

Vários estudos indicam que as mutações de resistência primária persistem por longos períodos de tempo mesmo na ausência de tratamento (Brenner, Turner et al. 2003; Barbour, Hecht et al. 2004; Delaugerre, Roudiere et al. 2005). A explicação para isso reside no fato de que, no momento em que uma pessoa se infecta, adquire uma população viral muito homogênea e não uma mistura de cepas virais, em um fenômeno conhecido como transmissão seletiva. Desta forma, não haveria uma população de vírus selvagens preexistentes que pudesse emergir na ausência de anti-retrovirais.

Uma outra tendência que se observa mundialmente com relação à resistência primária é o aumento proporcional de resistência aos ITRNN (Grant, Hecht et al. 2002; Little, Holte et al. 2002; Brenner, Turner et al. 2003; Ross, Parkin et al. 2004). Esse fenômeno decorre do tratamento de escolha preconizado em diversos guias terapêuticos ao redor do mundo nos últimos anos, composto por ITRNN em um momento inicial. Além disso, observa-se maior tempo de persistência

das mutações que conferem resistência aos ITRNN, mesmo na ausência de pressão seletiva dos anti-retrovirais, já que estas não proporcionam uma perda significativa da capacidade replicativa do vírus.

Alguns estudos mostram que a eficácia do tratamento anti-retroviral fica comprometida em pacientes infectados por vírus resistentes (Little, Daar et al. 1999). Não existem, entretanto, muitos trabalhos de grande porte que avaliem a influência da resistência anti-retroviral no desempenho do tratamento. A análise retrospectiva de um estudo clínico com 571 pacientes tratados com FTC, ddl e efavirenz comparados com d4T, ddl e efavirenz encontrou 16% de resistência primária aos ITRN ou ITRNN, observado-se falha significativamente mais freqüente no grupo de pessoas com resistência primária (Borrito-Esoda, Myrick et al. 2004).

O grupo de estudo CASCADE Virology Colaboration (Pillay, Bhaskaran et al. 2006) avaliou o impacto da transmissão de vírus resistente (TVR) a medicamentos anti-retrovirais na história natural da infecção pelo HIV-1. Foram acompanhados 300 pacientes portadores de infecção pelo HIV-1, virgens de tratamento anti-retroviral, recrutados no período entre 1987 e 1993, nos quais os testes de resistência foram feitos nos primeiros 18 meses após o diagnóstico da infecção pelo HIV-1. Foi avaliado o impacto da TVR no declínio subsequente de células CD4, na ausência de tratamento. O impacto observado parece ser tempo dependente, com maiores taxas de declínio no primeiro ano que se segue à infecção pelo HIV-1. Não foram encontradas evidências a longo prazo do efeito da TVR na história natural da infecção pelo HIV-1. O rápido declínio de CD4 no primeiro ano após infecção com TVR não necessariamente persiste e esse fato deve ser levado em conta nas decisões sobre início do TARV.

Markowitz e colaboradores relataram um caso de transmissão de vírus resistente que ficou conhecido como supervírus (Markowitz, Mohri et al. 2005). Neste caso, ocorrido em Nova Iorque, houve a transmissão de um vírus resistente a todos os ITRN, ITRNN e IP tanto genotípica como fenotipicamente. Além disso, esse vírus era indutor de sincício ou vírus com tropismo X4. A progressão da doença foi rápida e a resposta ao tratamento limitada neste caso.

Um estudo realizado na cidade de São Paulo por El-Far e colaboradores analisou retrospectivamente a prevalência de resistência primária em gestantes e a correlação entre a resistência primária e a eficácia da profilaxia anti-retroviral na prevenção de transmissão vertical. Foi encontrado 20% de resistência primária, o que correspondia a oito mulheres, das quais quatro apresentavam a mutação **M184V**, duas a mutação **K103N** e duas a mutação **L90M**. Todas as pacientes foram tratadas com o medicamento ao qual os vírus apresentavam resistência, e apesar disto todas alcançaram carga viral do HIV-1 indetectável no momento do parto. Apesar da eficácia em curto prazo observada neste trabalho, é difícil especular sobre o desempenho destes tratamentos a médio e em longo prazo (El-Far, Medeiros et al. 2005).

## 2.5 TESTES DE RESISTÊNCIA ANTES DO INÍCIO DO TRATAMENTO

A Organização Mundial da Saúde (WHO) estimava que mais de dois milhões de pessoas tivessem iniciado terapia anti-retroviral (ARV) no final de 2006. Como o desenvolvimento de resistência às drogas anti-retrovirais é inevitável em populações que fazem uso dos antivirais, a emergência de resistência deve ser contrabalançada em relação aos benefícios da provisão de anti-retrovirais e diminuição da morbidade e mortalidade associadas ao HIV/AIDS.

Os programas de distribuição de anti-retrovirais devem operar na tentativa de minimizar a emergência de resistência às drogas anti-retrovirais em populações recebendo terapia, e a resistência às drogas deve ser monitorada para assegurar a eficácia da terapia utilizada.

A Organização Mundial de Saúde desenvolveu uma programa/pesquisa de base populacional para avaliação do perfil de resistência primária aos anti-retrovirais, como estratégia de prevenção para os países em desenvolvimento (Bennett, Bertagnolio et al. 2008; Bennett, Myatt et al. 2008) planejado para ser aplicado em diversos países em desenvolvimento, e em pelo menos 47 indivíduos em cada região. O nível de resistência encontrado deverá ser categorizado nas seguintes classes: <5%, 5-15% ou > 15% (Bennett, Bertagnolio et al. 2008; Bennett, Myatt et

al. 2008; Jordan, Bennett et al. 2008). Essas avaliações já foram implementadas em 21 países. Sete países, que já usam anti-retrovirais há alguns anos, reportaram resultados com níveis de resistência primária < 5%: Malawi, Etiopia, Swazilândia, Província Gauteng (África do Sul), Bangkok, Vietnam, Tanzania (Bennett, Bertagnolio et al. 2008).

Alguns estudos indicam que se a prevalência de resistência primária for superior a 5%, (Hecht and Grant 2005) ou mesmo a 1% (Sax, Islam et al. 2005), a realização do teste de resistência aos anti-retrovirais antes do início do tratamento é custo-efetiva.

O quadro 1 resume as principais diretrizes com relação à indicação dos testes de resistência antes do início do tratamento anti-retroviral.

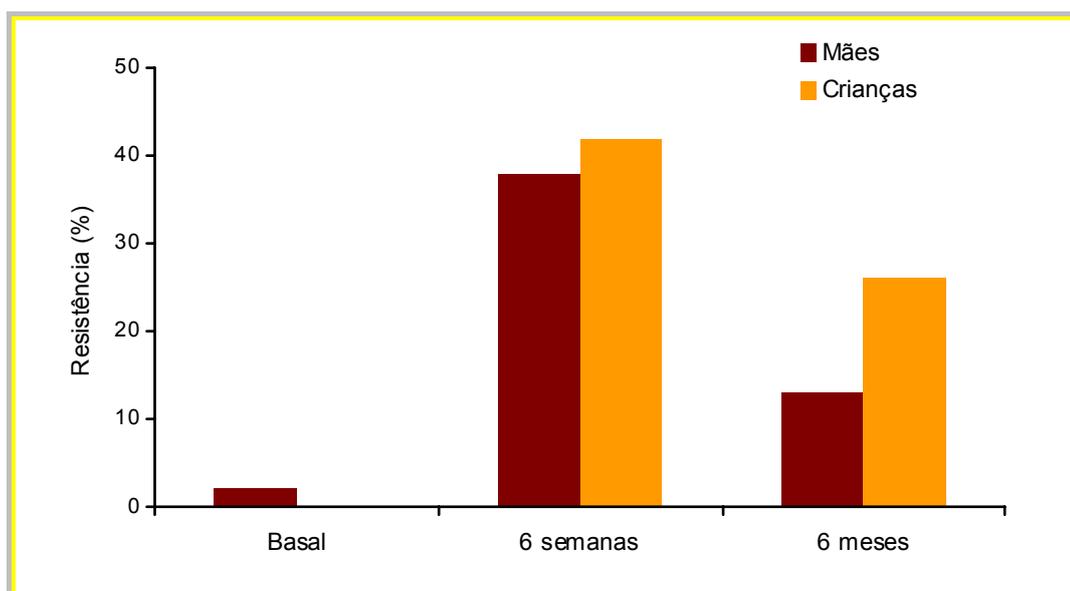
Quadro	IAS-USA	DHHS	EuroGuidelines group	British HIV Association	RENAGENO
Infecção aguda e infecção recente em pacientes virgens de anti-retroviral	Recomendado tratamento independente de resultado do teste de genotipagem	Recomendado se a decisão a ser tomada é para o início da terapia	Recomendado † testar a amostra mais recente disponível. Não atrasar tratamento por resultados do teste de genotipagem	Recomendado usar amostra disponível mais próxima à soroconversão	Não recomendado
Infecção crônica (1-2 anos ou mais) em pacientes virgens de anti-retroviral	Recomendado postergar a terapia até que os resultados de teste de genotipagem estejam disponíveis. Ensaio disponível podem não detectar espécies minoritárias resistentes às drogas	Considerar especialmente se houver alta suspeita de transmissão de vírus resistente*. Ensaio disponíveis podem não detectar espécies minoritárias resistentes às drogas	Recomendado considerar / testar a amostra mais recente se houver elevada taxa de transmissão na área ou no grupo de risco (>10%) ou alta suspeita de transmissão de vírus resistente*	Recomendado usar amostra disponível mais próxima à soroconversão	Não recomendado
Tempo de infecção desconhecido em pacientes virgens de anti-retroviral	Considerar especialmente se a prevalência regional de resistência for $\geq 5\%$	Recomendado usar amostra disponível mais próxima à soroconversão			Não recomendado

**Quadro 1** - Recomendações para teste de resistência genotípica antes do início da terapia em pacientes virgens de tratamento anti-retroviral (Diaz 2006).

## 2.6 FARMACOCINÉTICA DOS ANTI-RETROVIRAIS E RESISTÊNCIA

A monoterapia anti-retroviral é um dos principais riscos para a emergência da resistência, situação que pode ocorrer tanto no momento de interrupção de um esquema terapêutico quanto em eventuais perdas das doses do tratamento prescrito, em decorrência das diferentes meias-vidas dos anti-retrovirais contidos em um esquema. Quando interrompido um esquema com três medicamentos que possuem meia-vida diferentes, após certo período de tempo somente duas delas estarão presentes no sangue (terapia dupla) e, em um momento seguinte, somente um destes medicamentos terá nível acima do necessário para supressão do HIV (monoterapia). Estão sob maior risco de seleção de mutantes resistentes os anti-retrovirais com meia-vida muito elevada, como os ITRNN.

A nevirapina apresenta uma meia-vida que varia entre 25 e 32 horas, e o efavirenz, entre 40 e 55 horas (Mackie, Fidler et al. 2004). Em estudo conduzido em Uganda (Eshleman, Guay et al. 2004), gestantes foram aleatoriamente selecionadas para receber uma única dose de nevirapina ou placebo no momento do parto. Apesar da eficácia na prevenção da transmissão vertical do HIV, observou-se que com o uso de nevirapina mães e recém-nascidos que nasceram infectados apresentaram níveis em torno de 40% de resistência aos ITRNN, apresentando as mutações **K103N**, **V106A/M**, **Y181C** ou **G190A** (Figura 4).



**Figura 4.** Incidência e persistência de resistência a nevirapina em 157 mulheres e 21 crianças após uma única dose da droga durante o parto. Estão representadas as prevalências de mutações detectadas após 6 semanas e após 6 meses do parto (Cressey, Jourdain et al. 2005).

Os níveis séricos de nevirapina após uma única dose neste estudo persistiram por cerca de 21 dias (Cressey, Jourdain et al. 2005). É interessante notar que a prevalência de resistência tanto em mães como em recém-nascidos diminuiu aos 6 meses quando comparada às 6 semanas, demonstrando que a sensibilidade dos testes de resistência neste caso diminui ao longo do tempo.

Além da meia-vida como fator relacionado ao risco de seleção de mutações de resistência, existe o tempo em que um determinado anti-retroviral permanece na chamada zona de alta pressão seletiva, que é representada pelo tempo que as concentrações séricas do anti-retroviral permanecem entre o  $IC_{50}$  do vírus do tipo selvagem e o  $IC_{50}$  hipotético do HIV mutante. O tempo que um determinado anti-retroviral permanece na zona de alta pressão seletiva é variável e, quanto maior este período de tempo, maior a chance de seleção de mutantes resistentes. Se compararmos o lopinavir-r com o nelfinavir, primeiro permaneceria 2,6 e 5,3 horas nesta zona, e o segundo, entre 6 e 12 horas. Este seria um dos motivos que explicariam a maior chance de seleção de mutantes de resistência de uma droga sobre a outra (Diaz 2006).

## 2.7 SELEÇÃO DE RESISTÊNCIA

### 2.7.1 Mutações para os Inibidores de Protease

As mutações no substrato do sitio ativo nas posições **23, 30, 32, 47, 48, 50, 82, 84**, na aba flexível nas posições **46 e 54** e no interior da enzima nas posições **76, 88, e 90** reduzem a sensibilidade a um ou mais inibidores de transcriptase reversa. As mutações nas posições **24, 33, 53 e 73** são mutações não polimórficas, que podem ocorrer comumente, e tem efeitos para diferentes inibidores de protease (Rhee, Taylor et al. 2006).

A resistência aos inibidores de protease é determinada por uma complexa configuração de mutações, influenciada por diversos fatores. Por exemplo, enquanto várias mutações podem reduzir a sensibilidade ao Nelfinavir, as mutações nas posições **L23I, D30N, M46I/L, G48V/M, I84V, N88D/S e L90M** são contra-indicação

para o uso de Nelfinavir, uma vez que uma resposta virológica inferior seria esperada se comparado com a resposta com outros inibidores de protease (Patick, Mo et al. 1996; Vray, Meynard et al. 2003; Johnston, Winters et al. 2004; Winters, Montaner et al. 2008).

Pacientes em uso de esquemas contendo Nelfinavir desenvolvem resistência ao Nelfinavir podendo apresentar três padrões distintos de mutações aos Inibidores de Protease: D30N ± N88D, L90M, e N88S (Patick, Mo et al. 1996; Patick, Duran et al. 1998; Atkinson, Isaacson et al. 2000; Walmsley, Becker et al. 2001; Shafer, Smeaton et al. 2003; Kempf, King et al. 2004; Mitsuya, Winters et al. 2006; Deforche, Camacho et al. 2007). A mutação **M46I/L** pode ocorrer sozinha ou com um dos três padrões de mutações. A mutação **D30N** ocorre mais comumente que as mutações **L90M** e **N88S** no subtipo B, mas não em todos os outros subtipos. A mutação **L90M** ocorre mais comumente no subtipo C (Grossman, Paxinos et al. 2004; Abecasis, Paraskevis et al. 2005; Abecasis, Deforche et al. 2005). A mutação **N88S** tem sido reportada mais comumente no subtipo AE (Ariyoshi, Matsuda et al. 2003).

A partir da pressão seletiva exercida por um medicamento, o vírus pode desenvolver algumas mutações específicas, seguindo vias de mutação distintas. Estas vias mutacionais têm relevância no sentido de que algumas delas podem implicar em resistência cruzada e outras não; como exemplo a seleção dos códons **D30N** ou **L90M** pelo Nelfinavir, cada um deles acompanhado de mutações acessórias específicas, que emergem tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Quando emerge a mutação do **códon 30**, é possível o tratamento de resgate com um outro inibidor de protease, uma vez que esta mutação causa resistência praticamente exclusiva ao nelfinavir e seu aparecimento oferece pouca possibilidade de resistência cruzada. Por outro lado, quando a mutação do **códon 90** é selecionada, o resgate é bem mais difícil, já que este é um códon de resistência comum a todos os inibidores de protease. Quando o vírus submetido à pressão seletiva do nelfinavir não é do subtipo B, a via mutacional seguida é quase exclusivamente a do **códon 90**, sugerindo que a via mutacional deve ter relação com a estrutura genética da cepa viral.

As mutações nas posições **48, 54, 82, e 84** raramente ocorrem em pacientes recebendo NFV como parte de esquema inicial com inibidor de protease, e, quando sozinhas, podem causar baixo nível de resistência fenotípica. Quando em combinação com outras mutações, estão associadas com alto nível de resistência e falta de resposta virológica (Rhee, Taylor et al. 2006).

A mutação **L23I** é uma mutação raramente selecionada pelo NFV, e ocorrendo em <1% dos pacientes tratados com NFV (Johnston, Winters et al. 2004). As mutações **L33F e M46I/L**, embora não polimórficas para a maioria dos subtipos, ocorrem em 0,5 a 1% dos pacientes com subtipo A e CRF01\_AE. Várias mutações de resistência estão associadas com aumento na sensibilidade aos inibidores de protease, incluindo a mutação **I50L** que aumenta sensibilidade a todos os inibidores de protease, exceto para o Atazanavir (Colonno, Rose et al. 2004), as mutações **I50V e I54L** que aumentam a sensibilidade para o Tipranavir (Schurmann, Elston et al. 2006), a mutação **N88S** que aumenta a sensibilidade para o Fosamprenavir (Ziermann, Limoli et al. 2000), e a mutação **L76V** que aumenta a sensibilidade para o Atazanavir, Saquinavir e para o Tipranavir (Braun and Wiesmann 2007; Vermeiren, Van Craenenbroeck et al. 2007). As mutações **L33F e G73S/T/C/A** são selecionadas pelo NFV e diminuem a sensibilidade ao NFV (Rhee, Taylor et al. 2006).

Em contraste aos inibidores de protease potencializados com Ritonavir, várias mutações polimórficas, incluindo as mutações nos códons **10, 20, 36, 71, e 77**, podem estar associadas com diminuição da sensibilidade ao NFV e resposta virológica, mesmo na ausência de mutações principais aos Inibidores de Protease (Perno, Cozzi-Lepri et al. 2001). As mutações **T74S e L89IV** estão mais comumente associadas com resistência ao NFV em subtipos não B (Abecasis, Paraskevis et al. 2005; Abecasis, Deforche et al. 2005; Deforche, Silander et al. 2006).

### **2.7.2 Mutações para os Inibidores de Transcriptase Reversa Análogos aos Nucleosídeos**

As mutações relacionadas aos timidínicos (TAMs) são as que mais comumente ocorrem em pacientes recebendo regimes contendo análogos timidínicos (ZDV ou d4T). As mutações **K70R e T215Y/F** reduzem a sensibilidade da ZDV em 04 a 10 vezes, respectivamente. Entretanto, combinações de 04 ou mais

TAMs reduzem a sensibilidade ao ZDV em centenas de vezes. Tem sido reportado que o aparecimento das TAMs está diminuindo em frequência, porque tanto a ZDV e como o d4T estão sendo usados menos frequentemente como parte de esquema HAART inicial e mesmo quando esses ITRN são utilizados a falência virológica é geralmente diagnosticada precocemente com o aparecimento da mutação **M184V** (em resposta ao uso do 3TC ou FTC), e de mutação de resistência aos ITRNN (em resposta ao uso de regimes com ITRNN) que podem estar presentes mesmo antes das TAMs aparecerem (Shafer, Smeaton et al. 2003; Eron, Yeni et al. 2006; Gallant, DeJesus et al. 2006). Apesar disso, o aparecimento das TAMs continua frequente nos países em desenvolvimento, nos quais o monitoramento virológico é menos freqüente e os pacientes recebem como parte do regime HAART inicial, ZDV ou d4T, por um período de tempo maior, antes que o diagnóstico de falência virológica possa ser feito (Chaix, Rouet et al. 2005; Ferradini, Jeannin et al. 2006; Wallis 2007).

Em relação à Zidovudina, uma das vias de seleção de mutantes resistentes leva em um momento inicial à seleção dos códons **M41L, L210W e T215Y**, mutações tipo I e outra aos códons **D67N, K70R e K219Q/E/M**, mutações tipo II (Yahi, Tamalet et al. 1999; Gonzales, Belitskaya et al. 2003; Marcelin, Dalban et al. 2004; Miller 2004; De Luca, Di Giambenedetto et al. 2006). A chance de seguir por qualquer uma destas vias é a mesma. A via mutacional que envolve os códons **41, 210 e 215** leva a um maior nível de resistência a **AZT** ou a **d4T** e à resistência cruzada a Tenofovir. No caso das mutações associadas aos análogos timidínicos (TAMs), após o momento inicial em que uma das vias prevalece, vai haver um acúmulo progressivo de mutações e alguns pacientes muito experimentados podem ter 5 ou até 6 TAMs. As mutações chamadas reversoras **T215C/D/E/S/I/V** são mutações geralmente detectadas em pacientes primariamente infectados com vírus contendo a mutação **T215Y or F** (Goudsmit, de Ronde et al. 1997; de Ronde, van Dooren et al. 2001; Garcia-Lerma and Heneine 2001). Essas mutações não reduzem a sensibilidade aos ITRN, mas sugerem que a mutação **T215Y/F** estivesse presente em algum momento (Garcia-Lerma and Heneine 2001). Existem dados sugerindo esquemas de iniciais sejam menos efetivos em pacientes com vírus contendo a mutação reversora **T215** (Violin, Velleca et al. 2004; Van Laethem, Pannecouque et al. 2007).

A mutação **M184V** causa alto nível de resistência a Lamivudina (3TC), com redução na sensibilidade em mais de 300 vezes. Em pacientes com vírus contendo a mutação **M184V** existe algum benefício em continuar com o uso do 3TC, porque os vírus com a mutação **M184V** replicam menos que os vírus selvagens, além do fato de que essa mutação aumenta a sensibilidade a ZDV, d4T, e ao TDF (Larder 1995; Nijhuis, Schuurman et al. 1997; Campbell and Katzenstein 2005). Entretanto, o benefício da manutenção do uso contínuo do 3TC será menor do que o benefício do seu uso em pacientes com vírus selvagem.

A mutação **K65R** reduz a sensibilidade ao 3TC em 15 vezes (Rhee, Taylor et al. 2006). Esse nível de resistência parece ser insuficiente para interferir completamente com a atividade do 3TC *in vivo*, porque quase todas as falhas virológicas em pacientes recebendo essa droga ocorrem com vírus contendo a mutação **M184V**, mesmo se a mutação **K65R** já estiver presente. A mutação **K65N** é uma mutação rara que tem efeito na sensibilidade aos ITRN semelhante a mutação **K65R** (Margot, Lu et al. 2006; Ross, Parkin et al. 2006).

O Complexo **Q151M** tem pouco efeito na sensibilidade ao 3TC. Entretanto, a combinação da mutação **Q151M** com as mutações **V75I**, **F77L**, e **F116Y** reduzem a sensibilidade ao 3TC em 10 vezes (Shafer and Merigan 1995).

A presença de 04 ou mais TAMs (**M41L**, **D67N/E/G**, **L210W**, **T215F/Y**, e **K219E/Q/N/R**) está geralmente associada a uma redução de sensibilidade ao 3TC em 05 vezes. O significado clínico dessa redução, entretanto, não é conhecido. As mutações **M41L**, **L210W**, e **T215Y** parecem ter o maior impacto na sensibilidade ao 3TC.

A inserção na posição **69** ocorre em ~1% dos pacientes tratados, quase sempre em combinação com múltiplas TAMs. Essa combinação leva a um nível intermediário de resistência ao 3TC (redução da sensibilidade em mais de 20 vezes).

A mutação **E44D** e **V118I** são mutações acessórias que habitualmente ocorrem com múltiplas TAMs. Elas contribuem com algum grau de resistência a cada um dos ITRN, incluindo 3TC e FTC (Lin, Gonzalez et al. 1999; Hertogs, Bloor et al. 2000; Delaugerre, Mouroux et al. 2001; Montes and Segondy 2002; Romano,

Venturi et al. 2002; Romano, Venturi et al. 2002; Girouard, Diallo et al. 2003; Gianotti, Galli et al. 2006).

A região do Terminal-C da Transcriptase Reversa (RT) inclui o domínio de “conexão” (289-423) e o domínio da Ribonuclease H (Rnase H) (424-560). A atividade da RNase H é requerida para clivar parte do RNA dos intermediários de replicação do RNA/DNA. Polimorfismos na posição **G333D/E** têm sido associados à resistência dupla ao **AZT e 3TC** (Miller, Sturmer et al. 1998; Gallego, Corral et al. 2002), enquanto que na posição **Y318F** têm sido associados a diminuição da sensibilidade aos ITRNN (Harrigan, Salim et al. 2002). Mais recentemente, Nikolenko e colaboradores mostraram que mutações no domínio do Terminal – C da RT podem aumentar, marcadamente o nível de resistência ao **AZT**, uma vez que essas substituições de aminoácidos estejam combinadas com TAMs clássicas (Nikolenko, Delviks-Frankenberry et al. 2007).

As mutações **E312Q, G335C/D, N348I, A360I/V, V365I, e A376S** no domínio de conexão da RT do HIV-1 estão associados a aumento na resistência ao AZT, e essas mutações foram identificadas em amostras de pacientes portadores de infecção pelo HIV-1 (Nikolenko, Delviks-Frankenberry et al. 2007). Em contraste, mutações na RNase H que são vistas na prática clínica não parecem contribuir para resistência ao **AZT** (Nikolenko, Delviks-Frankenberry et al. 2007; Ntemgwa, Wainberg et al. 2007).

Evidências independentes do papel das mutações no domínio da conexão e da Rnase H na resistência ao **AZT** derivaram de experimentos *in vitro* (Brehm, Koontz et al. 2007). Os autores reportaram o aparecimento da mutação **A371V** no domínio da conexão e da mutação **Q509L** no domínio da RNase sob pressão seletiva do **AZT**. Ambas as mutações, junto com TAMs, aumentam a resistência ao **AZT** e também causaram aumento na resistência cruzada ao 3TC e Abacavir. Apesar desses avanços na caracterização da região do terminal-C da RT do HIV-1 e o seu envolvimento na indução de resistência aos ITRN, a relevância clínica das mutações do domínio da conexão e da Rnase H ainda se mantêm elusivos (Cane, Green et al. 2007; Roquebert, Wirlden et al. 2007).

Soo-Huey Yap e colaboradores reportaram uma caracterização clínica e bioquímica da mutação **N348I** no domínio da conexão (Yap, Sheen et al. 2007), que se mostrou uma mutação bastante interessante por diversas maneiras. Os autores coletaram amostras no British Columbia Center, Vancouver, Canada, e compararam a sequência de indivíduos com história de tratamento prévio ( $n = 1,009$ ) com amostras de pacientes virgens de terapia anti-retroviral ( $n = 368$ ), observando que a mutação **N348I** estava altamente associada à mutação **M184V** e várias outras TAMs; entretanto, as análises das amostras de 31 pacientes que não tinham mutação na visita inicial nem história de tratamento prévio sugerem que essa mutação apareça precocemente, logo após o início da terapia anti-retroviral. Observou-se ainda que o tratamento com **AZT** e o tratamento combinado com **AZT** e o ITRNN Nevirapina (**NVP**) estava associado com aumento na detecção da mutação **N348I**. Posteriormente, outros autores reportaram que o aparecimento da mutação **N348I** estava associado com um aumento significativo na carga viral, que era comparável com o que ocorria com cada uma das TAMs clássicas individuais nas posições **219**, **215**, **210**, **70**, **67**, e **41**. Entretanto, os dados deixam claro que a mutação **N348I** não interage com os efeitos de resensibilização da mutação **M184V**, resultados consistentes com achados prévios (Nikolenko, Delviks-Frankenberry et al. 2007; Ntemgwa, Wainberg et al. 2007). A mutação **N348I** também conferiu resistência a **NVP**, e esse efeito foi ampliado com a existência de um background da mutação **K103N**. Com a exceção de raras mutações que causam déficit no “fitness” viral, e talvez os efeitos de mudanças na posição **181** na Estavudina, esse é o primeiro exemplo de resistência dupla a **ITRN** e **ITRNN**.

### **2.7.3 Mutações para os Inibidores de Transcriptase Reversa Não Análogo aos Nucleosídeos**

Mutações principais nas posições **103**, **181**, **190**, **188**, e **106** são comuns em pacientes com falência virológica quando em uso de esquema contendo ITRNN, ou profilaxia com dose única de Nevirapina (Eshleman, Mracna et al. 2001; Grossman, Paxinos et al. 2004; Jourdain, Ngo-Giang-Huong et al. 2004; Kantor, Katzenstein et al. 2005; Deshpande, Jauvin et al. 2007; Kassaye, Lee et al. 2007; Seoighe, Ketwaroo et al. 2007).

As mutações **K103N**, **Y181C**, **G190A/S**, **Y188L**, e **V106A/M** reduzem a sensibilidade a NVP em 50 vezes, com a redução na sensibilidade dependente da ação sinérgica de polimorfismos (Rhee, Taylor et al. 2006; Ceccherini-Silberstein, Cozzi-Lepri et al. 2007; Ceccherini-Silberstein, Svicher et al. 2007). As TAMs aumentam a sensibilidade aos ITRNN, mas é provável que não restabeleçam a eficácia virológica na presença de mutações de resistência aos ITRNN (Tozzi, Zaccarelli et al. 2004).

Mutações nos códons **A98G**, **V108I** e **V179D/E** são mutações comuns de resistência para os ITRNN que reduzem a sensibilidade a Nevirapina e ao Efavirenz entre duas a cinco vezes (Rhee, Gonzales et al. 2003). Entretanto, a mutação **V179D**, e raramente a mutação **A98G** e **V108I**, são observadas em pacientes que nunca tenham sido tratados com ITRNN (Shafer, Rhee et al. 2007).

A mutação **K103R** é um polimorfismo que não é selecionado pelos ITRNN; mas quando presente com a mutação **V179D** determina redução na sensibilidade à NVP de 15 vezes (Parkin, Gupta et al. 2006). As mutações **K103S/T/H** são mutações raras que também causam alto nível de resistência à NVP (Harrigan, Hogg et al. 2005). As mutações **Y181I/V** e **G190E/Q/C/T** são mutações raras que também causam alto nível de resistência à NVP. A mutação **Y188H/C** ocorre menos comumente que a mutação **Y188L** e reduz a sensibilidade à NVP de 10 a 15 vezes, enquanto a mutação **V106A** reduz a sensibilidade à NVP em mais de 50 vezes.

A mutação **V106M** ocorre comumente em portadores de vírus do subtipo C que estejam recebendo NVP, e causa alto nível de resistência à NVP (Loomba, Brenner et al. 2002; Brenner, Turner et al. 2003; Grossman, Paxinos et al. 2004).

As mutações acessórias **L100I**, **K101P**, **P225H**, e **K238T/N** geralmente ocorrem em combinação com a mutação **K103N**, e juntas reduzem a sensibilidade à NVP em mais de 100 vezes (Pelemans, Esnouf et al. 1998; Bacheler, Jeffrey et al. 2001; Parkin, Gupta et al. 2006; Rhee, Taylor et al. 2006).

A mutação **K101E** reduz a sensibilidade à NVP entre 5 - 10 vezes (Rhee, Taylor et al. 2006), enquanto a mutação **F227L** geralmente ocorre com a mutação **V106A**, e sinérgicamente reduz a sensibilidade a NVP (Balzarini, Pelemans et al.

1998). A mutação **M230L** geralmente ocorre com outras mutações de resistência aos ITRNN; mas sozinha é capaz de reduzir a sensibilidade à NVP em 40 vezes. As mutações **A98G**, **V108I**, e **V179D/E**, cada uma isoladamente, é capaz de reduzir em duas vezes a sensibilidade à NVP. A mutação **V179D** ocorre em 1% - 2% das pessoas não tratadas.

As mutações **A98G e V108I** ocorrem em 0.5% dos indivíduos virgens para os ITRNN. Entretanto, o significado clínico dessas mutações na resposta aos regimes de HAART contendo NVP, ainda não é conhecido. A mutação **N348I** é uma mutação reportada recentemente que, aparentemente, parece ser selecionada tanto pela ZDV como pela NVP, e reduz a sensibilidade da NVP e DLV entre 5 e 20 vezes (Hachiya, Sriwiriyanont et al. 2007; Yap, Sheen et al. 2007).

A mutação **E138K** é uma mutação rara selecionada in vitro pela Etravirina, e que pode causar resistência de à NVP (Brillant 2004; Sun, Wang et al. 2007). A mutação **V179F** ocorre quase que exclusivamente em combinação com a mutação **Y181C** e pode causar alto nível de resistência a NVP e Delavirdina, assim como à Etravirina (Rhee, Gonzales et al. 2003; Vingerhoets, Azijn et al. 2005). A mutação **F227C** é uma mutação rara associada à ETR, que aparentemente parece reduzir a sensibilidade à NVP e EFV (Andries, Azijn et al. 2004; Vingerhoets, Azijn et al. 2005).

Várias mutações altamente polimórficas para a Transcriptase Reversa, tais como as mutações **K101Q**, **I135T/M**, **V179I** e **L283I**, reduzem a sensibilidade a Nevirapina e ao Efavirenz em duas vezes e podem atuar sinergisticamente com mutações de resistência primária aos ITRNN (Brown, Czapiga et al. 2007; Ceccherini-Silberstein, Cozzi-Lepri et al. 2007; Ceccherini-Silberstein, Svicher et al. 2007). Outras mutações, tais como **L74V**, **H221Y**, **K223E/Q**, **L228H/R** e **N348I** são selecionadas primariamente por ITRN, mas podem reduzir a sensibilidade aos ITRNN (Kleim, Rosner et al. 1996; Rhee, Fessel et al. 2005; Koval, Dykes et al. 2006; Ceccherini-Silberstein, Cozzi-Lepri et al. 2007; Ceccherini-Silberstein, Svicher et al. 2007; Dykes and Demeter 2007; Yap, Sheen et al. 2007).

## 2.8 BARREIRA GENÉTICA PARA RESISTÊNCIA AOS ANTI-RETROVIRAIS

A barreira genética para resistência aos anti-retrovirais representa a distância genética necessária para que se obtenha o desenvolvimento de uma resistência completa a um anti-retroviral. Podemos dividir a barreira genética em três grupos: um que leva em consideração o número de mutações necessárias para o decréscimo do efeito anti-retroviral e que tem relação fundamental com os inibidores de protease; o segundo grupo, que leva em conta a rapidez com que uma mutação é selecionada e tem mais relação com os inibidores de transcriptase reversa; e um terceiro grupo, que leva em consideração o perfil de mutações necessárias para resistência a um esquema anti-retroviral. Enquanto a capacidade de supressão a níveis indetectáveis tem relação com a potência da droga ou do esquema anti-retroviral, a durabilidade do tratamento tem relação com a barreira genética.

### 2.8.1 Barreira genética e número de mutações

Normalmente os inibidores de transcriptase reversa apresentam menor barreira genética relacionada ao número de mutações para que haja resistência, e uma única mutação pode causar um impacto considerável na suscetibilidade à droga em questão. Por sua vez, os inibidores de protease necessitam de um número maior de mutações para que a resistência seja completa. Quando usados sem o incremento do ritonavir, são necessárias pelo menos três mutações, das quais pelo menos uma deve ser a principal, ou mais de 4 mutações na ausência de mutações principais. Quando usados com baixas doses de ritonavir, os inibidores de protease necessitariam de um número maior de mutações, que variariam entre seis a dez, para que haja resistência completa devido aos altos níveis séricos basais alcançados por estas combinações.

### 2.8.2 Barreira genética e facilidade na seleção de mutações

Normalmente são necessárias poucas mutações para que haja resistência aos ITRN, sendo que na maior parte das vezes uma única mutação já pode ser suficiente. Algumas mutações são selecionadas com muita facilidade e rapidez por certas drogas, como a mutação **M184V** pelo **3TC**. Da mesma forma, mutações

selecionadas pela Nevirapina podem emergir com facilidade. Já drogas como ddl, por exemplo, necessitam também de uma única mutação, mas estas são selecionadas a partir de um período de tempo bem superior de exposição a esta droga (mutações específicas como as dos **códons 65, 69 e 74**). O quadro 2 resume este tipo de barreira genética e os diversos ITRN e ITRNN. Uma única mutação pode ser suficiente para proporcionar resistência completa, mas a chance de seleção entre as mutações varia de droga a droga (Diaz 2006).

Alta	Intermediária	Baixa
ddl	AZT	3TC
TDF	d4T	nevirapina
-	abacavir	-
-	efavirenz	-

**Quadro 2** - Barreira genética e facilidade com que a mutação é selecionada (Diaz 2006).

### 2.8.3 Barreira genética e associação de anti-retrovirais

Enquanto a potência de um anti-retroviral tem relação com a amplitude de queda da carga viral proporcionado por esta droga em monoterapia, a durabilidade de um esquema combinado tem relação com a barreira genética que o medicamento proporciona quando parte de um esquema combinado. Em um estudo piloto em que se tratou 36 pacientes virgens de tratamento com a associação de Abacavir, Tenofovir e 3TC por 24 semanas foram detectadas 12 falhas virológicas que ocorreram precocemente, e os 12 pacientes apresentavam a mutação **M184V**, enquanto 11 destes tinham também a mutação **K65R**. A mutação **M184V** leva à resistência a 3TC, a **K65R** provoca a resistência ao tenofovir e a associação de ambas leva à resistência ao Abacavir. Portanto, são necessárias somente duas mutações para que se obtenha resistência completa a um esquema como este, inferindo uma baixa barreira genética (Landman, Descamps et al. 2005). O mesmo, possivelmente, ocorre em esquemas que utilizam a combinação de **AZT, 3TC e Abacavir**, em que somente duas mutações são suficientes para comprometer seriamente a eficácia do esquema (códons **215 e 184**).

## 2.9 ADESÃO AO TRATAMENTO E RESISTÊNCIA ANTI-RETROVIRAL

Uma das limitações dos estudos envolvendo HAART diz respeito à adesão ao tratamento. A princípio, o grau de adesão interfere no desfecho clínico, mas essa informação geralmente não é obtida de modo sistemático na maioria dos estudos de coorte, embora, de certa maneira seu impacto possa ser mensurado indiretamente através das avaliações de carga viral (Park-Wyllie, Scalera et al. 2002).

Alguns autores sugerem que a adesão a um tratamento de longo prazo, de modo geral, não ultrapassa os 50% após um ano de uso de medicação e tende a diminuir à medida que a terapia se torna mais complexa (Wright and Mackereth 1993; Steinbrook 1997).

De indiscutível importância para o sucesso do tratamento, a adesão à terapia tornou-se um dos grandes desafios para as equipes de saúde envolvidas no atendimento de pacientes com infecção pelo HIV, incluindo a necessidade de participação multiprofissional, além do esforço do próprio paciente. A principal dificuldade é o estabelecimento de métodos adequados e fidedignos para medir a adesão e, mais que isso, soluções individuais para manter o paciente confiante e participante indefinidamente. A importância da adesão em termos de manutenção da resposta viral foi avaliada por Paterson e colaboradores (Paterson, Swindells et al. 2000), na Pensilvânia, EUA, utilizando meios eletrônicos. Neste estudo, os frascos dos medicamentos (IP) eram dotados de dispositivo eletrônico que registrava a abertura de suas tampas. Os autores encontraram relação direta entre adesão e carga viral plasmática sustentada abaixo de 400 cópias/mL. Após três meses de acompanhamento, 81% dos pacientes com adesão maior que 95%, apresentavam carga viral abaixo do limite de detecção, comparados a percentuais progressivamente menores, alcançando 6% para aqueles com adesão menor que 70%. Foram feitas avaliações individuais por cada paciente e pelo médico, e a adesão não diferiu significativamente do registro eletrônico. A adesão às combinações contendo somente um IP foi mais favorável que para as combinações contendo dois IP (91% vs. 74%, respectivamente) e a diferença entre combinações de duas vs. três doses diárias não foi significativa.

Contrariamente, Melbourn e colaboradores (Melbourne, Geletko et al. 1999), nos EUA, utilizando dois métodos para medir adesão, o relato dos pacientes e a mensuração eletrônica, calculando os percentuais de doses tomadas em relação às doses prescritas, encontraram diferenças entre os dois métodos e concluíram que os pacientes tendiam a esquecer suas falhas de tomada das medicações e acabavam não informando as perdas de doses.

Park-Wyllie e colaboradores (Park-Wyllie, Scalera et al. 2002) em revisão da literatura analisaram dez estudos identificados entre 1996 e 1999 e concluíram que existe uma necessidade de concentrar esforços no apoio ao uso da medicação, especialmente em relação aos efeitos adversos logo após o início do tratamento.

Mais recentemente Lewis e colaboradores (Lewis, Colbert et al. 2006), avaliaram o comportamento de pessoas que tinham 100% de adesão ao tratamento baseada nos dados dos últimos 30 dias, selecionando aleatoriamente participantes de um estudo que utilizava o sistema de monitoramento eletrônico de doses (*eletronic event monitoring* - EEM). Este estudo tinha previsto de 12 semanas de duração e a intervenção de adesão era realizada através de telefonemas. As análises mostraram que o sucesso em “lidar” com a medicação é o ponto principal, tendo sido identificados como importantes os seguintes pontos: o esquema ou combinação de AR, os próprios pacientes e o ambiente. Adotando expectativas realistas e atitudes pragmáticas, a adesão é estimulada quando a medicação é encarada como prioridade, quando o paciente acredita na eficácia de sua medicação e quando existe uma relação médico-paciente sólida.

Falhas no uso adequado do AR permitem que a replicação viral ocorra na presença de níveis séricos aquém do ideal dos medicamentos, favorecendo a seleção de vírus resistente. No entanto, aparentemente a relação entre adesão e resistência viral é mais complexa do que se supunha.

Diferentes estudos vêm sendo realizados na tentativa de definir qual seria o grau de adesão ideal para evitar resistência e quais os perfis de resistência entre as diferentes classes de AR disponíveis.

Dados de coortes com mensurações da adesão consideradas adequadas demonstraram a ocorrência de resistência tanto aos IP quanto aos ITRN entre pacientes com elevado grau de adesão ao tratamento (Bangsberg, Charlebois et al. 2003). Em estudos transversos, de Walsh e colaboradores (Walsh and Sherr 2002) na Inglaterra, e de Howard e colaboradores (Howard, Arnsten et al. 2002) na Suécia, demonstraram uma relação linear entre a adesão e o número de mutações de resistência viral. Gallego e colaboradores (Gallego, Ruiz et al. 2001), na Espanha, identificaram que a resistência aos IP foi limitada para os pacientes com adesão maior que 90%.

Estudos longitudinais extensos medindo adesão e resistência confirmaram os achados dos estudos transversos iniciais e concluíram que a adesão constituiria um indicador independente de acúmulo de mutações de resistência entre os pacientes com viremia persistentemente detectável (Bangsberg, Charlebois et al. 2003; Miller, Liu et al. 2003). No estudo de Bangsberg e colaboradores (Bangsberg, Charlebois et al. 2003), conduzido na Califórnia, foi encontrada uma associação significativa entre a adesão e o maior tempo em tratamento ( $p < 0,0001$ ) e supressão viral ( $p < 0,0001$ ). Analisando o subgrupo de pacientes que apresentava carga viral  $> 50$  cópias/mL, o acúmulo de mutações esteve positivamente associado à duração do tratamento anterior ( $p = 0,03$ ) e à adesão ( $p = 0,002$ ). Quando todos os pacientes foram incluídos, inclusive aqueles com viremia indetectável, foi estimado que 23% de todas as mutações de resistência aconteceram em pacientes com adesão de 92% a 100% e cerca de 50% de todas as mutações ocorreram na faixa de adesão de 79% a 100%. Posteriormente, um modelo matemático baseado nesses dados estimou que a população na qual a resistência acontece mais freqüentemente é aquela com adesão em torno de 81% (Bangsberg, Porco et al. 2004).

A média dos níveis de adesão na maioria desses estudos iniciais ficava em torno de 70%, e a maioria das coortes avaliadas nestes estudos tinha exposição prévia a monoterapia e utilizou esquemas anti-retrovirais de menor potência e menor barreira genética à resistência, tais como associação de dois ITRN e um IP simples. Desta forma, mesmo um elevado grau de adesão não seria suficiente para evitar a emergência de resistência viral. Atualmente com a disponibilização de esquemas mais potentes incluindo dois ITRN mais um ITRNN e/ou um IP com *booster* de RTV,

estima-se que qualquer esquema que permita supressão durável com níveis de carga viral < 50 cópias/mL e adesão maior que 95% terá 45% menos resistência quando comparado aos esquemas historicamente utilizados. Essa estimativa se baseia nos achados do uso de esquemas de primeira linha contendo EFV ou LPV/r, sendo que quanto maior a supressão viral, menor a chance de resistência entre pacientes altamente aderentes (Bangsberg, Porco et al. 2004).

Dados mais recentes sugerem que as diferentes classes de AR têm padrões de relação entre adesão e resistência diferentes. Desta forma, a escolha entre elas torna-se mais complicada, tendendo a favor dos IP. O exemplo clássico desse maior risco no caso dos ITRNN é a frequência de mutações de resistência encontrada entre as mulheres que utilizaram NVP em dose única, ou combinada por curtos períodos, durante a gestação, demonstrada nos estudos clínicos de prevenção da transmissão materno infantil do HIV (Jackson, Becker-Pergola et al. 2000). Parienti e colaboradores (Parienti, Massari et al. 2004) encontraram resistência aos ITRNN associada a interrupções da terapia. Sethi e colaboradores (Sethi, Celentano et al. 2003) encontraram resistência entre a maioria dos pacientes tratados com ITRNN associada a baixos níveis de adesão, quando comparados aos pacientes tratados com IP (Parienti, Massari et al. 2004).

Permanece como uma questão o porquê da diferença entre as classes de AR no que tange a relação entre adesão e resistência. Dados *in vivo* e dados teóricos sugerem que os ITRNN (em especial o EFV) possuem várias características que podem resultar num perfil desfavorável entre adesão e resistência. São medicamentos muito potentes, exercendo forte pressão seletiva sobre o vírus, atuam num local distante do sítio ativo de sua enzima-alvo, a mutação principal que confere resistência não afeta o “*fitness*” ou capacidade de replicação do vírus e por fim, possuem meia-vida plasmática muito longa que permite a persistência de níveis insuficientes para supressão viral nos casos de perdas de doses, favorecendo a replicação viral, que acaba acontecendo com mutação. A ocorrência de mutação nessa classe confere resistência cruzada a todos os outros ITRNN disponíveis até o momento. Além disso, as mutações de resistência tendem a permanecer indefinidamente após a suspensão da medicação e, mesmo quando não identificadas nos testes de resistência, podem reemergir sempre que houver

reexposição a essa classe. Contrariamente, muitos desses fatores citados não acontecem para os IP reforçados com RTV, para os quais são necessárias várias mutações de resistência para reduzir sua eficácia. Ademais, como a meia-vida dessa classe é curta, a permanência de níveis aquém do ideal que propiciariam chance de replicação viral também é menor durante os períodos de não-adesão. Isso explica porque as mutações de resistência aos IP potencializados são menos frequentes na falha viral detectada precocemente. Sugere-se ainda que nesses casos, algumas dessas variantes mutantes teriam menor capacidade de replicação. Em resumo, para IP não reforçado com RTV a maioria das mutações surge nos pacientes que tomam a maioria das doses prescritas com maior incidência nas faixas de adesão de 70-80%. Para IP reforçado com RTV o surgimento de resistência é limitado independentemente do nível de adesão e, para os ITRNN a resistência é rara entre aqueles altamente aderentes, mas muito comum se os níveis de adesão implicarem supressão viral apenas parcial (Bangsberg, Porco et al. 2004).

Recentemente, estudo realizado em São Paulo por Vaz *et al.* que tinha por objetivo avaliar a influencia da gravidez no nível de adesão às drogas anti-retrovirais numa coorte prospectiva composta por 72 gestantes portadoras da infecção pelo HIV grávidas e 79 mulheres portadoras de HIV não grávidas. Na análise multivariada, idade > 29 anos (OR: 3, 58, CI 95% 0.10 – 0.75, p=0.011), número médio de pílulas/dia <6 (OR: 2,53, CI 95% 1.07 - 6,01, p=0.035) e estar grávida (OR: 3.33, CI 95% 1.36 - 8.13, p=0.008) estavam independentemente associados com maior adesão aos anti-retrovirais (Vaz, Barros et al. 2007).

## 2.10 DISTRIBUIÇÃO DOS SUBTIPOS DO HIV-1 NO MUNDO

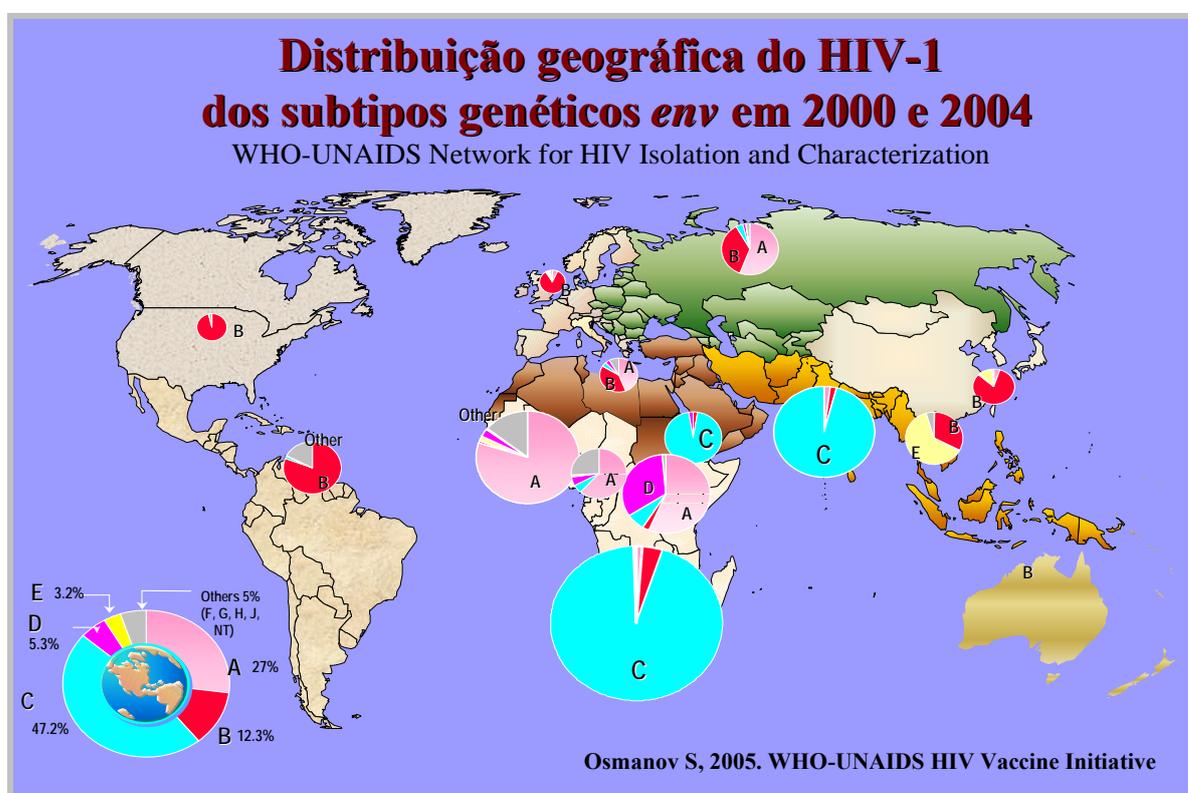
Os estudos sobre a epidemiologia molecular do HIV são fundamentais para a compreensão da dinâmica da epidemia, com implicações no melhor entendimento da sua transmissibilidade, progressão clínica, resposta ao tratamento anti-retroviral e das próprias circunstâncias que envolveram o início da pandemia.

O HIV é subdividido geneticamente em dois tipos: HIV do tipo 1 e do tipo 2. o HIV-1, o mais prevalente no mundo, é subdividido em 3 grupos: M (main), O (outlier)

e N (new). O grupo M é o mais prevalente e subdividido em subtipos denominados A, B, C, D, F1, F2, G, H, J, K e formas recombinantes circulantes (CRFs) que são híbridos entre subtipos diferentes. Todos estes vírus encontram-se na África, que é o berço da pandemia, mas o que circula quase com exclusividade na América do Norte e Europa Ocidental é o vírus do subtipo B.

O grupo M do HIV-1 é prevalente em todo o mundo e agrupa a maioria dos vírus responsáveis pela pandemia de AIDS (Figura 5). Os grupos N e O são geograficamente restritos a países da África Ocidental e Central (Yamaguchi, Bodelle et al. 2003). Atualmente, todos os tipos, grupos, subtipos e boa parte das CRFs do HIV são encontrados na África (Osmanov, Pattou et al. 2002).

Os subtipos e as formas recombinantes do HIV-1 estão distribuídos a nível mundial mostrando faixas de ocorrência definidas (Figura 5). 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).



**Figura 5** - Distribuição dos subtipos no mundo. Fonte: retirado e adaptado do site da Rede de Isolamento e Caracterização do HIV; WHO-UNAIDS.

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, Pattou et al. 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, Pattou et al. 2002). O subtipo A predomina na África Central e tem apresentado um papel crescente também na epidemia Russa (Bobkov, Kazennova et al. 2004). Os subtipos B e D são os mais próximos do ponto de vista filogenético e provavelmente derivam de um ancestral comum (Robertson, Hahn et al. 1995; Robertson, Sharp et al. 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, Silva-de-Jesus et al. 2005). O subtipo F está presente no Brasil (Morgado, Sabino et al. 1994; Morgado, Guimaraes et al. 1998; Morgado, Guimaraes et al. 1998), Argentina (Campodonico, Janssens et al. 1996), Romênia (Apetrei, Buzdugan et al. 1994), Bolívia (Velarde-Dunois, Guimaraes et al. 2000) e Venezuela (Castro, Echeverria et al. 2003).

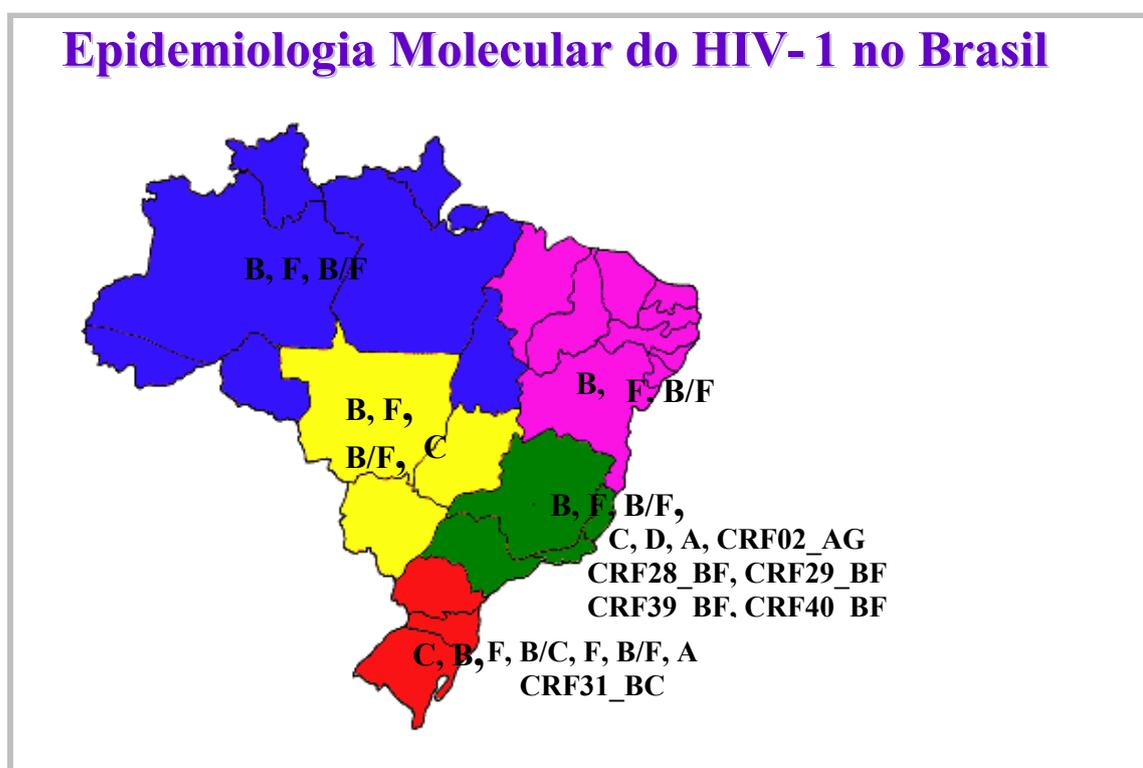
A presença dos subtipos G e H foi documentada no Gabão, Rússia e Uganda (Janssens, Buve et al. 1997), enquanto que o subtipo J foi encontrado somente na África Central e o subtipo K na República Democrática do Congo e República dos Camarões (Korber, Allen et al. 1995; Korber, Learn et al. 1995).

Em muitos países europeus, da América do Sul, América do Norte e Austrália observa-se amplo predomínio do subtipo B (figura 5).

Na França, por exemplo, apesar a ocorrência de múltiplos subtipos, apenas uma minoria de casos é atribuída a subtipos não-B (Couturier, Damond et al. 2000). Aproximadamente, 12% da pandemia global do HIV correspondem ao subtipo B (Osmanov, Pattou et al. 2002).

### 2.10.1 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 (Galvao-Castro, Ivo-Dos-Santos et al. 1987). A distribuição dos subtipos de HIV no Brasil (Figura 6) 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 mostrem a presença dos subtipos C, principalmente no Sul do país (Bongertz, Costa et al. 1998; Stefani, Pereira et al. 2000), subtipo F (Morgado, Sabino et al. 1994; Couto-Fernandez, Morgado et al. 1999; Stefani, Pereira et al. 2000; Vicente, Otsuki et al. 2000), subtipo D (Morgado, Guimaraes et al. 1998; Couto-Fernandez, Eyer-Silva et al. 2006), subtipo A (Caride, Brindeiro et al. 2000), além de genomas recombinantes B/F (Sabino, Shpaer et al. 1994; Couto-Fernandez, Silva-de-Jesus et al. 2005) e B/C (Cornelissen, Kampinga et al. 1996; Guimaraes, dos Santos Moreira et al. 2002; Guimaraes, Eyer-Silva et al. 2008).



**Figura 6:** Distribuição dos subtipos no Brasil. Fonte: Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 2002; adaptado 2008.

Couto-Fernandez e colaboradores descreveram a primeira forma recombinante africana CRF2\_AG no Rio de Janeiro (Couto-Fernandez, Silva-de-Jesus et al. 2005). As CRFs são vírus recombinantes que se fixaram e se

expandiram em uma determinada área geográfica, o que impõe mais complexidade à epidemia. As duas CRFs descritas no mundo são recombinantes entre os subtipos B e F brasileiros: as CRFs 28 e 29 (De Sa Filho, Sucupira et al. 2006), e mais recentemente foi reportado a presença de duas novas CRF\_BF no Rio de Janeiro; denominadas CRF\_BF39 e CRF\_BF40 (Guimaraes, Eyer-Silva et al. 2008).

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, Kalish et al. 1993; Morgado, Sabino et al. 1994; Covas, Biscaro et al. 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 (1994). Posteriormente, estudos com amostras de Porto Alegre, obtidas em 1998 (Guimaraes, dos Santos Moreira et al. 2002) e do Rio Grande (de Martinez, Barbosa et al. 2002) já evidenciaram uma proporção importante deste subtipo (30%) nas amostras no sul do país. Brindeiro e colaboradores, 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, Diaz et al. 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, Santos et al. 2003; Soares, De Oliveira et al. 2003).

### **2.10.2 Subtipos virais e transmissão vertical do HIV**

Estudos recentes mostraram variações entre subtipos nas taxas de transmissão vertical e 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, Li et al. 2003), e o subtipo C é mais facilmente transmitido do que os subtipos D e A (Renjifo, Chung et al. 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, Wike et al. 1992). No entanto, o papel da variabilidade genética do HIV-1 na transmissão vertical não foi ainda esclarecido.

### 2.10.3 Resistência Viral e Subtipos genéticos do HIV-1

Entre pacientes infectados com vírus subtipo B e, provavelmente, também, entre aqueles infectados por subtipos não-B, (Weidle, Downing et al. 2003), o aparecimento da mutação **K103N** com tratamento prolongado não supressivo com NVP está associado à resistência cruzada a toda a classe de Inibidores da Transcriptase Reversa Não Nucleosídeos (ITRNN) e ao risco de falência de tratamentos futuros com regimes anti-retrovirais que contenham ITRNN, como, por exemplo, os que contêm Efavirenz.

Embora os dados sejam limitados, alguns estudos sugerem que a sensibilidade natural do HIV-1 às drogas anti-retrovirais pode ser influenciada pelo subtipo viral (Apetrei, Descamps et al. 1998; Descamps, Apetrei et al. 1998), e polimorfismos associados com resistência às drogas são freqüentemente detectados em indivíduos virgens de drogas anti-retrovirais (**ARV**) com infecção por subtipos não-B (Pieniazek, Rayfield et al. 2000).

No ensaio clínico HIVNET 012, conduzido na Uganda, a prevalência de resistência após profilaxia com dose única de **Nevirapina** foi diferente para mulheres infectadas com o subtipo A, comparadas às infectadas com o subtipo D (Eshleman, Becker-Pergola et al. 2001). Isso sugere que a freqüência de resistência secundária à exposição a drogas anti-retrovirais pode variar de região para região, dependendo, entre outros fatores, da distribuição de subtipos do HIV-1.

É possível que haja um desempenho diferente de drogas que são inicialmente testadas em vírus e pacientes dos Estados Unidos e da Europa Ocidental, e temos visto como os polimorfismos naturais dos vírus do subtipo não-B podem alterar a suscetibilidade às drogas. Um dos exemplos é a possibilidade de rápida resistência a ITRNN pelos vírus do subtipo C por causa da seleção da mutação **V106M** (Brenner, Turner et al. 2003). Normalmente, nos vírus do subtipo B, a mutação de resistência relacionada ao **códon 106** é a **V106A** (substituição de GTG por GCA) ou **V106I** (GTG por ATT, ATC ou ATA), que não emerge com facilidade. A mutação **V106M** (substituição de GTG por ATG) ocorre rapidamente nos vírus do subtipo C, levando a alto nível de resistência. (Loemba, Brenner et al. 2002).

A prevalência das TAMs parece ser diferente entre os subtipos B e não-B. De modo geral, as mutações selecionadas nos **códons 41, 210 e 215** são mais freqüentes nos vírus do subtipo B, enquanto as mutações no **códon 67** são mais freqüentes nos subtipos não-B (Maggiolo, Ripamonti et al. 2004).

Com relação ao desempenho do tratamento, sabe-se que o HIV-2 não apresenta suscetibilidade a ITRNN e tem suscetibilidade diminuída a **AZT** (Witvrouw, Pannecouque et al. 2004).

Outro aspecto peculiar relaciona-se a um polimorfismo natural em vírus do subtipo F, o **L89M**, que leva a uma diminuição de suscetibilidade à maior parte dos inibidores de protease, especialmente ao *Indinavir*, *Nelfinavir*, *Ritonavir* e *Amprenavir* (Calazans, Brindeiro et al. 2005).

Especula-se que essa alteração nos vírus do subtipo F teria um impacto semelhante à mutação **L90M** na protease dos vírus do subtipo B. De fato, uma análise retrospectiva mostra que a falha anti-retroviral em pacientes tratados com **AZT**, **3TC** e *Indinavir* é maior em pacientes infectados pelos vírus do subtipo F do que nos infectados pelos vírus do subtipo B (Accetturi, Pardini et al. 2000). O polimorfismo **I93L**, presente nos vírus do subtipo C da protease leva a hipersensibilidade ao *Lopinavir* (Gonzales, Belitskaya et al. 2003).

## 2.11 TESTES DE GENOTIPAGEM

Os testes genotípicos determinam a sequência genômica da região que codifica a transcriptase reversa e a protease do HIV-1. Dentre as abordagens existentes temos a reação em cadeia pela polimerase (PCR) seletiva, PCR com hibridização pelo uso de sondas (LIPA) e sequenciamento genômico. Os métodos que utilizam o seqüenciamento promovem uma avaliação mais ampla e específica. Dentre as metodologias temos o seqüenciamento manual clássico, o seqüenciamento automatizado (ABI, Pharmacia) e o seqüenciamento em microchip por hibridização (Affymetrix). Hoje, existem kits comerciais padronizados e licenciados pelo FDA, como os kits comercializados pela Bayer e pela Abbott. A sequência de nucleotídeos, após o seqüenciamento automatizado de DNA, é determinado e a tradução em aminoácidos se dá de forma que cada trinca de nucleotídeos codificará um aminoácido, e a interpretação disto vai gerar um laudo de genotipagem.

Várias técnicas foram desenvolvidas para a análise quantitativa da prevalência de variantes virais de baixa frequência em quasiespecies virais. Esses métodos incluem o Seqüenciamento Simples do Genoma (Método SGS) e o teste de resistência usando o Sistema Retrotransposon Ty-1 HIV RT e PCR-RT alelo específico. Essas técnicas foram utilizadas recentemente para avaliação de variantes virais menores em pacientes participando do estudo ACTG 398 (Hammer, Bassett et al. 2003),

Os testes laboratoriais que utilizam análise de ácidos nucléicos, como é o caso dos testes de genotipagem, são otimizados para os vírus que circulam no mundo desenvolvido, no caso os do subtipo B. Desta forma, o desempenho dos testes comerciais aqui no Brasil eventualmente pode ficar um pouco prejudicado, propiciando resultados falso-negativos.

## 2.12 INTERVENÇÕES PARA PREVENÇÃO DA TRANSMISSÃO VERTICAL E EMERGÊNCIA DE RESISTÊNCIA ANTI-RETROVIRAL

Desde o final de 1994, com a publicação dos resultados do protocolo 076 sabe-se que o uso da zidovudina (AZT) a partir da 14<sup>a</sup> semana de gestação, durante o trabalho de parto e pelo recém-nascido, nas primeiras seis horas de vida, e até a sexta semana de vida, pode reduzir em 67% o risco da criança nascer infectada (Connor, Sperling et al. 1994). Os resultados do ACTG 076 foram posteriormente validados para mulheres com comprometimento imunológico mais acentuado (Mofenson 1997).

Depois desse estudo, vários outros estudos realizados nos Estados Unidos, Europa, África e Ásia, confirmaram a eficácia da **zidovudina** na redução da transmissão vertical (Dickover, Garratty et al. 1996; Sperling, Shapiro et al. 1996; Newell, Gray et al. 1997; Dabis, Msellati et al. 1999; Shaffer, Chuachoowong et al. 1999; Wiktor, Ekpini et al. 1999), ainda que a intervenção com **zidovudina** se dê tardiamente na gestação, mesmo quando administrada apenas para o recém-nascido, até 48 horas após o nascimento (Wade, Birkhead et al. 1998).

A transmissão vertical também foi avaliada no âmbito da vigilância epidemiológica no Estado de Nova York, nas grávidas infectadas pelo HIV que receberam diferentes componentes do esquema completo com AZT. A transmissão foi menor (6,1%) no grupo que recebeu os três componentes do esquema (durante a gestação, intraparto e neonatal). A taxa de transmissão foi um pouco mais elevada (10%) quando somente os componentes intraparto e neonatal foram incluídos de fato na intervenção. No grupo que recebeu exclusivamente o componente AZT neonatal, as taxas de transmissão foram diferentes, de acordo com o momento de início do AZT solução oral para os recém natos: para aqueles que iniciaram o AZT após 48h de vida esta taxa foi de 18,4%. Nos casos em que o AZT não foi introduzido em momento algum, a taxa de transmissão observada foi de 26,6% (Wade, Birkhead et al. 1998).

Embora a terapia anti-retroviral hoje disponível tenha um importante impacto na mortalidade e morbidade por AIDS, o uso prolongado desses agentes anti-retrovirais está associado a toxicidades e ao desenvolvimento de mutações específicas do HIV-1, que levam à resistência viral a agentes anti-retrovirais (Mellors 1998; Colgrove and Japour 1999; Masquelier, Descamps et al. 1999). A transmissão vertical do HIV-1 de mulheres cronicamente infectadas para os seus bebês reflete a dinâmica de diversos fatores imunológicos e virológicos.

Uma variedade de regimes anti-retrovirais e estratégias terapêuticas foram estudadas em diferentes áreas geográficas, e virtualmente todos os estudos demonstraram redução da transmissão vertical de magnitude semelhante ou maior àquela observada no estudo PACTG 076 (Shaffer, Bulterys et al. 1999). No estudo ACTG 316, a Nevirapina foi administrada no início do trabalho de parto em adição ao esquema anti-retroviral utilizado pela gestante (mono, duplo ou triplo), não sendo demonstrado benefício em termos de redução da transmissão vertical. Além disso, verificou-se a emergência de mutações associadas à resistência aos ITRNN em 11% (5/46) das mães com viremia detectável > 400 cópias/mL. (Cunningham, Ank et al. 2001; Dorenbaum and Miserez 2001; 2003).

Posteriormente, o estudo HIVNET 012 demonstrou que uma dose única de Nevirapina administrada à mãe na hora do parto reduziu a transmissão vertical do HIV-1 em até 50% (Guay, Musoke et al. 1999; Jackson, Musoke et al. 2003). Essa estratégia tem a vantagem da potência, farmacocinética prolongada da Nevirapina e fácil administração de uma única dose, imediatamente antes do parto. Os estudos PACTG 316 e HIVNET 012 evidenciaram um risco de 16 a 20% de resistência à Nevirapina (NVP) entre as crianças nascidas de mães transmissoras (Jackson, Becker-Pergola et al. 2000; Cunningham, Wara et al. 2001; Cunningham, Ank et al. 2001; Dorenbaum and Miserez 2001; Eshleman, Mracna et al. 2001).

O sucesso na redução da transmissão perinatal do HIV ocorreu apesar de um aumento na prevalência de resistência às drogas antivirais em indivíduos multitratados, incluindo mulheres grávidas, e uma prevalência baixa, mas crescente, de resistência a drogas anti-retrovirais entre indivíduos virgens de tratamento anti-retroviral (Little, Holte et al. 2002; Susman 2002).

Sabe-se que a resistência à Zidovudina (ZDV) e à Nevirapina (NVP) pode aparecer quando essas drogas são usadas para profilaxia perinatal. Entretanto, não se sabe se o aparecimento de resistência comprometerá o tratamento subsequente da infecção pelo HIV-1 com regimes de combinação dessas drogas. A resistência é relativamente incomum após períodos breves de tratamento com monoterapia com ZDV. Entretanto, a resistência à Nevirapina é freqüentemente vista após dose única de natureza similar (profilaxia), desaparecendo as mutações no plasma alguns meses após o parto. Não se sabe se esta breve exposição à Nevirapina é suficiente para o estabelecimento de variantes resistentes (isto é, em reservatórios latentes ou como variantes menores no plasma) em níveis suficientes para comprometer tratamentos subsequentes com um regime contendo Inibidores de Transcriptase Não Nucleosídeos (ITRNN)

Dados de pacientes com experiência anterior por períodos mais longos de monoterapia com ZDV, para tratamento de infecção pelo HIV-1, sugerem que a taxa de resistência é baixa nos primeiros meses de exposição à droga (Richman, Grimes et al. 1990). Estudos de resistência em mulheres que participaram do ACTG 076 demonstraram que somente uma mulher tinha selecionado a mutação **K70R** no parto e nenhuma havia selecionado a mutação **T215Y/F** (Eastman, Shapiro et al. 1998). Entretanto, este estudo não analisou outras mutações de resistência ao AZT.

Análise de resistência em mulheres que receberam ZDV durante a gestação no Swiss Collaborative HIV and Pregnancy Study (Kully, Yerly et al. 1999) e no Women and Infant Transmission Study (WITS) apresentaram taxas maiores de resistência a ZDV (Welles, Pitt et al. 2000).

Períodos curtos de monoterapia com ZDV também foram utilizados nos países em desenvolvimento, como estratégia para prevenção da transmissão materno infantil do HIV-1. Em um estudo na Costa do Marfim em que a ZDV foi iniciada em mulheres com 36 semanas de gestação, virgens de tratamento para ZDV, não foi observada resistência ao AZT nas 20 mulheres que foram analisadas (Ekpini, Nkengasong et al. 2002).

Bauer e colaboradores (Bauer, Welles et al. 2003) pesquisaram resistência às drogas anti-retrovirais entre mulheres grávidas infectadas pelo HIV-1, incluídas no

Women and Infant Transmission Study – WITS, uma das coortes mais antigas de transmissão perinatal nos EUA. Os achados deste estudo parecem ter subestimado o risco de transmissão perinatal na presença de vírus materno com resistência fenotípica à Zidovudina, levando-se em conta estudo anterior da coorte WITS, que evidenciou risco de transmissão aumentado em mulheres com vírus com resistência genotípica à Zidovudina (Welles, Pitt et al. 2000).

O desenvolvimento de resistência viral de alto nível à Zidovudina requer múltiplas mutações no gen da transcriptase reversa, que geralmente aparecem antes de quatro meses de tratamento contínuo com a Zidovudina. Há casos documentados nos EUA de transmissão de vírus resistentes da mãe para o bebê (Frenkel, Wagner et al. 1995b; Frenkel, Wagner et al. 1995a; De Jose, Ramos et al. 2001).

Entre as mulheres virgens de tratamento anti-retroviral no momento em que receberam profilaxia com Zidovudina para prevenção da transmissão vertical, dados tanto do PACTG 076 quanto do ensaio clínico de Zidovudina de curso breve na Costa do Marfim evidenciaram que o desenvolvimento de resistência viral à Zidovudina no momento do parto foi infreqüente, não havendo evidência de que as mulheres que desenvolveram resistência viral à drogas anti-retrovirais estivessem sob maior risco de transmissão de vírus resistente aos seus bebês (Eastman, Shapiro et al. 1998; Ekpini, Nkengasong et al. 2002). É possível que esses vírus resistentes sejam menos transmissíveis.

Em outro estudo que acompanhou a transmissão vertical de pares (WITS), quando ambos, o vírus selvagem e o vírus com resistência com mutação no códon **70** para a Zidovudina estavam presentes na mãe, verificou-se que apenas o vírus selvagem foi transmitido para o bebê. (Colgrove, Pitt et al. 1998).

Alguns estudos que avaliaram o risco de transmissão da infecção pelo HIV em mulheres extensamente expostas aos anti-retrovirais, cuja população viral dominante era resistente à Zidovudina (resistência por terapia prolongada e não por profilaxia para prevenção da transmissão materno-infantil) foram inconclusivos. Resultados do Women and Infant Transmission Study – WITS, e do estudo PACTG 185 sugerem aumento no risco de transmissão materno-infantil do HIV entre

mulheres com resistência viral à Zidovudina (Welles, Pitt et al. 2000; Mofenson 2002; Bauer, Welles et al. 2003). Entretanto, dados de outra coorte perinatal, PACTS (Perinatal AIDS Cohort Transmission Study), não evidenciaram associação entre a presença de cepas resistentes em mulheres e o risco de transmissão (Palumbo, Holland et al. 2001).

Diversas questões relacionadas à prevenção da transmissão vertical, resistência às drogas anti-retrovirais e ao tratamento anti-retroviral têm características específicas nos diferentes países. Uma questão crítica é se a resistência aos anti-retrovirais entre gestantes extensamente tratadas com anti-retrovirais e aumento das taxas de resistência primária aos anti-retrovirais em gestantes virgens de tratamento resultará em aumento nas taxas de transmissão perinatal do HIV-1, revertendo o curso do sucesso de prevenção da transmissão perinatal.

O uso da Nevirapina em dose única apresenta uma desvantagem, pois a pressão seletiva desta droga quando administrada isoladamente, em dose única, seleciona vírus resistentes aos ITRNN no plasma materno, detectáveis mesmo quando avaliados com técnicas de seqüenciamento viral pouco sensíveis (Eshleman, Becker-Pergola et al. 2001; Beckerman 2003). Entretanto, utilizando-se estas mesmas técnicas de seqüenciamento menos sensíveis não foi possível demonstrar variantes virais resistentes às drogas anti-retrovirais no plasma, transcorridos alguns meses (Eshleman, Mracna et al. 2001).

No estudo ACTG 398 foi demonstrado que o seqüenciamento viral padrão não foi capaz de detectar mutações de resistência viral aos ITRNN de baixa frequência, evidenciáveis, no entanto, tanto pelo método de Seqüenciamento Simples de Genoma (SGS) como pelo teste de resistência usando o Sistema Ty-1 HIV RT, ambos capazes de detectar vírus resistentes aos ITRNN de baixa frequência numa proporção substancial destes pacientes. Além disso, quando se procedeu à avaliação de relação genética viral em isolados obtidos de pacientes com falência virológica em uso de regimes contendo Efavirenz, observou-se que em vários destes pacientes, os vírus presentes no contexto de “falha virológica” eram geneticamente relacionados às variantes virais minoritárias detectadas antes do tratamento. Esses resultados sugerem que quasiespecies minoritárias de vírus

resistentes aos ITRNN desempenham um papel importante na falência às drogas. Entretanto, ainda não se sabe se vírus resistentes aos ITRNN selecionados por curso breve de tratamento com regimes baseados com ITRNN para prevenção de transmissão materno-infantil poderiam igualmente comprometer a resposta terapêutica futura a regimes que contenham ITRNN.

O uso de dose única de Nevirapina (NVP) para mulheres grávidas na hora do parto, tanto em dose única como enquanto complemento da terapia pré-natal com Zidovudina (ZDV), ou combinações de anti-retrovirais, está associado à detecção transitória no plasma materno de vírus com mutações de resistência para a NVP (Cunningham, Chaix et al. 2002).

A resistência à NVP foi detectada seis semanas após o parto em 15-24% das mulheres portadoras de infecção pelo HIV-1, virgens de tratamento anti-retroviral, que receberam dose única de NVP em estudos conduzidos na Uganda, Tailândia, e EUA. Contudo, estes vírus resistentes não eram mais detectados no plasma materno 12 meses após o parto.

Em virtude das cepas resistentes a NVP não serem detectáveis na hora do parto, mas apenas em algum momento do puerpério, após uma única dose de NVP, presumiu-se que o impacto da profilaxia com NVP para prevenção da transmissão vertical do HIV-1 seria insignificante. Dados esparsos sugerem que entre as mulheres que amamentam e que apresentam vírus resistentes a NVP no leite materno e no plasma após seis meses do parto, a taxa de transmissão pós-natal de vírus resistente a NVP para o bebê parece ser baixa (Eshleman, Becker-Pergola et al. 2001; Lee 2003).

Existem poucos dados sobre se a exposição prévia a dose única de NVP em gravidez anterior poderia comprometer profilaxias para a prevenção da transmissão perinatal do HIV-1 com esquemas de dose única de NVP em gestações futuras. Da mesma forma, uma vez que sejam administradas múltiplas doses de NVP como parte de esquemas anti-retrovirais, não se sabe se mutações de resistência ligadas ao uso de NVP como a **Y181C** ou **K103N**, uma vez presentes, seriam mais facilmente transmitidas da mãe para os bebês do que a população de vírus selvagem.

Chi e colaboradores avaliaram a resposta clínica e imunológica em mulheres que iniciaram esquema contendo Inibidores da Transcriptase Reversa Não Nucleosídeos (ITRNN), e que tenham usado Nevirapina, em dose única, para prevenção da transmissão materno-infantil do HIV, em gestações anteriores. O estudo foi realizado no Zâmbia com 6740 mulheres que estavam iniciando terapia com ITRNN, das quais 751 mulheres estavam reiniciando esse esquema após terem feito uso de Nevirapina, em dose única, em gestação anterior. Semelhante a outro estudo (Lockman and McIntyre 2007; Lockman, Shapiro et al. 2007), o estudo de Chi revelou um aumento moderado no risco de falência ao tratamento em mulheres que iniciaram esquema anti-retroviral contendo ITRNN, e haviam sido expostas a quimioprofilaxia para prevenção da transmissão vertical com Nevirapina nos últimos 06 meses (Chi, Chintu et al. 2007b; Chi, Sinkala et al. 2007a; Chi, Sinkala et al. 2007).

O Ensaio Clínico SAINT, conduzido na África do Sul, comparou duas doses maternas de Nevirapina (a primeira dose administrada durante o trabalho de parto e a segunda 48h após o parto), com sete dias de uso de ZDV e 3TC. O uso de duas doses maternas de NVP resultou na seleção de mutações de resistência em 67% dos casos; três vezes maior do que o observado no HIVNET 012 (19%). As mutações predominantes foram **K103N** (62%) e **Y181C** (45%) (Welles, Pitt et al. 2000).

O desenvolvimento de resistência de alto nível para 3TC e Nevirapina ocorre rapidamente, e está baseado em um único ponto de mutação no genoma viral. A resistência genotípica materna ao 3TC foi detectada numa proporção substancial de mulheres grávidas (39% - 60%), tanto pelo estudo ANRS 075 (Agência Nacional Francesa de Pesquisa sobre SIDA) como pelo estudo PACTG 316, para as mulheres que receberam mais de quatro semanas de profilaxia (Mandelbrot, Landreau-Mascaro et al. 2001; Cunningham, Chaix et al. 2002). A presença de mutação viral detectável ao 3TC em mulheres grávidas, evidenciada no momento do parto ou no puerpério não teve impacto negativo na prevenção da transmissão perinatal do HIV, uma vez que as taxas de transmissão em geral foram muito baixas (<2%), no âmbito de ambos os estudos.

Parker e colaboradores (Parker, Wade et al. 2003) encontraram 12,1% de prevalência de resistência genotípica a drogas anti-retrovirais nos primeiros isolados virais de 91 bebês nascidos em New York, de 1998 a 1999.

Entre pacientes infectados com vírus subtipo B (e provavelmente também entre aqueles infectados por subtipos não-B, baseado nos estudos de Weidle (Weidle, Downing et al. 2003)), o aparecimento da mutação **K103N** com tratamento prolongado não supressivo com NVP está associado à resistência cruzada a toda a classe de Inibidores da Transcriptase Reversa Não Nucleosídeos (ITRNN) e ao risco de falência de tratamentos futuros com regimes anti-retrovirais que contenham ITRNN, como, por exemplo, os que contêm Efavirenz.

Existem poucos dados na literatura, e, ainda assim, controversos sobre a indução de resistência anti-retroviral em gestantes virgens de tratamento anti-retroviral, que tenham feito uso de terapia anti-retroviral de alta potência (HAART) para prevenção da transmissão vertical do HIV-1. Essas taxas podem variar de zero a 65%, dependendo do esquema anti-retroviral usado, do tempo de uso dos anti-retrovirais, do momento da suspensão das drogas, do momento de análise das amostras e da técnica empregada (Lyons, Coughlan et al. 2005; Perez, Thomson et al. 2006; Truong, Grant et al. 2006; Kakehasi, Tupinambas et al. 2007; Palacios, Santos et al. 2007; Darwich, Esteve et al. 2008). Esses estudos se encontram resumidos no quadro 3.

Lyons e colaboradores (Lyons, Coughlan et al. 2005) avaliaram o impacto da interrupção da terapia anti-retroviral tripla na gestação e o aparecimento de mutações de resistência em uma coorte de 50 mulheres que iniciaram terapia anti-retroviral de alta potência (HAART) durante a gestação e que tinham na primeira visita  $CD4 \geq 300$  células/uL. A idade média das gestantes era 27 anos, a mediana de CD4 na primeira visita era 480 células/uL (IQR, 300 – 1083) e a mediana de Carga viral para o HIV-1 era 2.689 cópias/mL (IQR, 50-34.753). Quatro mulheres (8%) haviam feito uso de anti-retroviral em gestação anterior. Foram colhidas amostras para genotipagem na visita pré-tratamento e seis semanas após a interrupção dos anti-retrovirais. As gestantes que fizeram uso de Nevirapina como parte do esquema anti-retroviral, suspenderam a Nevirapina no momento do parto e mantiveram a Zidovudina e Lamivudina por mais 05 dias. Nessa coorte, 35 gestantes (90%) eram

virgens de terapia anti-retroviral. A genotipagem foi feita usando o Bayer TruGene HIV-1 Genotyping Kit. Sete mutações principais, **V106A** (uma), **Y181C** (duas), **G190A** (uma), **K101E** (uma), **M184V** (uma), **T215S** (uma) foram detectadas em **cinco (13%)** mulheres no pós-parto. Todas as mulheres que estavam fazendo regimes que incluíam Nevirapina, eram virgens de tratamento anti-retroviral antes dessa gestação analisada, e não tinham mutação detectadas na amostra pré-tratamento. A duração média de exposição aos anti-retrovirais foi 70 dias.

<b>Prevalência de Mutações de Resistência a anti-retrovirais em mulheres que fizeram uso de HAART durante a gestação.</b>			
<b>Período / Autor / País</b>	<b>ARV na gestação (Virgen ART)</b>	<b>Amplificado (N total)</b>	<b>Prevalência de qualquer mutação para ARV</b>
2005 / Irlanda <i>Lyons et al</i>	AZT/3TC + NVP ou NFV a partir de 28 semanas	39	<b>13%</b> na TR 6 semanas pós parto
2005 / Argentina, Brasil, Bahamas, México <i>Duran et al</i>	01 ARV (10%) 2 ARV (10%) 3 ARV (80%)	55(819)	<b>16,1%</b> mutação na visita inicial ou 6-12 semanas pós parto
2008/ Argentina <i>Perez et al</i>	20 gestantes que receberam AZT+3TC+NVP	25	<b>0%</b> (NRTI, NNRTI, IP) 01 a 15 meses no pós-parto
2007/Vietnam <i>Truong et al</i>	34 gestantes que receberam AZT+3TC+NFV	34	<b>0%</b> (NRTI, NNRTI, IP) No parto, 02 e 08 semanas pós-parto
2007 / Brasil <i>Palacios et al</i>	AZT/3TC + NVP ou NFV ou LPV/r a partir de 28 semanas (33 virgens)	31 (44)	<b>0%</b> (NRTI, NNRTI, IP) 8 semanas pós parto
2007 / Brasil <i>Kakehasi et al</i>	AZT+3TC+NFV- 63,3% AZT+3TC+NVP-20% AZT-16,7%	30	<b>04/17(23,5%)</b> pacientes com mutação na protease 06 meses pós-parto
2008/EUA <i>Paredes et al</i>	WOMEN AND INFANT TRANSMISSION STUDY - WITS AZT+3TC+NFV- 75% AZT+3TC+NVP - 8% AZT+3TC -	114 (146)	<b>65%</b> na TR - terapia dupla. <b>25%</b> para os ITRNN - Nevirapina. <b>1,1%</b> para IP - Nelfinavir 02 a 06 meses após o parto

**Quadro 3** - Prevalência de Mutações de Resistência a anti-retrovirais em mulheres que fizeram uso de HAART durante a gestação. Fonte: Elaborado pelo Autor.

Já esta bem documentado que regimes de dose única de nevirapina para prevenção da transmissão materno infantil do HIV podem resultar em resistência anti-retroviral, mesmo em mulheres previamente virgens para terapia anti-retroviral (Jackson, Becker-Pergola et al. 2000; Eshleman, Becker-Pergola et al. 2001). A

resistência provavelmente se deve ao lento clearance plasmático da nevirapina, resultando em monoterapia com níveis sub-ótimos da droga por até 03 semanas.

Jourdain e colaboradores (Jourdain, Ngo-Giang-Huong et al. 2004), reportaram que mulheres que posteriormente recebam esquema anti-retroviral de alta potência (HAART) contendo nevirapina, tem menor probabilidade de ter supressão viral. Pesquisadores acreditavam que usando terapia combinada durante a gravidez e fazendo uma interrupção estruturada da terapia anti-retroviral, pudessem contrabalançar o lento clearance plasmático da nevirapina e de outras drogas com meia-vida plasmática longa. Para corroborar isso, os estudos de McIntyre e colaboradores (McIntyre 2005; McIntyre 2005; McIntyre 2006) observaram menos resistência quando adicionavam Zidovudina/lamivudina ao esquema de dose única de Nevirapina e continuavam essas drogas por 4 a 7 dias no pós-parto (Eshleman, Mrcna et al. 2001). Entretanto, no estudo de Lyons (Lyons, Coughlan et al. 2005) 13% das mulheres que desenvolveram mutações de resistência para os ITRNN, e que haviam feito uso de Nevirapina como parte do esquema anti-retroviral, suspenderam primeiro a Nevirapina e mantiveram a Zidovudina e Lamivudina por mais 05 dias após a interrupção da Nevirapina.

Um outro estudo que aborda o risco da emergência de resistência em pacientes tratados com Nevirapina, chama atenção para a prevalência de populações minoritárias do HIV-1, expressando a mutação de resistência **K103N** em pacientes em falha com Nevirapina. Estudos prévios reportaram que a mutação **K103N** aparece rapidamente, com conseqüente falha de tratamento em pacientes recebendo Efavirenz depois de falhar com uso de Nevirapina (Antinori, Zaccarelli et al. 2002; Shulman, Hughes et al. 2002).

Lecossier e colaboradores reportaram a detecção de população minoritária viral expressando resistência cruzada ao Efavirenz, sob a forma da mutação **K103N**, em 04 de 16 pacientes falhando esquemas contendo Nevirapina (Lecossier, Shulman et al. 2005). Essas populações minoritárias, indetectáveis inicialmente na genotipagem padrão, foram identificadas por PCR com sequenciamento seletivo. Chama atenção, o fato de que 04 de 05 pacientes sem a detecção da mutação **K103N** na avaliação de população minoritária viral falharam subsequentemente com terapia contendo Efavirenz. O PCR com seqüenciamento seletivo encontrou a

mutação **K103N** em 01 de 06 pacientes que interromperam a terapia com Nevirapina; essa mutação não havia emergido até 07 dias após a interrupção, mas estava evidente com 26 dias pós tratamento. Esse estudo, apesar da casuística pequena, também mostra que a possibilidade de indução de resistência pode ser maior do que previamente pensado. O estudo também chama atenção para a ocorrência de resistência ao Efavirenz, mesmo que não apareça a mutação **K103N** no PCR com seqüenciamento seletivo. Vários outros estudos conduzidos por Frenkel e colaboradores, utilizando a metodologia OLA (Oligonucleotide Ligase Assay), demonstraram a presença de populações minoritárias virais com resistência para **M184V**, **K103N**, **Y181C** e **D30N**, que não tinham sido detectadas pela genotipagem padrão (ViroSeq ou TruGene), pois estas metodologias não foram capazes de detectar populações virais < 20% (Frenkel, Wang et al. 2003).

Overton e colaboradores (Overton, Sungkanuparph et al. 2005) conduziram um estudo retrospectivo numa coorte de gestantes portadoras de infecção pelo HIV-1, em St Louis-USA, incluídas no período de Janeiro de 1999 a Dezembro de 2004, com intuito de avaliar resistência anti-retroviral em gestantes que tivessem feito uso de anti-retroviral em gestação anterior. Foram incluídas na análise 80 gestantes que tinham genotipagem para o HIV-1 realizado antes do início da terapia anti-retroviral na primeira gestação. Das oitenta gestantes incluídas na coorte, 21/80 (26%) tinham sido expostas a anti-retrovirais em gestações anteriores. A idade média na primeira gestação era de 21 anos de idade e 51,9% haviam recebido esquema anti-retroviral contendo Nevirapina. Em relação a Carga Viral, 71,4% atingiram Carga Viral do HIV-1 <400 cópias/mL no momento do parto, enquanto 81% tinham Carga Viral do HIV-1 < 1.000 no momento do parto. Não houve transmissão materno infantil do HIV-1 nessa população estudada. Para a segunda gestação, a média de CD4 e Carga Viral do HIV-1 no início da quimioprofilaxia anti-retroviral foi de  $465 \pm 312$  células/uL e  $3,8 \pm 0,9$  Log<sub>10</sub> cópias/mL, respectivamente. Quando avaliaram o desenvolvimento de resistência aos anti-retrovirais na segunda gestação, encontraram 04/21(19%) de resistência para os ITRN. Apesar da supressão viral prévia com esquema contendo Nevirapina, duas mulheres desenvolveram a mutação **K103N**. Todas as mutações principais, exceto **L210W**, foram encontradas em gestantes que tinham sido expostas a esquema contendo Zidovudina+Lamivudina+ Nevirapina.

Perez e Colaboradores (Perez, Vignoles et al. 2008), encontraram baixa prevalência de resistência anti-retroviral numa população de gestante portadoras de infecção pelo HIV-1, que fizeram uso de HAART com interrupção do esquema após o parto, e com nenhuma ou pouca exposição prévia aos anti-retrovirais. Foram avaliadas 230 gestantes, das quais 20 foram incluídas nesse estudo, porque preenchiam os critérios de inclusão no estudo e fizeram uso nessa gestação de Zidovudina (ZDV) +Lamivudina (3TC) +Nevirapina (NVP). O tempo mediano do uso de anti-retrovirais foi de 120 dias e a mediana da Carga Viral para o HIV-1 no momento do parto foi < 50 cópias/mL. Vinte e cinco amostras de sangue foram colhidas no período de 01 a 15 meses após a interrupção dos anti-retrovirais, mediana de 03 meses, para avaliação de seqüenciamento padrão (PCR) e seqüenciamento seletivo em tempo real (SPCR) do HIV-1. Nenhuma mutação associada com resistência a 3TC ou NVP foi encontrada pelo seqüenciamento padrão, embora uma amostra tenha detectado a mutação **M41L**. Das 25 amostras avaliadas, 22 (88%) tinham vírus selvagem; 01 amostra tinha 0.13% e 02 amostras tinham <0.1% de população minoritária viral com a mutação **K103N**. Nenhuma dessas gestantes transmitiu o vírus para o bebê.

Truong e Colaboradores (Truong 2007), assim como Perez e cols, encontraram baixa emergência de mutações após interrupção de anti-retrovirais em gestantes com HIV-1, virgens de tratamento anti-retroviral, que fizeram quimioprofilaxia com HAART para prevenção da transmissão materno infantil do HIV-1, e foram incluídas numa coorte de gestantes em Ho Chi Minh, Vietnam, no período de 04/2005 a 04/2006. Foram acompanhadas 163 gestantes, das quais 83/163 (50,9%) receberam HAART. Destas, 59% receberam AZT+3TC e 40,9% recebido AZT+3TC+Nelfinavir. Das 163 gestantes, 80/163 (49%) foram diagnosticadas no parto, e desse grupo 60% receberam Nevirapina em dose única no parto, enquanto 40% receberam Nevirapina dose única no parto mais AZT+3TC por 01 semana após o parto. Genotipagem para o HIV-1 foi realizada em amostras da primeira visita, do parto, de duas e oito semanas pós-parto. A média de CD4 na primeira visita era 418/mm<sup>3</sup> (39-1299). O subtipo mais freqüente foi a CRF01-AE (98,2%). A mutação **M184V**, associada a resistência ao 3TC, foi encontrada respectivamente em gestantes usando AZT+3TC em 45% (5/11) no parto, 32,3% (10/31) dos casos duas semanas pós-parto, e em nenhuma mulher 08 semanas pós-

parto(0/38) Para as gestantes usando AZT+3TC+Nelfinavir, nenhuma mutação foi detectada no parto, 02 e 08 semanas pós-parto, e a diferença entre os dois grupos foi estatisticamente significativa ( $p < 0.001$ ). Resistência a Nevirapina foi encontrada em 23,8% (5/21) na segunda semana pós-parto e em 8,3% (2/24) das mulheres que fizeram uso de dose única de NVP no parto. Nenhuma mutação foi encontrada para as mulheres que fizeram uso de Nevirapina dose única no parto + AZT+3TC por uma semana. As mutações mais freqüentes para a NVP foram: **K103K/N**, **Y181Y/C**, **Y188Y/C**, **G190G/A**.

Palácios e Colaboradores (Palacios 2007), também encontraram baixa prevalência de mutações de resistência em gestantes que fizeram uso de profilaxia com anti-retroviral e suspenderam a terapia após o parto. Foram incluídas nesse estudo 31 mulheres que fizeram acompanhamento entre os anos de 2000 e 2005, e tinham amostra amplificável na primeira visita e na visita de oito semanas após a suspensão da profilaxia anti-retroviral. Oito mulheres tinham recebido terapia anti-retroviral antes da profilaxia para esta gestação, 12 mulheres fizeram uso de Zidovudina + Lamivudina + Nevirapina, enquanto 20 mulheres fizeram uso de Zidovudina + Lamivudina + Inibidor de Protease (13- Nelfinavir – NFV, 9 Lopinavir – LPV/r). Os gens da RT e Protease eram do subtipo B em 23/31 casos. Na análise das seqüências das 31 mulheres que tiveram amostra amplificável oito semanas após a suspensão dos anti-retrovirais, não foram detectadas mutações principais de acordo com o algoritmo da IAS-2007, para os ITRN, ITRNN, assim como para os IP.

Em contraponto aos estudos de Truong, Perez e Palácios , que encontraram baixo desenvolvimento de mutações de resistência aos anti-retrovirais, Kakehasi e colaboradores (Kakehasi, Tupinambas et al. 2007) reportaram alta incidência de mutações para Protease em gestantes que fizeram uso de Nelfinavir como parte de esquema anti-retroviral para prevenção da transmissão vertical do HIV-1. O grupo avaliou o desenvolvimento de resistência anti-retroviral em mulheres expostas a terapia anti-retroviral para prevenção da transmissão vertical do HIV-1, que interromperam a terapia no parto, quando o CD4 era  $\geq 250$  células/uL. A genotipagem foi realizada para as pacientes que tinham amostras disponíveis antes do início da terapia anti-retroviral e 24 semanas pós-parto. Trinta gestantes foram elegíveis para o estudo. A idade média era 27 anos, a mediana da idade gestacional

no início da terapia anti-retroviral foi de 22 semanas (IQR, 19-27) a mediana de CD4 na primeira visita era 446 células/uL (IQR, 353 – 686), e a mediana de Carga viral para o HIV-1 era 8.560 cópias/mL (IQR, 3.252-19.515). Na primeira visita, 96,7 % eram assintomáticas (CDC93-A1/A2). Em relação ao esquema anti-retroviral utilizado 63,3% das gestantes receberam Zidovudina+Lamivudina+Nelfinavir como esquema anti-retroviral, 20% receberam esquema com Zidovudina+Lamivudina + Nevirapina e 16,7% fizeram somente Zidovudina. O Subtipo B foi o mais prevalente (70%). Quatro mulheres (8%) haviam feito uso de anti-retroviral em gestação anterior. As sequências foram analisadas no ABI Prism 3100 automated Sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA). A resistência ao Nelfinavir foi detectada em 04 (23,5%) das 17 gestantes expostas a essa droga anti-retroviral. Duas mutações principais, **D30N** (1/17), **L90M** (1/17), e uma acessória **N88S** (2/17). Mutações para RT estavam presentes nos **códons 44, 69, e 118** (1/28). Não foram encontradas mutações para os ITRNN. Não houve transmissão vertical do HIV-1 nessa população. Todas as mulheres estavam fazendo regimes que incluíam Nevirapina, eram virgens de tratamento anti-retroviral antes dessa gestação analisada, e não tinham mutações detectadas na amostra pré-tratamento. A mediana de exposição aos anti-retrovirais foi de 20 semanas (IQR, 14-22).

Em outro estudo, Duran e colaboradores (Duran, Losso et al. 2007), avaliaram a presença de mutações de resistência principal em mulheres recebendo terapia anti-retroviral para prevenção da transmissão materno infantil do HIV-1 incluídas numa coorte observacional do NISDI Perinatal Study, conduzido na Argentina, Bahamas, Brasil e México, durante o período de Setembro de 2002 a Março de 2005. Os critérios de inclusão eram o diagnóstico da infecção pelo HIV-1 na gestação atual, ter recebido profilaxia com anti-retrovirais para prevenção da transmissão materno infantil do HIV-1, e ter feito acompanhamento no pós-parto por pelo menos 06 a 12 semanas. De 819 mulheres acompanhadas, cinquenta e cinco mulheres tinham amostras para análise na primeira visita e no período de 06 a 12 semanas pós-parto. Na primeira visita do pré-natal, 98% eram assintomáticas, 62% tinham Carga Viral do HIV-1 < 1.000 cópias/mL, 53% tinham CD4 ≥ 500 células/uL. Das cinquenta e cinco mulheres que tinham dados de genotipagem na primeira visita e na visita de 06 a 12 semanas pós-parto, 44(80%) não tinham mutações na visita inicial e na visita de acompanhamento. Em onze amostras (20%) foram encontradas

mutações de resistência principal na visita inicial ou na visita de 06 a 12 semanas pós-parto. Seis mulheres (6/55; 10,9%) tinham mutação nas duas visitas, três (3/55; 5,5%) tinham mutação identificada somente na primeira visita e duas mulheres (2/55; 3,6%) apresentaram mutação somente na visita de 06 a 12 semanas pós-parto. A mutação **K70R** foi detectada em cinco (9,1%) das amostras da primeira visita e em três (5,5%) das amostras da visita de acompanhamento. Nesse estudo, 16% das mulheres receberam um esquema anti-retroviral contendo Nevirapina desenvolveram mutações, mas nenhuma delas estava associada ao uso da Nevirapina, diferentemente do estudo de Lyons. Quando observadas mutações principais que tenham ocorrido em amostras de mulheres que tenham sido amplificadas em um ou nos dois pontos, encontramos mutações de resistência em 16% (19/118) das mulheres.

Mais recentemente, Paredes e Cols. (Paredes 2008) encontraram alta frequência de mutações para a Lamivudina e para os Inibidores de Transcriptase Reversa Não Nucleosídeos (ITRNN) em gestantes que fizeram quimioprofilaxia com anti-retrovirais para a prevenção da transmissão vertical do HIV-1 nos Estados Unidos da América - resultados do Women and Infant Transmission Study - WITS. No entanto, diferentemente de Kakehasi e colaboradores (Kakehasi, Tupinambas et al. 2007), não encontraram mutações para a Protease. Foram avaliadas 146 gestantes, virgens de terapia anti-retroviral, que foram incluídas na coorte WITS no período de 1998 a 2005, e que tinham amostras de plasma congeladas, colhidas 02 ou 06 meses pós-parto, com níveis de HIV-1 RNA > 500 cópias/mL. As amostras da primeira visita de inclusão na coorte foram avaliadas pelo sequenciamento padrão e pelo sequenciamento alelo específico para detecção das mutações **M184V**, **D30N** e **K103N**. A média de idade foi 26,7 anos. Dessas mulheres, 57% eram não-brancas e 35,6% eram hispânicas. A mediana de CD4 no momento do parto foi 575 células/uL (IQR, 397-767), mediana de Carga Viral para o HIV-1 foi 4.780 cópias/mL (IQR, 1.352-18.121). Todas as mulheres receberam pelo menos Zidovudina + Lamivudina como esquema profilático anti-retroviral; 75% receberam Nelfinavir e 8,2% receberam Nevirapina como terceira droga. Dados de mutações de resistência anti-retroviral foram avaliados para 114 mulheres (78%). Pela genotipagem padrão, as taxas de aparecimento de mutações para os ITRN para as mulheres que fizeram uso de 02 drogas no esquema (Zidovudina+ Lamivudina) foi: **M41L**=5,0%, **D67N**=5,0%,

**K70R**=10%,, **M184V/I**=65% (95% pelo Sequenciamento Alelo Específico), **T21Y**=5,0%. Nas mulheres que fizeram uso de 03 drogas como parte do esquema anti-retroviral, encontramos pela genotipagem padrão: **M41L**=1,1%, **D67N**=1,1%, **K70R**=1,1%, **M184V/I**=28,7% (51,6% pelo Sequenciamento Alelo Específico), **T210F**=1,1, **K219Q**=1,1%. As taxas para os ITRNN, para as mulheres que fizeram uso de Nevirapina, pela genotipagem padrão foram: **K103N**=25% (37,5% pelo Sequenciamento Alelo Específico), **Y188C**=12,5%. As taxas para os Inibidores de Protease, para as mulheres que fizeram uso de Nelfinavir, pela genotipagem padrão foram: **D30N**=1,1% (1,1% pelo Sequenciamento Alelo Específico) e **L90M**=1,1%. Na análise multivariada, as variáveis associadas com a emergência da mutação **M184V** foram Terapia dupla X Terapia Tripla (OR=19,64 95%CI=2,47-156,25, p<0.01), e prolongada exposição a Zidovudina (OR por cada mês adicional =1,29, 95% CI=1,03-1,63, p=0.03). Variáveis associadas com a emergência da mutação **K103N** foram o uso de Nevirapina (OR=9,75 95%CI=1,62-58,84, p=0.01) e tempo de uso da Zidovudina com Lamivudina (OR por cada mês adicional =1,46, 95%CI=1,05-2,02, p=0.02). A seleção de resistência para a Lamivudina e para os ITRNN é frequente induzida durante o uso da profilaxia com anti-retrovirais para prevenção da Transmissão Vertical do HIV-1, mas a seleção de mutações para Inibidor de Protease foi rara. O uso de terapia tripla anti-retroviral diminuiu o ODDS para a seleção da mutação **M184V**.

## 2.13 DETECÇÃO DE INFECÇÃO RECENTE PELO HIV-1

A diferenciação de indivíduos recém-infectados pelo HIV daqueles infectados de longa data é difícil, porém extremamente importante para a obtenção de estimativas acuradas de incidência, permitindo uma melhoria nas estratégias de acompanhamento clínico preventivo. Estudos de infecções recentes são ferramentas úteis para a verificação da eficácia de políticas públicas de controle da pandemia e funcionam como sinalizadores de controle epidemiológico, podendo servir de indicador precoce na detecção de uma eventual mudança na dinâmica da epidemia nas populações afetadas (Rutherford, Schwarcz et al. 2000), permitindo inferir tendências recentes da epidemia, da dinâmica das populações virais, e a análise da

resposta imune dos indivíduos soro convertidos, gerando informações relevantes para o desenvolvimento de vacinas.

Após a infecção pelo HIV, verifica-se um período de pré-conversão sorológica que dura em média, 22 dias. Neste período (anticorpos indetectáveis) o diagnóstico laboratorial pode ser efetuado através da detecção do antígeno p24 ou pela técnica de reação da polimerase em cadeia (PCR) – detecção do RNA HIV ou cDNA HIV. No período imediatamente após a soroconversão, o diagnóstico com apenas um espécime clínico é muitas vezes difícil. Uma vez estabelecida a soroconversão (com plena detecção de anticorpos anti – HIV por ensaios imunoenzimáticos e Western blot ou imunofluorescência), torna-se difícil determinar a condição de infecção recente, exceto nos casos em que haja indicação epidemiológica muito sugestiva (Rutherford, Schwarcz et al. 2000).

Com o objetivo de se estabelecer um diagnóstico diferencial entre infecção recente e antiga, Janssen e cols., em 1998, desenvolveram um algoritmo de testagem sorológica para diagnóstico reagente em teste de triagem, sem histórico de diagnóstico prévio e virgens de tratamento anti-retroviral (Janssen, Satten et al. 1998; Rawal, Degula et al. 2003). Janssen e cols. descreveram uma modificação em um ensaio sorológico comercial de primeira geração para diagnóstico visando à detecção de soroconvertidos recentes. O ensaio foi alterado na diluição da amostra e no tempo de incubação, com o objetivo de diminuir sua sensibilidade. Soroconvertidos recentes (SR) possuem títulos mais baixos de anticorpos quando comparados aos que têm infecção de longo termo e sua infecção não é evidenciada pelo teste 3A11-LS, enquanto os soroconvertidos de longo termo (SRL) possuem reatividade para ambos os ensaios. Os CDC desenvolveram e distribuíram estes reagentes para alguns laboratórios. O fabricante descontinuou a fabricação deste teste, e um segundo teste comercial (Vironostika HIV –1 EIA, Organen Teknika) foi modificado de modo similar (Vironostika LS- EIA) (Rawal, Degula et al. 2003), e tem sido utilizado para a detecção de infecção recente (McFarland, Busch et al. 1999; 2001a; 2001b; Gouws, Williams et al. 2002; Weinstock, Dale et al. 2002; Weinstock, Dale et al. 2002).

Ao longo do tempo, cresceu o interesse de implementar estes testes menos sensíveis em outras regiões do mundo. Entretanto, dois estudos demonstraram que

tanto o 3A11-LS como o Vironostika LS-EIA tinham diferentes “janelas” para os subtipos B e E, em populações testadas na Tailândia (Parekh, Hu et al. 2001; Young, Hu et al. 2003). O maior período de janela obtido para os indivíduos infectados com o subtipo E, foi atribuído à utilização de derivados antigênicos do subtipo B nestes ensaios. Devido à presença de dois ou mais subtipos em diversas partes do mundo e a crescente diversidade viral, não torna prático a utilização destes testes para estimar a incidência. Alguns estudos foram conduzidos na África (Gouws, Williams et al. 2002) e na Ásia (Gupta, Kingsley et al. 2003), todavia a acurácia destas estimativas têm sido questionadas. Apesar da importância de estimar a incidência de infecção por HIV, os ensaios menos sensíveis não têm sido implementados amplamente em outras partes do mundo em função dos múltiplos subtipos circulantes e das dificuldades de interpretação dos dados obtidos (Parekh and McDougal 2005).

Entre os anos de 2000 a 2003, 16 centros nos Estados Unidos participaram de um estudo dos CDC, que visava comparar os benefícios da realização de testes para o diagnóstico precoce (2003). Em 2003, passou-se a utilizar este teste em 35 centros de testagem, correspondente a uma cobertura de 93% dos locais de detecção da infecção em todo os Estados Unidos. Os CDC relatam que este algoritmo sorológico tem sido considerado a melhor alternativa para a obtenção de estatísticas fidedignas para casos incidentes podendo, dessa forma, atribuir maior fidedignidade aos dados coletados a partir dos anos 90 em 25 estados americanos (Rutherford, Schwarcz et al. 2000).

Na África do Sul, com a utilização deste mesmo algoritmo, foi possível caracterizar altas taxas de incidência, alcançando até 24% por ano em mulheres jovens (Gouws, Williams et al. 2002). No Brasil, esta metodologia tem sido utilizada para caracterizar os casos incidentes em determinadas populações tais como: gestantes, usuários e ex-usuários de drogas (Teixeira, Bastos et al. 2004) e em Centros de Testagem e Aconselhamento, onde se objetivou esclarecer os fatores de risco dos casos incidentes; como em estudo realizado em Santos (Alves, Shafer et al. 2003).

Estudos mais recentes documentaram o desenvolvimento de um outro método sorológico de determinação de infecção recente, que se baseia em um

ensaio de ELISA de captura, testando-se a reatividade de anticorpos de indivíduos soropositivos para o HIV frente a peptídeos sintéticos correspondentes a epítomos da gp41 de diferentes subtipos virais (Parekh, Hu et al. 2001).

A vantagem deste método frente a seus antecessores é que o mesmo é validado para uso frente a diferentes subtipos virais (Hu, Vanichseni et al. 2003; Young, Hu et al. 2003), aspecto de grande relevância para as regiões onde circula mais de um subtipo viral, como o Brasil. Além de ser uma ferramenta epidemiológica, a facilidade de execução técnica, o baixo custo, e o fato de não exigir nenhum outro recurso tecnológico além do necessário para a realização dos testes de escala, pode ser difundida por vários centros em nosso país, contribuindo assim de forma determinante para um melhor entendimento e vigilância desta pandemia em nosso meio.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar o perfil de resistência genotípica do HIV-1 aos anti-retrovirais em uma população de gestantes infectadas pelo HIV, expostas à quimioprofilaxia com anti-retrovirais de alta potência (HAART) apenas para prevenção da transmissão vertical do HIV.

#### 3.2. OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

- Caracterização sóciodemográfica, clínica, imunológica e virológica das gestantes acompanhadas na coorte do HGNI.
- Descrever as características relacionadas à gestação, ao parto e aos recém-natos desta população de gestantes.
- Avaliar a taxa de transmissão vertical do HIV-1 nessa coorte.
- Comparar os níveis de linfócitos CD4 e do RNA do HIV-1 entre as amostras obtidas antes do início de HAART e 6 meses após a sua interrupção.
- Avaliar a frequência de gestantes portadoras de infecção recente pelo HIV-1, através do teste Calypte<sup>®</sup> HIV-1 BED Incidence EIA.
- Caracterizar os subtipos virais predominantes nessa população de gestantes.
- Avaliar o perfil de resistência primária aos anti-retrovirais nas gestantes portadoras de infecção pelo HIV-1, virgens de tratamento anti-retroviral por

ocasião da gestação atual e que interromperam a profilaxia com anti-retrovirais após o parto da atual gestação.

- Avaliar o perfil de polimorfismos na visita pré-HAART e os fatores de risco para novas mutações detectadas após a introdução dos anti-retrovirais nesta população de gestantes.

## **4 PACIENTES E MÉTODOS**

### **4.1 DESENHO DO ESTUDO**

Trata-se de um estudo observacional prospectivo, de coorte, envolvendo gestantes portadoras de infecção pelo HIV-1 em acompanhamento no ambulatório de pré-natal do Hospital Geral de Nova Iguaçu (HGNI/MS).

### **4.2 SELEÇÃO DA INSTITUIÇÃO**

O Hospital Geral de Nova Iguaçu (HGNI) é um hospital geral do Ministério da Saúde com 350 leitos e uma maternidade de alto risco, onde são realizados cerca de 3.000 partos/ano. Está localizado próximo à periferia do Rio de Janeiro e serve a uma grande população empobrecida da Baixada Fluminense, onde é o único hospital público. O Hospital Geral de Nova Iguaçu foi escolhido para a realização deste estudo porque mantém colaboração antiga com o Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas IPEC/FIOCRUZ, e sua maternidade é o centro de referência para atendimento de gestantes portadoras de infecção pelo HIV-1 em toda a Baixada Fluminense, atendendo cerca de 120 gestantes nesta situação por ano. Os departamentos de Pediatria, Obstetrícia/Ginecologia e Doenças Infecciosas contam com uma

equipe treinada, voltada exclusivamente para a assistência integral a essas gestantes e seus bebês. Existem três turnos diários de ambulatórios de pré-natal no HGNI e o serviço conta com uma equipe multiprofissional específica para o atendimento e acompanhamento da gestante portadora de infecção pelo HIV-1.

### 4.3 SELEÇÃO DOS SUJEITOS DA PESQUISA

Todas as gestantes com sorologia anti-HIV reagente confirmada, que buscaram acompanhamento pré-natal no Hospital Geral de Nova Iguaçu (HGNI/MS), no período compreendido entre Maio de 2005 e Dezembro de 2007, foram avaliadas quanto à participação no estudo de acordo com os critérios de inclusão e de exclusão listados a seguir.

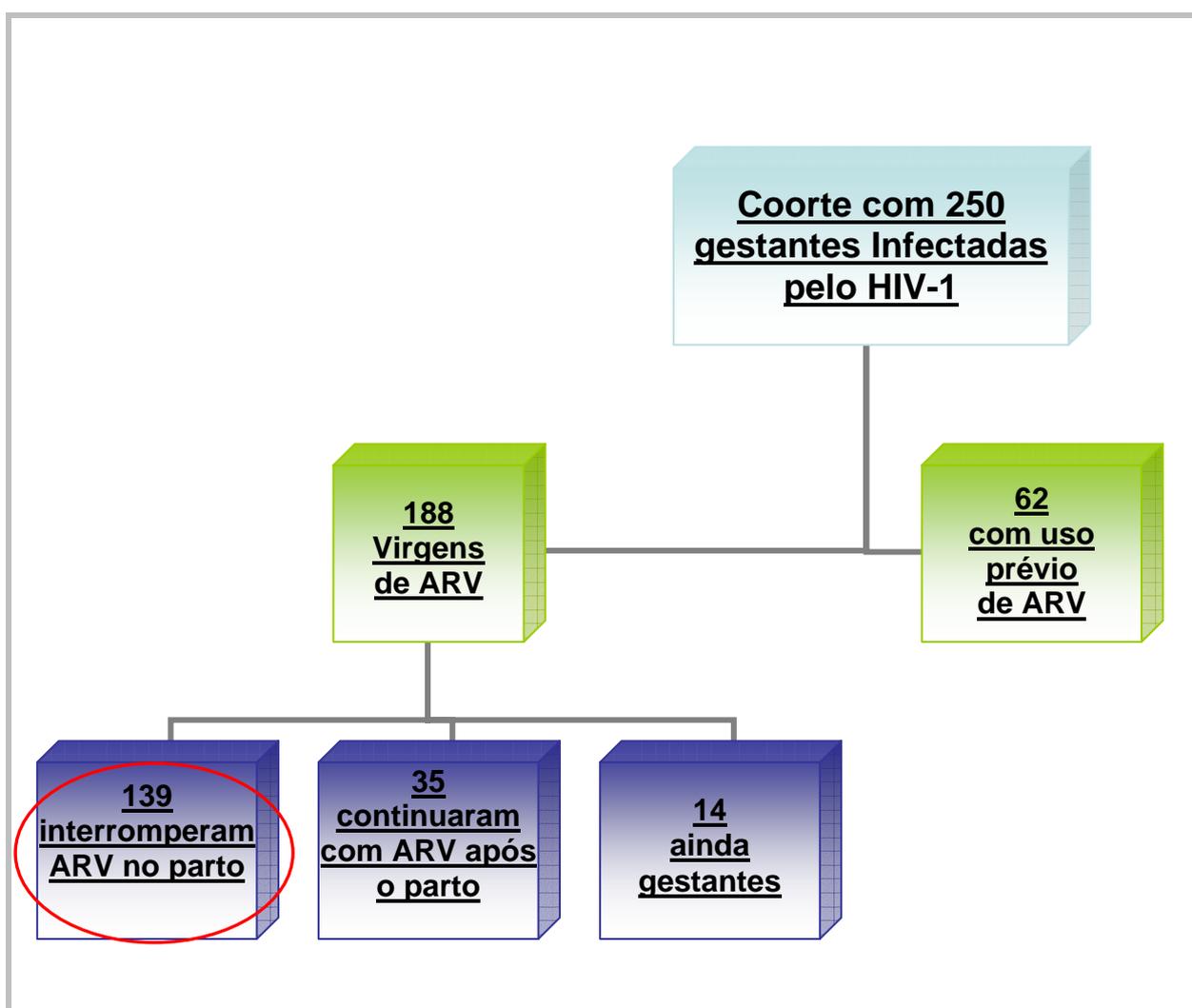
#### 4.3.1 Critérios de inclusão

- Gestantes com idade igual ou maior que 16 anos.
- Gravidez confirmada através do  $\beta$ HCG na urina, e/ou ultra-sonografia.
- Evidência de infecção pelo HIV-1 documentada por testes de anticorpos anti-HIV 1/2 (ELISA), confirmada por imunofluorescência e/ou Western Blot.
- Gestantes virgens de terapia anti-retroviral, ou que usaram AZT injetável em parto anterior.
- Gestantes que não apresentavam indicação clínica e/ou laboratorial de tratamento da infecção pelo HIV e, portanto interromperam a profilaxia anti-retroviral após o parto.

#### 4.3.2 Critérios de exclusão

- Mulheres que não tiveram amostras coletadas após a inclusão no estudo.

Observando-se os critérios de inclusão e de exclusão, participaram deste estudo 139 gestantes (Figura 7). Critérios de exclusão específicos, como a carga viral indetectável e/ou a impossibilidade de amplificação das amostras, foram considerados em determinadas análises, conforme descritos na seção de análise estatística.



**Figura 7** – Fluxograma da Coorte.. Fonte: Elaborado pelo Autor.

## 4.4. PROCEDIMENTOS DO ESTUDO

### 4.4.1. Procedimentos referentes à gestante

<b>FLUXO DO ESTUDO - MÃE</b>	TRIAGEM	INICIO DO ARV	06 A 08 SEMANAS DE ARV	PARTO	02 SEMANAS	04 SEMANAS	06 MESES E 01 ANO	LABORATÓRIO ONDE FOIRAM XECUTADOS OS EXAMES
<b>AVALIAÇÃO INICIAL</b>								
Termo de Consentimento	X							HGNI
Avaliação Sócio-demográfica	X							HGNI
Elegibilidade /Checagem de ELISA e Confirmatório para HIV-1	X							HGNI
<b>AVALIAÇÃO CLÍNICA</b>								
História Clínica e Obstétrica	X							HGNI
Exame Físico	X							HGNI
Dispensação dos Antiretrovirais		X						HGNI
Adesão aos Antiretrovirais		X	X	X	X	X	X	HGNI
<b>AVALIAÇÕES LABORATORIAIS</b>								
Hemograma		X	X	X	X	X	X	HGNI
Bioquímica		X	X	X	X	X	X	HGNI
PPD		X						HGNI
CD4+ /CD8+		X	X	X	X	X	X	LAB AIDS
Quantificação de RNA para HIV-1 (Plasma)		X	X	X	X	X	X	LAB AIDS
Sorologia para Herpes Virus 2		X						LAB IMUNO IPEC
Sorologia para Toxoplasmose, Rubéola, Citomegalovírus		X						HGNI
Sorologia para Hepatite B e C		X						HGNI
Sorologia para Sífilis		X		X				HGNI
Genotipagem para HIV-1		X		X	X	X	X	LAB AIDS
Calypte BED Incidence Enzyme Immunoassay		X						LAB AIDS
Wet Mount		X						HGNI
PCR para Clamidia e Gonococo		X						HSE
<b>ESTOCAGEM</b>								
Plasma	X	X	X	X	X	X	X	LAB AIDS
Soro	X	X	X	X	X	X	X	LAB AIDS
PBMC	X	X	X	X	X	X	X	LAB AIDS

**Quadro 4** – Procedimentos do estudo – Mãe. Fonte: Elaborado pelo Autor.

#### 4.4.1.1. Visita de inclusão na coorte de gestantes

##### 4.4.1.1.1. Obtenção do consentimento

As gestantes que foram convidadas a participar do estudo receberam um termo de consentimento livre (TCLE) e esclarecido com informações gerais sobre os objetivos e os procedimentos do estudo. O TCLE também contemplou o consentimento da gestante acerca da realização da Quantificação de RNA para o HIV-1(NASBA) no sangue do bebê nas primeiras 48 horas de vida, com um mês de vida e posteriormente aos quatro meses de vida e da contagem de linfócitos CD4+/TCD8+.

##### 4.4.1.1.2. Entrevista e coleta de dados

Os dados referentes a esta visita foram coletados mediante aplicação de entrevista com formulário pré-estruturado onde foram capturadas informações sócio-demográficas, clínicas e laboratoriais (ANEXO B).

##### 4.4.1.1.3. Avaliação clínica

- História clínica e obstétrica.
- Exame físico
- Aconselhamento para aderência ao tratamento anti-retroviral.

##### 4.4.1.1.4. Prescrição de antiretrovirais para quimioprofilaxia da TV

O momento de início da quimioprofilaxia e o esquema de medicamentos prescritos foram baseados nas recomendações para profilaxia da transmissão vertical do HIV-1 e terapia anti-retroviral para gestantes (MS, 2007). Terapia anti-retroviral foi prescrita para todas as gestantes por ocasião de idade gestacional igual ou maior que 14 semanas no momento da inclusão. Todas as gestantes foram prescritas com esquema HAART.

##### 4.4.1.1.5 Coleta de sangue e processamento das amostras

Cerca de 30 mL de sangue foram colhidos das participantes e distribuídos da seguinte forma:

- 10 mL em tubo sem anticoagulante visando a obtenção de soro;
- 10 mL em tubo com EDTA visando a obtenção de plasma, a realização de tipagem das subpopulações de linfócitos T por Citometria de Fluxo e o preparo de pellet de leucócitos para extração de DNA;
- 10 mL em tubo heparinizado visando a obtenção de plasma e células mononucleares para estudos imunológicos. As células mononucleares restantes foram criopreservadas em nitrogênio líquido.
- As amostras de plasma, soro, pellet de leucócitos foram estocadas a -70°.

#### 4.4.1.1.6. Avaliações Laboratoriais

Os seguintes exames laboratoriais foram realizados nas amostras de sangue:

- Hematologia (Leucograma com diferencial e contagem de plaquetas)
- Bioquímica (Glicose, Uréia, Creatinina, TGO, TGP, Fosfatase Alcalina, Gama GT, Amilase)
- Sorologia para Lues, Herpes Vírus2, Toxoplasmose, Rubéola, Citomegalivírus
- PPD
- Sorologia para a detecção de infecção recente pelo HIV-1(Calypte BED Incidence Enzyme Immunoassay).
- RNA de HIV-1 plasmático.
- Citometria de fluxo para contagem de células CD4, CD8
- Genotipagem
- Coleta de Sangue para PBMC.

Os seguintes exames laboratoriais foram realizados na urina:

- Pesquisa de *Chlamydia trachomatis* e *Neisseria gonorrhoeae* na urina utilizando a técnica de *Polymerase Chain Reaction* (PCR).

#### 4.4.1.2 Visita 6 a 8 semanas após início dos antiretrovirais

Esta visita ocorreu para todas as gestantes, exceto para aquelas que realizaram a visita de inclusão no estudo com idade gestacional superior a 33 semanas. Nas gestantes com idade gestacional entre 31 e 33 semanas na ocasião

da visita de inclusão, esta visita coincide com a visita do momento do parto e foram realizados os procedimentos referentes a ambas as visitas.

#### 4.4.1.2.1 Coleta de sangue e processamento das amostras

Cerca de 30 mL de sangue foram colhidos das participantes e processados tal como descrito na visita inicial.

#### 4.4.1.2.2 Avaliações laboratoriais

- Hemograma
- Bioquímica
- RNA de HIV-1 plasmático
- Citometria de fluxo para contagem de células CD4, CD8
- Coleta de sangue para PBMC

#### 4.4.1.3 Visita pós-parto imediato

##### 4.4.1.3.1 Coleta de sangue e processamento das amostras

Cerca de 30 mL de sangue foram colhidos das participantes e processados tal como descrito na visita inicial.

##### 4.4.1.3.2 Avaliações laboratoriais

- Hemograma
- Bioquímica
- RNA de HIV-1 plasmático.
- Citometria de fluxo para contagem de linfócitos CD4 e TCD8.
  
- Sangue para Genotipagem
- Coleta de sangue para PBMC

##### 4.4.1.3.3 Suspensão dos anti-retrovirais após o parto

Os anti-retrovirais foram suspensos imediatamente após o parto e após a certificação de que a mulher não apresentava indicação clínica e/ou laboratorial para

tratamento da infecção pelo HIV segundo os critérios estabelecidos pelo CDC - 1993.

4.4.1.4 Visita duas semanas, quatro semanas, seis meses e 12 meses após o parto

4.4.1.4.1. Coleta de sangue e processamento das amostras

Cerca de 30 mL de sangue foram colhidos das participantes e processados tal como descrito na visita inicial.

4.4.1.4.2. Avaliações laboratoriais

- Hemograma
- Bioquímica
- RNA de HIV-1 Plasmático
- Citometria de fluxo para CD4, CD8
- Genotipagem
- PBMC

**4.4.2. Procedimentos referentes ao bebê**

4.4.2.1 Coleta de sangue e processamento das amostras

Cerca de 04 mL de sangue foram colhidos dos bebês nos seguintes momentos: 48 horas de vida, um mês de vida e quatro meses de vida, distribuídos da seguinte forma:

- 02 mL em tubo com EDTA visando a obtenção de plasma, a tipagem das subpopulações de linfócitos T por Citometria de Fluxo e a quantificação de RNA viral para o HIV-1;
- 02 mL em tubo heparinizado visando a obtenção de plasma e células mononucleares para estudos imunológicos. As células mononucleares restantes foram criopreservadas em nitrogênio líquido. As amostras de plasma, soro, pellet de leucócitos foram estocadas a -70°.

4.4.2.2. Avaliações Laboratoriais

- Quantificação de RNA de HIV-1 (NASBA): dentro de 48 horas do nascimento, quatro semanas, e quatro meses. Se qualquer em qualquer momento a Quantificação de RNA para o HIV-1 for positivo, a criança retornará logo que possível para repetir o teste.
- CD4/ Carga Viral nas que tiverem resultado de Quantificação de RNA viral para o HIV-1 detectável.
- Genotipagem na segunda amostra de confirmação da Quantificação de RNA viral para HIV-1.

ESTOCAGEM	48 horas	01 mês	04 meses	Coleta Extra <sup>a</sup>	Laboratório de AIDS e Imunologia Molecular
Quant.RNA para HIV-1	X	X	X	X	X
CD4+/CD8+				X	X
Genotipagem para HIV-1				X	X

<sup>a</sup>Se Quant RNA HIV-1 positivo, coletar nova amostra o mais rápido possível

**Quadro 5** - Procedimentos do estudo – Bebê. Fonte: Elaborado pelo Autor.

## 4.5 CRITÉRIOS E TÉCNICAS UTILIZADOS PARA DIAGNÓSTICO E ESTADIAMENTO DA INFECÇÃO PELO HIV

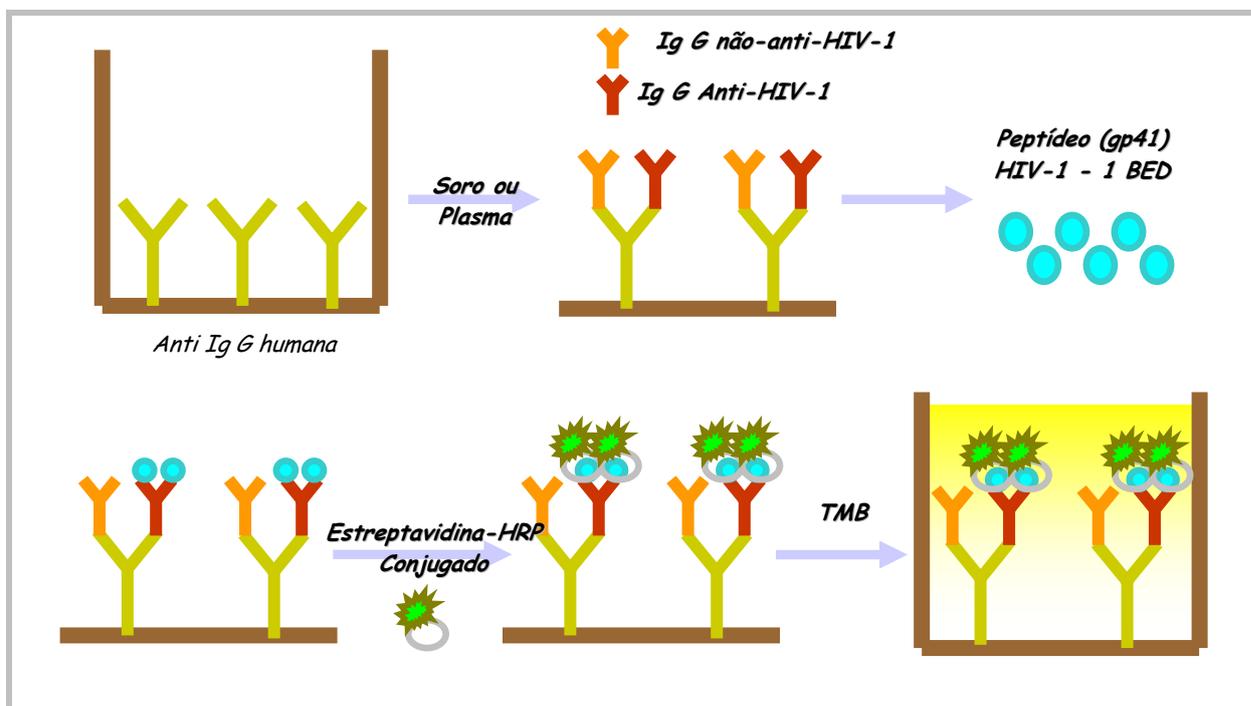
### 4.5.1 Infecção pelo HIV

O diagnóstico de infecção pelo HIV-1 seguiu o fluxograma estabelecido pelo Ministério da Saúde e baseou-se na pesquisa de anticorpos anti-HIV-1 no sangue pelo método de ELISA, sendo os resultados positivos confirmados pela técnica de Imunofluorescência Indireta ou Western-Blot.

### 4.5.2 Avaliação materna de infecção recente pelo HIV-1 através do teste Calypte® HIV-1 BED Incidence EIA

As amostras sororeativas para anticorpos anti-HIV-1 detectadas na primeira visita das gestantes foram submetidas à testagem “in vitro” por ensaio

imunoenzimático de captura, quantitativo, competitivo, para a determinação da proporção de IgG anti HIV-1 específica em relação à IgG total, de acordo com as instruções do fabricante (Calypte HIV-1 BED Incidence EIA – Bula do Kit; Parekh et al., 2002).



**Figura 8** - Esquema do princípio metodológico do teste HIV-1 Incidence BED-CEIA. Fonte: Bula do Fabricante

O teste parte da premissa de que os soroconvertores recentes (SR) têm uma menor proporção de IgG anti HIV-1 específica no soro (ou plasma), se comparados aos soroconvertores de longo termo (SLT). Embora altos valores de densidade ótica (OD) possam ser encontrados nos ensaios regulares de diagnóstico, os valores de OD no ensaio Calypte HIV-1 BED Incidence EIA são menores nos SR.

O Calypte HIV-1 BED Incidence EIA (BED-CEIA) foi testado para 137 amostras colhidas na primeira visita de pré-natal. As amostras com D.O. normalizada (DO-n)  $\leq 1.2$  foram testadas novamente em triplicata para confirmar o valor da DO-n. No teste confirmatório, quando a DO-n da amostra foi  $\leq 0.8$ , a amostra foi classificada como pertencente à soroconvertora recente (SR) de infecção pelo HIV-1.

O resultado do teste Calypte HIV-1 BED Incidence EIA (BED-CEIA) foi pareado com o da contagem de linfócitos CD4 colhido na mesma data, para afastar a possibilidade de caso falso incidente, uma vez que 2-3% dos portadores crônicos de infecção pelo HIV-1, em fase de AIDS, podem ser classificados erroneamente como portadores de infecção recente.

#### **4.5.3 Classificação dos casos de AIDS**

Foi utilizada a classificação dos CDC de 1993 para classificação dos casos de AIDS (MMWR,1992).

#### **4.5.4. Avaliação do Perfil Imunológico**

As alterações imunológicas foram medidas através da avaliação quantitativa das subpopulações de linfócitos T CD4+ e CD8+, linfócitos T totais CD3+ por citometria de fluxo (Trucount; Facscalibur, B-D).

#### **4.5.5. Avaliação do RNA do HIV-1**

A quantificação da carga viral plasmática foi feita no âmbito da Rede de Carga Viral, seguindo os procedimentos NASBA (Biomerieux) e b-DNA (Siemens). O laboratório executor é certificado para estes procedimentos através do programa de avaliação externa da qualidade em Carga Viral, oferecido pelo PN-DST/AIDS, MS. Os testes empregados apresentam, respectivamente, 80 cópias/ml (NASBA) e 50 cópias/ml (b-DNA) como limite para a detecção de cópias de RNA do HIV-1. Para fins deste estudo, foi considerada como carga viral indetectável todas as mulheres que apresentaram carga viral indetectável seja pelo método NASBA ou pelo método b-DNA.

#### **4.5.6. Extração, amplificação e sequenciamento de nucleotídeos do gene da Polimerase (protease e transcriptase reversa) do HIV-1**

O RNA viral foi obtido a partir do plasma de gestantes HIV-1 positivas utilizando o método de extração pelo Kit Viroseq HIV-1 v.2.0 (Abbott), de acordo com as instruções do fabricante.

O RNA purificado foi submetido ao protocolo de retrotranscrição reversa utilizando-se o módulo RT-PCR do kit Viroseq HIV-1 v.2.0. e amplificando um fragmento de 1,8Kb correspondente à região POL do genoma viral, que contém os genes da protease e transcriptase reversa, sob as seguintes condições: 1ciclo 50°C 10min. para ativação da UNG, 1ciclo 93°C 12min. para desativação da UNG e ativação da AmpliTaq, 40ciclos 93°C 20seg. para denaturação do DNA, 1ciclo 64°C 45seg. para anelamento do primer, 1ciclo 66°C 3min., para extensão do primer, 1ciclo 72°C 10min. para extensão final e 4°C até nova operação.

O produto de PCR amplificado com o tamanho de 1,8Kb foi purificado utilizando colunas MicroconYM-100 onde os produtos amplificados menores que 1,8Kb passaram pela coluna durante o processo de lavagem, sendo obtidos 35 µl de DNA purificado.

O produto purificado foi quantificado em gel de agarose 1% em tampão TBE 1x corado com brometo de etídeo 0,5µg/µl. A corrida foi realizada em voltagem de 150V por 35min e o gel foi fotografado sob luz ultra-violeta.

O produto amplificado já purificado e quantificado sofreu diluições de acordo com a concentração encontrada em cada amostra, e posteriormente submetido à reação de sequenciamento utilizando 7 diferentes primers contidos no Kit Viroseq nas seguintes condições: 25ciclos 96°C 10seg. para denaturação do DNA, 1ciclo 50°C 5seg. para anelamento do primer, 1ciclo 60°C 4min. para extensão do primer e 4°C. O sequenciamento foi realizado utilizando o seqüenciador automático ABI PRISM 3100 Applied Biosystem.

#### 4.5.7 Determinação do Subtipo Viral

A determinação do subtipo viral e da ocorrência de genomas recombinantes foram realizadas a partir das seqüências de polimerase, obtidas a partir do sistema ViroSeq, cobrindo a região da protease e de parte da transcriptase reversa (1.3Kb).

Os subtipos virais foram determinados através do alinhamento das seqüências obtidas a partir das gestantes incluídas no estudo frente a amostras de referência dos diversos subtipos virais do grupo M e de uma seqüência externa (SIVcpz), disponíveis no banco de dados de Los Álamos (<http://www.hiv.lanl.gov/content/index>), seguindo-se de construções filogenéticas usando o modelo de “neighbor-joining” (Saitou and Nei 1987) com 100 replicatas para a determinação dos valores de bootstrap. Foram considerados como agrupamentos significativos aqueles com valores de bootstrap iguais ou superiores a 70. Os procedimentos de alinhamento e inferências filogenéticas foram realizados através da ferramenta Mega versão 4.0 (Tamura, Dudley et al. 2007).

#### 4.5.8. Determinação das mutações de resistência

A região da polimerase do HIV-1, incluindo protease e transcriptase reversa, foi amplificada e seqüenciada no intuito de detectar a presença de mutações associadas à resistência aos anti-retrovirais, em isolados circulantes na população de gestantes virgens de tratamento. As seqüências foram editadas no programa Viroseq v.2.7 gerando um fragmento de 1.3Kb para análise do perfil de resistência aos anti-retrovirais.

Depois da edição e análise das seqüências no programa Viroseq<sup>®</sup> gerava-se um laudo descrevendo todas as mutações encontradas e seu impacto respectivo na ação de cada medicamento. Este procedimento foi realizado para cada gestante, nos diferentes momentos de análise previstos no presente estudo.

Além do laudo fornecido pelo programa Viroseq<sup>®</sup>, todas as seqüências foram submetidas ao algoritmo HIVdb Stanford (disponível em <http://hivdb.stanford.edu/pages/algs/HIVdb.html>) para interpretação de resistência genotípica.

#### 4.5.8.1. Análise de mutações de resistência primária

Para a análise de mutações de resistência primária utilizamos a lista de mutações de resistência a drogas para vigilância epidemiológica (*Surveillance Drug Resistance Mutation list - SDRM*) que foi proposta para se obter uma medida simples, não ambígua e estável de Transmissão de Vírus Resistente a Drogas (TVRD) (Shafer, 2007). Quando usada para acessar resistência nas seqüências de amostras de populações de indivíduos portadores de infecção pelo HIV-1, virgens de terapia anti-retroviral (TARV), essa lista é capaz de estimar a transmissão de vírus resistente a drogas de acordo com as diretrizes da Organização Mundial de Saúde.

As mutações da lista SDRM foram selecionadas como indicadores de transmissão de vírus resistente às drogas, e estão em concordância com os seguintes critérios: (i) são comumente reconhecidas como fatores causais ou associados à resistência; (ii) são não-polimórficas em pessoas virgens de terapia anti-retroviral; e (iii) são aplicáveis para todos os subtipos do HIV-1.

A lista SDRM também apresenta um grupo de mutações secundárias consideradas como “borderline/suspeitas”. Essas mutações não são utilizadas no computo do cálculo da transmissão de vírus resistente, mas estão marcadas com as mutações principais na lista SDRM para fornecer informação adicional, que pode ser útil na avaliação dos resultados.

As mutações consideradas como “borderline/suspeitas” são as que: (i) têm associação com tratamento anti-retroviral e não ocorrem como polimorfismos naturais em um nível maior que 0,5% em indivíduos virgens, mas que foram excluídas da lista SDRM porque não preenchem os critérios de ser reconhecidas amplamente como mutações relacionadas ao tratamento, ou (ii) que têm associação com o tratamento, mas que também ocorrem naturalmente ou como polimorfismos raros perto do ponto de *cut-off* para consideração de polimorfismos naturais (entre 0,5 e 1,0%) ou como polimorfismos que são geralmente incomuns, mas que ocorrem com elevada freqüência em certos subtipos.

A seqüência FASTA do gene pol (seqüências de nucleotídeos) foi colocada no programa CPR – Calibrated Population Resistance Tool, versão 3.2, para análise

das seqüências da protease e RT e avaliação de mutações de resistência (<http://surveillance.stanford.edu/cpr/cpr.cgi>).

#### **4.5.9 Diagnóstico de infecção por *Chlamydia trachomatis* e/ou *Neisseria gonorrhoeae***

PCR Cobas Amplicor positivo na urina, de acordo com a bula do fabricante.

#### **4.5.10 Diagnóstico de sífilis**

VDRL ou RPR reagente, qualquer título, confirmado por um teste treponêmico (TPHA).

#### **4.5.11 Diagnóstico de hepatite B**

Foram consideradas portadoras de infecção aguda ou crônica pelo vírus da Hepatite B as gestantes que tinham sorologias com as seguintes combinações de marcadores virais para Hepatite B: HbsAg+ e anti-HBc IgM+ ou HbsAg + e anti-HBc IgG +, respectivamente. A sorologia para hepatite B foi feita pela metodologia ELISA e o teste utilizado foi o ELFA BioMérieux.

#### **4.5.12 Diagnóstico de hepatite C**

Foram consideradas portadoras de hepatite C as gestantes que tinham sorologia anti-HCV reagente. A sorologia para hepatite C foi feita pela metodologia ELISA e o teste utilizado foi o ELFA BioMérieux.

#### **4.5.13 Diagnóstico de Herpes simplex 2 (HSV-2)**

Sorologia para HSV-2 foi realizada com o Focus HerpeSelect 2 ELISA IgG. Os resultados foram reportados como valores índice em relação ao calibrador cut-off. Para calcular o índice, os valores de densidade ótica dos espécimes foram divididos pela média dos valores de absorbância dos calibradores. Foram consideradas reagentes as amostras com índices  $\geq 3,5$ .

#### **4.5.14 Diagnóstico sorológico da Toxoplasmose, Rubéola e Citomegalovirus**

As sorologias para Toxoplasmose /Rubéola/ Citomegalovirus foram feitas pela metodologia ELISA, e o teste utilizado foi o ELFA BioMérieux.

### **4.6 LOCAL DA REALIZAÇÃO DOS EXAMES LABORATORIAIS**

Os exames de Hematologia e Bioquímica foram realizados no laboratório de Patologia Clínica do Hospital Geral de Nova Iguaçu.

Os exames sorológicos para Toxoplasmose, Rubéola e Citomegalovírus foram realizados no Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Geral de Nova Iguaçu. Esse laboratório está certificado pelo Colégio Americano de Patologia Clínica (CAP) para realização dessas sorologias.

A reação intradérmica de Mantoux foi realizada no ambulatório do Hospital Geral de Nova Iguaçu.

Os exames sorológicos para Herpes Simplex 2 foram realizados no Laboratório de Imunologia do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas – IPEC/FIOCRUZ.

Os exames sorológicos para lues foram realizados no Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Geral de Nova Iguaçu. Esse laboratório está certificado

pelo Colégio Americano de Patologia Clínica (CAP) para realização da sorologia para sífilis.

As sorologias para hepatite B e para hepatite C foram realizadas no Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Geral de Nova Iguaçu. Esse laboratório está certificado pelo Colégio Americano de Patologia Clínica (CAP) para realização de sorologia para Hepatite B e C.

A pesquisa de *Chlamydia trachomatis* e *Neisseria gonorrhoeae* na urina através da técnica de PCR foi realizada no Laboratório do departamento de doenças infecciosas do Hospital dos Servidores do Estado.

Os exames sorológicos para detecção de infecção recente pelo HIV-1 (Calypte BED Incidence Enzyme Immunoassay) foram realizados no Laboratório de AIDS e Imunologia Molecular da FIOCRUZ, Instituto Oswaldo Cruz.

Os exames de contagem de células CD4/CD8 e quantificação de RNA viral para o HIV-1 e os exames de genotipagem para o HIV-1 foram realizados no Laboratório de AIDS e Imunologia Molecular da Fiocruz, o qual é Centro de Referência para o Ministério da Saúde para a realização e controle de qualidade deste exame. e referência para a América Latina pelo VQA (Virology Quality Assurance).

#### 4.7. ASPECTOS ÉTICOS

As gestantes que participaram desse estudo foram informadas de que esta pesquisa fazia parte de uma tese de doutorado conduzida pelo Dr. José Henrique Pilotto, e que tinha como um dos seus objetivos avaliar o perfil de resistência genotípica do HIV-1 aos anti-retrovirais numa população de gestantes expostas à quimioprofilaxia com HAART para prevenção da transmissão vertical do HIV-1.

As gestantes foram informadas também da relevância de sua participação nesta pesquisa e foram esclarecidas de que não eram obrigadas a participar, caso

não concordassem. Foram também informadas quanto ao sigilo e confidencialidade acerca de todas as informações por elas disponibilizadas.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do IPEC-FIOCRUZ em 17 de Janeiro de 2005. Os pesquisadores envolvidos no projeto estavam de acordo com os Termos das Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa Envolvendo Seres Humanos – Resoluções n.ºs. 196/96; 251/97 e 292/99 do Conselho Nacional de Saúde (CNS)/ Conselho Nacional de Ética em Pesquisa / Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

Foram levadas em consideração as normas para uso de amostras estocadas de acordo com a Resolução CNS N.º 347, de 13 de janeiro de 2005, que regula o uso de amostras estocadas.

#### 4.8 REGISTRO E GERAÇÃO DA BASE DE DADOS

Para este estudo, foram desenvolvidos dois formulários com questões padronizadas para atender aos objetivos gerais e específicos. Um deles, contendo informações sócio-demográficas, comportamentais, clínicas, laboratoriais, história obstétrica e do pré-natal que foi realizado durante o estudo. O segundo, para o registro da genotipagem e dos subtipos virais (ANEXO A). A entrada de dados foi feita a partir da utilização do software comercial Teleform (versão padrão 6.1, produzido pela Cardiff Inc.), mediante escaneamento dos formulários e processamento sob forma de imagens digitais. O uso do Teleform possibilitou a exportação automática, o controle de qualidade, a validação e o armazenamento dos dados coletados, permitindo a integração com o aplicativo para gerenciamento e análise de dados SAS, versão 8.1, utilizado para as análises deste estudo. As principais vantagens na implementação do Teleform foram as seguintes:

- Redução de custos e erros em comparação com soluções que fizessem uso de entrada manual de dados (digitação tradicional);
- Diminuição considerável do tempo de resposta entre coleta e análise dos dados;

- Grande flexibilidade na utilização de variados sistemas de gerenciamento e análise de dados (portabilidade da base de dados).

## 4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

### 4.9.1 Análise descritiva

Foram realizadas freqüências relativas das variáveis categóricas e a média, desvio-padrão (DP), mediana e intervalo interquartilico (IQR) para as variáveis contínuas para a caracterização da população estudada. Os resultados foram interpretados para os valores válidos.

### 4.9.2 Análise comparativa da contagem de linfócitos CD4 e do RNA do HIV-1, segundo classificação de infecção recente pelo Calypte BED EIA

A contagem de linfócitos CD4 e o RNA do HIV-1 nas amostras coletadas na visita inicial (pré-HAART) segundo a classificação de infecção recente pelo Calypte BED EIA foram comparadas através do teste não paramétrico Mann-Whitney. Foram consideradas estatisticamente significativas as diferenças encontradas ao nível de 5%.

### 4.9.3. Análise comparativa da contagem de linfócitos CD4 e do RNA do HIV-1 entre as amostras obtidas antes do início de HAART e 6 meses após a interrupção da HAART

O critério de inclusão para participar desta análise consistiu em ter data de parto até dezembro de 2007, de forma que as mulheres tivessem oportunidade de coletar a amostra seis meses após o parto, ou seja, a interrupção de HAART. Como critério de exclusão, a reintrodução de HAART anterior à coleta da amostra da visita

de seis meses após o parto e perda de seguimento anterior a coleta dessa amostra de 6 meses. Desta forma, o número de observações para essa análise foi menor, uma vez que está só foi possível para as mulheres que tiveram suas amostras processadas para contagem de linfócitos CD4 e RNA do HIV-1 nas visitas de inclusão na coorte (pré-HAART) e de seis meses após a interrupção de HAART.

O teste pareado de Wilcoxon (Levin 1987) foi utilizado para avaliar as diferenças da contagem de linfócitos CD4 e do RNA do HIV-1 entre as amostras obtidas antes do início de HAART e 6 meses após a sua interrupção.

O teste pareado de Wilcoxon calcula as diferenças entre duas medidas (no caso, coleta pré-HAART e 6 meses após a interrupção da HAART) para um mesmo indivíduo e compara o número de diferenças positivas, negativas e de empates. As diferenças positivas ocorreram quando as medianas da contagem de linfócitos CD4 e RNA do HIV-1 nas amostras obtidas 6 meses após a interrupção de HAART foram maiores do que as medianas calculadas para estes parâmetros nas amostras obtidas antes do início de HAART. As diferenças negativas ocorreram quando os valores observados nas amostras obtidas 6 meses após a interrupção do HAART foram menores do que os valores observados nas amostras obtidas antes do início de HAART. Os empates ocorreram quando as diferenças entre as medianas da contagem de linfócitos CD4 e RNA do HIV-1 nas amostras obtidas para estes dois momentos foram zero. O nível de significância de 5% ( $p\text{-valor} \leq 0,05$ ) foi considerado para afirmar que existe diferença entre as medianas.

A contagem de linfócitos CD4 mais próxima da introdução da HAART (anterior à introdução de HAART até 30 dias após) foi considerada como referente à visita inicial da gestante (pré-HAART). Qualquer medida de RNA do HIV-1 mais próxima da introdução da HAART, seja anterior ou até 3 dias após a sua introdução, foi considerada como referente à visita inicial da gestante (pré-HAART). Para as medidas da contagem de linfócitos CD4 e do RNA do HIV-1 referentes à visita de 6 meses após a interrupção da HAART foi admitido um intervalo de +/- 3 meses.

#### **4.9.4 Cálculo das prevalências de resistência primária e de polimorfismos na visita pré- HAART**

As mulheres com carga viral indetectável (N = 16) foram excluídas destas análises, dado a escassez de dados publicados que permitam assegurar que estas mulheres não tenham de fato mutação. Sendo assim, o cálculo das prevalências de mutação primária e de polimorfismos foi realizado em 123/139 amostras obtidas na visita de inclusão (pré-HAART) das mulheres selecionadas para este estudo.

Para o cálculo das prevalências das mutações de resistência primária para os ITRN, ITRNN e IP, foi considerado no numerador o total de gestantes que tiveram ao menos uma mutação principal da lista *SDRM* para cada classe de ARV supracitada e no denominador o total de gestantes que tiveram amostras amplificadas (n = 123).

A prevalência de cada mutação principal de resistência primária, seja para ITRN, ITRNN e IP, também foi calculada, sendo considerado no numerador o número de amostras com a mutação principal específica e no denominador o número de amostras amplificadas (n = 123). Procedeu-se de forma semelhante para o cálculo das prevalências de mutações polimórficas (amostras pré-HAART), entretanto no numerador foi considerado o total de gestantes que tiveram qualquer mutação acessória polimórfica. A prevalência de mutações polimórficas também foi calculada de acordo com o subtipo do HIV (Subtipo B e Subtipos não-B).

#### **4.9.5 Cálculo das incidências cumulativas de detecção de mutação após a introdução de HAART**

As mulheres com carga viral indetectável na visita de inclusão no estudo (N = 16), também foram excluídas dos cálculos de incidências de novas mutações após a introdução de HAART.

O cálculo da incidência geral de mutações detectadas após a introdução de HAART foi realizado para estas mesmas 123 gestantes, uma vez que para todas foi possível obter ao menos uma amostra após a introdução de HAART.

As mutações encontradas nas amostras da visita inicial (pré-HAART) de gestantes e, portanto, consideradas como mutações primárias, não foram computadas como “nova mutação” no cálculo das incidências, quando detectadas nas amostras coletadas após a introdução de HAART.

A incidência cumulativa de mutações detectadas após a introdução de HAART também foi calculada para cada visita do estudo (parto, 2 e 4 semanas e 6 meses) considerando no numerador o total de gestantes que tiveram ao menos uma mutação principal ou acessória da lista de Stanford para cada classe de ARV, assim como também o total de gestantes que tiveram cada mutação específica; nos denominadores foram consideradas inicialmente apenas as gestantes que tiveram genotipagens satisfatórias em cada visita. A incidência cumulativa também foi calculada considerando no denominador o total de gestantes ( $n = 123$ ).

#### **4.9.6 Análise dos fatores preditores de detecção de mutação após a introdução da HAART**

Foram consideradas para a análise dos fatores preditores de detecção de mutação após a introdução da HAART 123/139 amostras obtidas na visita de inclusão (pré-HAART) das mulheres selecionadas para este estudo, para as quais foi possível a amplificação dos genes da protease e da transcriptase reversa.

##### **4.9.6.1. Codificação das covariáveis selecionadas**

As covariáveis que foram analisadas no modelo univariado estão descritas na tabela 1, assim como as codificações a elas atribuídas. Para a definição da variável de exposição “RNA do HIV-1 no parto” foi considerada a medida no intervalo de 7 dias antes ou depois do parto.

**Tabela 1** - Codificação da variável-desfecho, variável de exposição e covariáveis analisadas no modelo multivariado

Variáveis	Codificação
<i>Variável-desfecho</i>	
Detecção de qualquer mutação após introdução da PMTCT	1 = Sim 0 = Não
<i>Covariável de exposição</i>	
RNA do HIV-1 no parto	0 = $\leq 80$ 1 = $> 80$
<i>Covariáveis</i>	
Infecção recente (Calypte BED EIA)	1 = Sim 0 = Não
Subtipo do HIV	1 = B 0 = Não-B
Resistência primária (mutação principal)	1 = Sim 0 = Não
Presença de polimorfismo G335CD ou E312Q	1 = Sim 0 = Não
Contagem de linfócitos CD4 pré-HAART	1 = $\leq 350$ 0 = $> 350$
Esquema usado para PMTCT	1 = IP <sup>a</sup> 0 = ITRNN <sup>b</sup>
Tempo de uso de HAART (dias)	-
Idade gestacional no início do pré-natal no HGNI (semanas)	-

<sup>a</sup>Nelfinavir ou Lopinavir

<sup>b</sup>Nevirapina

#### 4.9.6.2 Medida de associação

O risco relativo (RR) foi a medida de associação utilizada para avaliar a importância das covariáveis selecionadas na detecção de nova mutação após a introdução de HAART. O RR foi estimado utilizando-se o modelo de regressão de Poisson.

#### 4.9.6.3 Modelo de Poisson não ajustado e ajustado

No modelo não ajustado cada variável foi avaliada isoladamente. Aquelas que apresentaram um nível de significância de até 20% ( $p \leq 0,20$ ) foram selecionadas para a inclusão no modelo ajustado.

A correlação entre as covariáveis “tempo de uso de HAART” e “idade gestacional no início do pré-natal no HGNI” foi avaliada pelo coeficiente de correlação de Pearson. Esse coeficiente pode assumir valores que variam entre -1 e +1. Consideramos como alta uma correlação valores acima de +/-0,75.

Modelos multivariados foram ajustados para “detecção de mutação após introdução de HAART” (variável-desfecho) considerando RNA do HIV-1 como variável de exposição. A determinação do efeito independente entre as covariáveis selecionadas e a detecção de mutação após a introdução de HAART foi avaliado por meio do modelo de Poisson. A modelagem foi iniciada adicionando-se seqüencialmente as variáveis que se mostraram significativamente associadas ao desfecho na análise univariada, seguida de exclusão seqüencial de acordo com a relevância de cada uma delas para os modelos sucessivamente ajustados. Permaneceram no modelo final as variáveis significativas em nível de 10% ( $p \leq 0,10$ ) ou com um efeito considerado importante, ou seja, variáveis que mostraram um aumento do risco da detecção de qualquer mutação em mais de 50% ( $RR > 1,5$ ).

O modelo de regressão de Poisson tem como pressuposto de que a média seja igual a variância na variável desfecho. A existência de sobredispersão (variância maior que a média) no modelo de regressão de Poisson foi avaliada por meio do teste global de adequação do ajuste (“*goodness of fit*”) que utiliza a função desvio (“*deviance*”) e os graus de liberdade dos resíduos. A função desvio do modelo segue uma distribuição qui-quadrado sob a hipótese nula de que o modelo é adequado. Com um p-valor baixo, rejeita-se a hipótese nula de que o modelo possui um bom ajuste aos dados (McCullagh 1989). Este pressuposto foi verificado através do comando *poisgof* da biblioteca Epicalc (Chongsuvivatwong 2008). Todas as análises foram realizadas com o pacote estatístico R (R 2008).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 CARACTERÍSTICAS SÓCIODEMOGRÁFICAS E COMPORTAMENTAIS

A idade média e mediana das mulheres foi de 25,3 (DP = 6,0) e 24 anos (IQI = 20 - 29), respectivamente, sendo que 13,7% (n= 19) delas tinham idade inferior a 20 anos. Cerca de dois terços das mulheres se auto-declararam como pertencentes à raça não-branca (69,8%) e 58,3% declararam ter apenas até sete anos de escolaridade. A maioria delas (65,0%) tinha renda familiar mensal até dois salários-mínimos no momento de sua inclusão na coorte; 17,8% eram desprovidas de qualquer renda familiar mensal.

Cerca de 80% das mulheres estava vivendo em união quando de sua inclusão na coorte; um terço das mulheres (n = 44) tinha parceiros sorodiscordantes para o HIV e 28,4% (n = 38) desconhecia o status sorológico de seus parceiros.

Um quarto das mulheres (n = 34) se declarou como fumante durante a gestação do estudo. Etilismo e uso de drogas durante a gestação avaliada no estudo foram reportados por 22,1% e 9,6% das mulheres, respectivamente.

A tabela 2 descreve as características sócio-demográficas e comportamentais das gestantes com HIV/AIDS no momento da inclusão na coorte do HGNI.

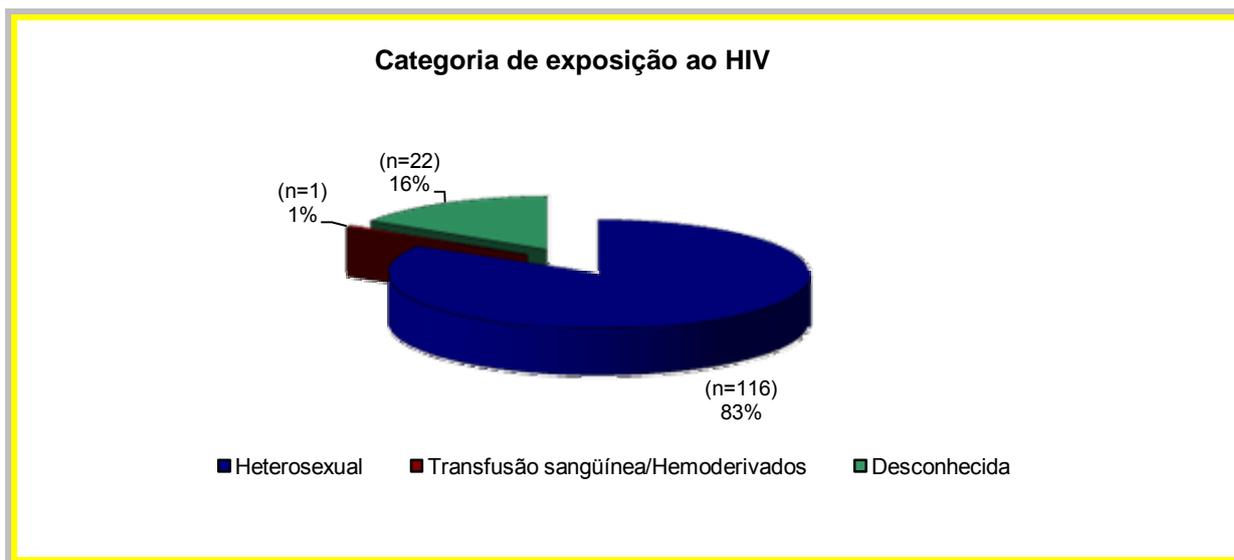
**Tabela 2** - Características sócio-demográficas e comportamentais das gestantes com HIV/AIDS acompanhadas no HGNI. Rio de Janeiro, 2005-2008 (N = 139).

<b>Características<sup>a</sup></b>		<b>N</b>	<b>%</b>
<b>Idade materna em anos</b> (N = 139)	< 20	19	13,7
	20-34	110	79,1
	≥ 35	10	7,2
<b>Etnia/Raça</b> (N = 139)	Branca	42	30,2
	Não branca	97	69,8
<b>Escolaridade</b> (N = 139)	Até 4 anos	35	25,2
	5-7 anos	46	33,1
	8 ou mais anos	58	41,7
<b>Renda familiar mensal em S.M.</b> (N = 137)	Sem renda	24	17,5
	Até 2 salários	89	65,0
	>2 salários	24	17,5
Sem informação – 2 (1,4%)			
<b>Situação conjugal</b> (N = 139)	Unida	110	79,1
	Não unida	29	20,9
<b>Sorologia do parceiro atual</b> (N = 134)	Positiva	52	38,8
	Negativa	44	32,8
	Desconhecido	38	28,4
Sem informação – 5 (3,6%)			
<b>Tabagismo na atual gestação</b> (N = 137)	Sim	34	24,8
	Não	103	75,2
Sem informação – 2 (1,4%)			
<b>Etilismo na gestação atual</b> (N = 136)	Sim	30	22,1
	Não	106	77,9
Sem informação – 3 (2,2%)			
<b>Uso de drogas na gestação atual</b> (N = 135)	Sim	13	9,6
	Não	122	90,4
Sem informação – 4 (2,9%)			

<sup>a</sup> Números variam devido à informação ignorada

## 5.2. CATEGORIA DE EXPOSIÇÃO AO HIV

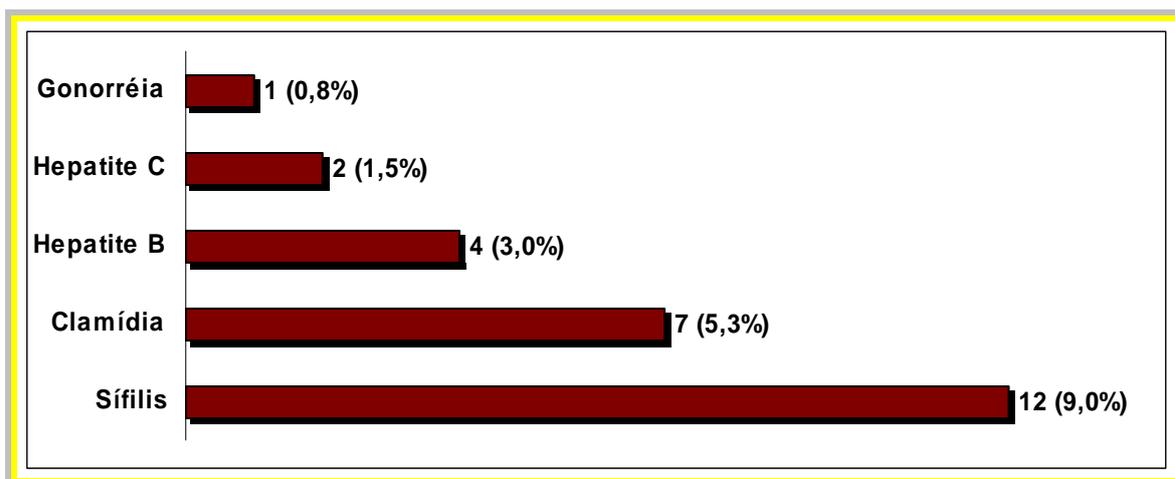
A aquisição da infecção pelo HIV através do contato heterossexual foi referida por 83,0% das gestantes. Em uma delas a aquisição da infecção foi atribuída à história de hemotransfusão e em 16% não foi possível determinar a categoria de exposição (Figura 9).



**Figura 9** - Categoria de exposição ao HIV das gestantes acompanhadas no HGNI. Rio de Janeiro, 2005-2008 (N = 139). Fonte: Elaborado pelo Autor.

## 5.3 OUTRAS INFECÇÕES SEXUALMENTE TRANSMISSÍVEIS

Entre as mulheres que realizaram coleta de amostras de urina (PCR) e sangue (exames sorológicos) para rastreamento de outras infecções sexualmente transmissíveis (IST), 16,5% foi diagnosticada com outra IST na visita de inclusão na coorte. Diagnósticos de sífilis, clamídia, gonorréia, hepatites B e C foram realizados, respectivamente, em 9,0%, 5,3%, 0,8%, 3,0% e 1,5% das mulheres (FIGURA 10). Sorologia reagente para o herpes vírus tipo 2 foi observada em 65,1% (n = 88) das gestantes.



**Figura 10** - Prevalência de ISTs diagnosticadas na visita de inclusão das gestantes acompanhadas no HGNI. Rio de Janeiro, 2005-2008 (N=133). Fonte: Elaborado pelo Autor.

#### 5.4 OUTRAS TESTAGENS SOROLÓGICAS NO PRÉ-NATAL

Os resultados dos exames sorológicos realizados na visita de inclusão das gestantes na coorte estão apresentados no quadro 6. Casos de infecção aguda/recente (IgM reagente) para toxoplasmose, rubéola e citomegalovírus foram observados em 2,2%, 2,2% e 6,7% das gestantes, respectivamente.

Número de Gestantes testadas (n=135)	Reagente	Não Reagente
<b>Toxoplasmose IgG</b>	<b>74,0% (100/135)</b>	<b>25,9% (35/135)</b>
<b>Toxoplasmose IgM</b>	<b>2,2% (3/135)</b>	<b>97,7% (132/135)</b>
<b>Rubéola IgG</b>	<b>87,4 (118/135)</b>	<b>12,5% (17/135)</b>
<b>Rubéola IgM</b>	<b>2,2 (3/135)</b>	<b>97,7% (132/135)</b>
<b>Citomegalovírus IgG</b>	<b>90,3% (122/135)</b>	<b>9,6% (13/135)</b>
<b>Citomegalovírus IgM</b>	<b>6,7% (9/135)</b>	<b>92,5% (125/135)</b>

**Quadro 6** - Prevalência de infecção por *toxoplasma goondi*, pelo vírus da rubéola e por citomegalovírus nas gestantes no momento da visita de inclusão na coorte (n = 135). Fonte: Elaborado pelo Autor.

## 5.5 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS, IMUNOLÓGICAS E DA GESTAÇÃO

A média e a mediana do tempo decorrido desde o diagnóstico do HIV até o momento da inclusão na coorte foi de 249,8 dias (DP: 515,7) e 49 dias (IQI: 24-333). Dois terços das mulheres tiveram o diagnóstico de infecção pelo HIV durante a atual gestação, apesar de 80,5% do total de mulheres ter reportado ao menos uma gestação anterior. A média e a mediana do número de gestações anteriores nesta população foram de 2,3 (DP: 1,9) e 2,0 (IQI: 1,0-3,0).

A média e a mediana da idade gestacional no início do pré-natal foram de 24,5 (DP: 8,0) e 24,0 (IQI: 19,0-30,0), respectivamente. Cerca de 40,0% das gestantes iniciou o pré-natal durante o terceiro trimestre da gestação.

A maioria das mulheres (79,7%) apresentou contagem de linfócitos CD4+ pré-HAART igual ou superior à 350 cels./mm<sup>3</sup> e 8,8% apresentavam carga viral pré-HAART indetectável.

Esquema anti-retroviral contendo inibidor de protease foi prescrito para 77,7% das gestantes, enquanto que para as demais foi prescrito esquema contendo inibidor de transcriptase reversa não-nucleosídeo. Substituição de anti-retroviral devido à evento adverso ocorreu em 7,2% das gestantes, sendo o evento adverso gastrointestinal o mais freqüente (n = 36; 26,1%). A média e a mediana do tempo de uso de HAART foram 84,6 dias (DP: 47,2) e 84,0 (IQI: 43,0-122,0), respectivamente.

**Tabela 3** - Características relacionadas à infecção pelo HIV/AIDS das gestantes acompanhadas no HGNI. Rio de Janeiro, 2005-2008 (N = 139).

<b>Características<sup>a</sup></b>		<b>N</b>	<b>%</b>
<b>Número de gestações anteriores</b> (N = 139)	Nenhuma	27	19,4
	1-2	59	42,4
	3 ou mais	53	38,1
<b>Momento do diagnóstico do HIV</b> (N = 139)	Durante esta gestação	94	67,6
	Anterior a esta gestação	45	32,4
<b>Infecção recente pelo HIV – Calypte (BED)</b> (N = 137)	Sim	19	13,9
	Não	118	86,1
Sem informação – 2 (1,4%)			
<b>Idade gestacional no início do pré-natal no HGNI em semanas</b> (N = 138)	< 14	13	9,4
	14-27 semanas	69	50,0
	≥ 28 semanas	56	40,6
Sem informação – 1 (0,7%)			
<b>Contagem de linfócitos CD4 (cels/mm3) pré-HAART</b> (N = 138)	250-349	28	20,3
	350-500	37	26,8
	> 500	73	52,9
Sem informação – 1 (0,7%)			
<b>Carga viral pré-HAART</b> (N = 137)	≤ 80 cópias/mm-3	12	8,8
	81-400 cópias/mm-3	9	6,6
	≥ 401 cópias/mm-3	116	84,7
Sem informação – 2 (1,4%)			
<b>Esquema HAART na gestação</b> (N = 139)	Inibidor de protease	108	77,7
	ITRNN	31	22,3

<sup>a</sup> Números variam devido à informação ignorada

## 5.6 CARACTERÍSTICAS RELACIONADAS AO PARTO

A maioria das mulheres (65,2%) foi submetida à cesariana, sendo que em 5,1% este procedimento foi realizado em decorrência de emergência obstétrica. Complicações durante o parto ocorreram em 7,4% das gestantes, sendo 1 placenta prévia, 1 corioamniotite e 1 circular de cordão.

Cerca de 25% das gestantes, das quais foi obtida amostra de sangue no parto (n = 125), apresentou RNA do HIV-1 maior do que 400 cópias/mL. Administração intravenosa de zidovudina foi realizada em 93,5% das gestantes.

Complicações após o parto ocorreram em 5,2% das gestantes. Duas gestações (1,5%) resultaram em filhos natimortos. As características relacionadas ao parto das gestantes incluídas neste estudo estão apresentadas na tabela 4.

## 5.7 CARACTERÍSTICAS RELACIONADAS AOS RECÉM-NATOS DAS GESTANTES

A média e a mediana da idade gestacional no momento do parto foram de 38,1 (DP: 2,0) e de 39,0 (IQI: 38,0-39,0) semanas, respectivamente, sendo que 12,2% das gestantes tiveram parto com menos de 37 semanas de gestação. A média e a mediana do peso do recém-nato ao nascer foi de 2.969,0 (DP: 503,6) e de 2.995,0 (IQI: 2790,0-3.265,0) gramas, respectivamente, sendo que baixo peso ocorreu em 13,8% deles.

Aleitamento artificial ocorreu em 98,5% dos recém-natos e zidovudina xarope foi administrada pelo período de 6 semanas em 97,7% dos recém-natos. Dentre os recém-natos que foram acompanhados até a definição do diagnóstico da infecção pelo HIV (n = 130), nenhum caso de transmissão vertical foi observado. As

características relacionadas aos recém-natos das gestantes incluídas neste estudo estão apresentadas na tabela 5.

**Tabela 4** - Características relacionadas ao parto das gestantes com HIV/AIDS acompanhadas no HGNI. Rio de Janeiro, 2005-2008 (N = 139).

<b>Características<sup>a</sup></b>		<b>N</b>	<b>%</b>
<b>Carga viral no parto</b> (N = 125)	≤ 80 cópias/mm-3	75	60,0
	81-400 cópias/mm-3	20	16,0
	≥ 401 cópias/mm-3	30	24,0
	Sem informação – 14 (10,1%)		
<b>Tipo de parto</b> (N = 138)	Cesariana eletiva	83	60,1
	Cesariana de urgência	7	5,1
	Vaginal	48	34,8
Sem informação – 1 (0,7%)			
<b>Complicações no parto</b> (N = 135)	Sim	10	7,4
	Não	125	92,6
Sem informação – 4 (2,9%)			
<b>Complicações após o parto</b> (N = 134)	Sim	7	5,2
	Não	127	94,8
Sem informação – 5 (3,6%)			
<b>Fez uso de AZT durante o trabalho de parto</b> (N = 139)	Sim	130	93,5
	Não	9	6,5

<sup>a</sup> Números variam devido à informação ignorada

**Tabela 5** - Características relacionadas aos recém-natos das gestantes com HIV/AIDS acompanhadas no HGNI. Rio de Janeiro, 2005-2008 (N = 139).

Características <sup>a</sup>		N	%
<b>Idade gestacional no parto em semanas</b> (N = 139)	≥ 37	122	87,8
	<37	17	12,2
<b>Peso ao nascer</b> (N = 138)	≥ 2500g	119	86,2
	< 2500g	19	13,8
Sem informação – 1 (0,7%)			
<b>Recém-nato recebeu aleitamento materno</b> (N = 137)	Sim	2	1,5
	Não	135	98,5
Sem informação – 2 (1,4%)			
<b>Recém-nato recebeu AZT xarope</b> (N = 130)	Sim, por 6 semanas	127	97,7
	Sim, por menos de 6 semanas	2	1,5
	Não	1	,8
Sem informação – 9 (6,5%)			
<b>Transmissão vertical</b> (N = 130)	Não infectada	130	100,0
	Infectada	0	0,0
Sem informação – 4 (2,9%)			

<sup>a</sup> Números variam devido à informação ignorada

## 5.8 ANÁLISES DA CONTAGEM DE LINFÓCITOS CD4 E DA QUANTIFICAÇÃO DO RNA HIV-1

### 5.8.1. Médias e medianas da contagem de linfócitos CD4 e do RNA do HIV-1 nas visitas de inclusão (pré-HAART), 6-8 semanas pós-HAART, parto e 6 meses após o parto

A média e a mediana da contagem de linfócitos CD4+ visita de inclusão na coorte (pré-HAART) foi de 547,9 (DP: 232,6) e 518,5 (IQI: 378,0-625,0), respectivamente. A média e a mediana da quantificação do RNA HIV-1 nesta visita foi de 25.428,5 (DP: 69.527,4) e 7.800 (IQI: 1.200-26.000), respectivamente.

Na avaliação realizada entre 06 e 08 semanas após a introdução dos anti-retrovirais, a média e a mediana da contagem de linfócitos T CD4+ foi de 622,2 (DP: 270,4) e 562,5 (IQR: 432,0 – 752,0) céls/mm<sup>3</sup>, respectivamente. A média e a mediana da quantificação de RNA viral para HIV-1 nesta visita foi de 15.219,2 (DP: 90.050) e de 80 (IQR: 80-2.609) cópias/ml, respectivamente.

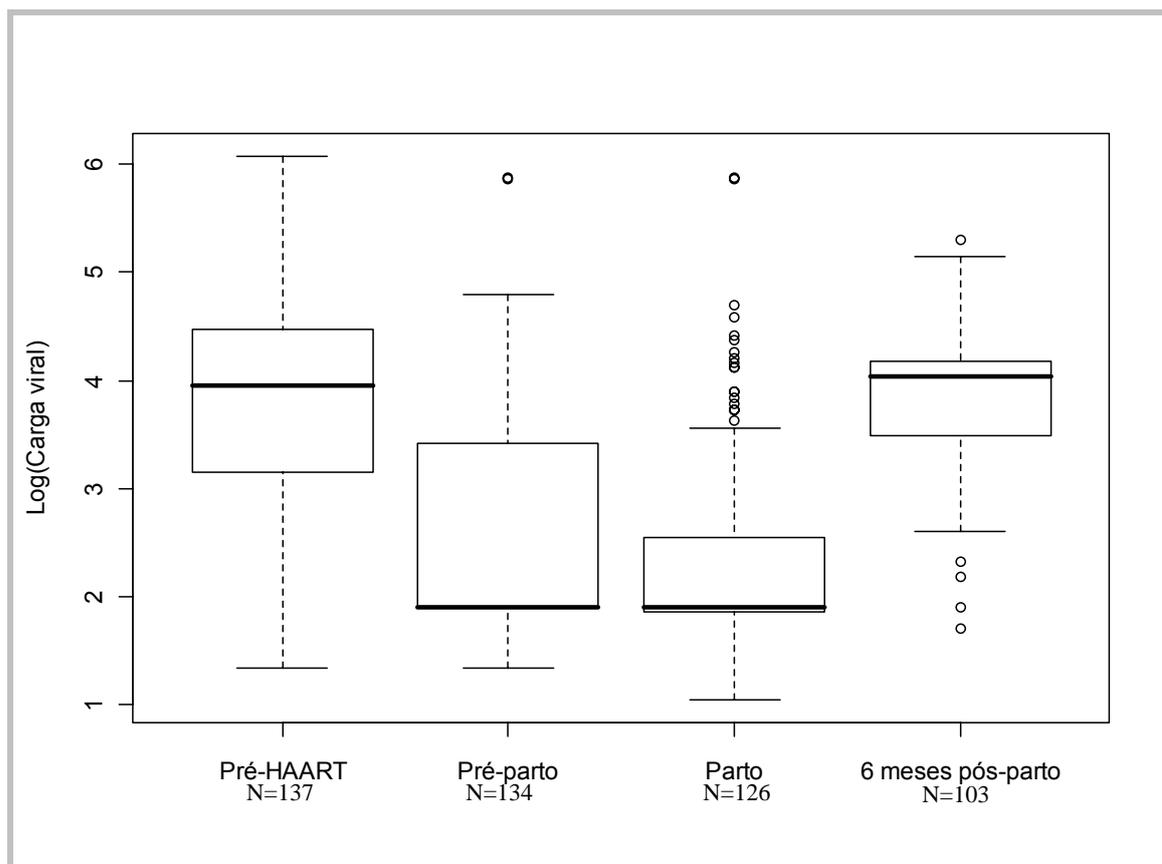
Na avaliação realizada no parto, a média e a mediana da contagem de linfócitos T CD4+ foi de 683,8 (DP: 288,6) e 618,0 (IQR: 483,0 – 843,0) céls/mm<sup>3</sup>, respectivamente. A média e a mediana da quantificação de RNA viral para HIV-1 nesta visita foi de 13.621,3 (DP: 93.164,4) e de 80,0 (IQR: 80,0-350,0) cópias/ml, respectivamente.

Na avaliação realizada 6 meses após a interrupção dos anti-retrovirais, a média e a mediana da contagem de linfócitos T CD4+ foi de 606,9 (DP: 276,0) e 524,0 (IQR: 440,0 – 710,0) céls/mm<sup>3</sup>, respectivamente. A média e a mediana da quantificação de RNA viral para HIV-1 foi de 24701,4 (DP:53.921,2) e de 7.399 (IQR:1.431-21.000) cópias/ml.

A média e a mediana da contagem de linfócitos T CD4+ e da quantificação de RNA viral para HIV-1 estão apresentados na tabela 6 e na figura 11.

**Tabela 6** - Médias e medianas da contagem de linfócitos CD4 das gestantes nas visitas de inclusão e de seguimento na coorte.

Contagem de Linfócitos CD4	Visita na Coorte			
	<b>Inicial (Pré-HAART) N=137</b>	<b>6-8 semanas N = 134</b>	<b>Parto N = 127</b>	<b>6 meses N = 107</b>
Média (DP)	547,9 (232,6)	622,2 (270,4)	683,8 (288,6)	606,9 (276,0)
Mediana (IQI)	518,5 (378,0-625,0)	562,5 (432,0-752,0)	618,0 (483,0-843,0)	524,0 (440,0-710,0)



**Figura 11** - Medianas e intervalo interquartilico (Boxplot) do  $\text{Log}^{10}$  da carga viral, segundo momento de coleta, das gestantes acompanhadas no HGNI. Rio de Janeiro, 2005-2008 (N = 139). Pré-parto = 6-8 semanas após início de HAART. Fonte: Elaborado pelo Autor.

### 5.8.2 Análise comparativa por teste pareado de Wilcoxon da contagem de linfócitos CD4 nas visitas de inclusão (pré-HAART) e de 6 meses após interrupção de HAART

Os resultados das análises da comparação dos linfócitos CD4 e da carga viral entre as coletas pré-HAART e 6 meses após o término da HAART estão apresentadas na tabela 7.

A comparação dos níveis de linfócitos CD4 entre as visitas de inclusão na coorte e de seis meses após a interrupção de HAART foi realizada para 90 mulheres. As medianas das contagens de linfócitos CD4 na visita de inclusão (pré-HAART) e de seis meses após a interrupção de HAART foi de 509 (IQR:378,2-635,0) e de 514 (IQR: 420,0-690,0) células/ $\text{mm}^3$ , respectivamente. A diferença entre

as medianas da contagem de linfócitos CD4 observada através do teste pareado de Wilcoxon foi estatisticamente significativa ( $p=0,03$ ).

A comparação dos níveis de RNA do HIV-1 entre as visitas de inclusão na coorte e de seis meses após a interrupção de HAART foi realizada para 86 mulheres. As medianas dos níveis de RNA do HIV-1, considerando a escala logarítmica, na visita de inclusão (pré-HAART) e de seis meses após a interrupção de HAART foi de 3,86 (IQR: 2,99-4,36) e de 3,93 (IQR: 3,01-4,42) cópias/mL, respectivamente. A diferença entre as medianas dos níveis de RNA do HIV-1 observada através do teste pareado de Wilcoxon não foi estatisticamente significativa ( $p=0,80$ ).

**Tabela 7** - Mediana, intervalo interquartilico e resultado do teste de Wilcoxon dos valores observados de Linfócito CD4 e Carga viral nas coletas pré-HAART e 6 meses após interrupção do HAART.

Momento da coleta	Linfócitos CD4 N=90		Carga Viral N=86	
	Mediana (IQR)	Teste Wilcoxon Pares	Mediana (IQR)	Teste Wilcoxon Pares
Pré-HAART	509,0 (378,2-635,0)	+55 <sup>a</sup> -35 <sup>b</sup> =0 <sup>c</sup>	3,86 (2,99-4,36)	+43 <sup>a</sup> -43 <sup>b</sup> =0 <sup>c</sup>
6 meses após interrupção da HAART	514,0 (420,0-690,0)	P=0,03	3,93 (3,01-4,42)	P=0,80

<sup>a</sup> valor 6 meses após interrupção do HAART > valor pré-HAART

<sup>b</sup> valor 6 meses após interrupção do HAART < valor pré-HAART

<sup>c</sup> valor 6 meses após interrupção do HAART =valor pré-HAART

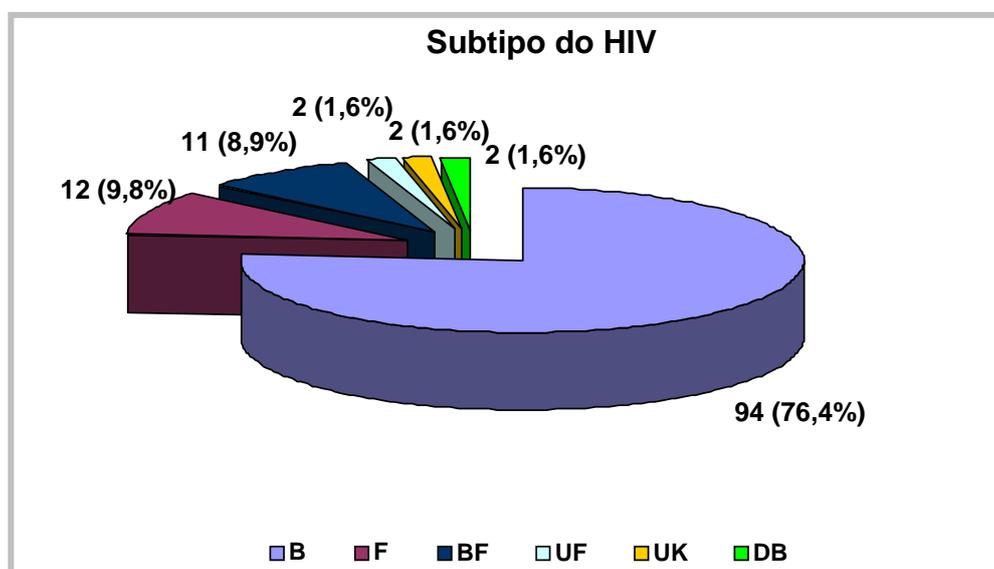
## 5.9 ANÁLISE DE INFECÇÃO RECENTE PELO CALYPTE HIV-1 BED EIA

Dezenove gestantes (13,9%) foram classificadas como soroconvertores recentes (SR) para infecção pelo HIV-1 com base no ensaio sorológico de competição BED-EIA, enquanto que as demais apresentaram perfil sorológico de soroconversão de longo termo (SLT). Nos casos classificados como incidentes, a mediana da contagem dos linfócitos CD4 e da carga viral para o HIV-1 foi de 575 células/mm<sup>3</sup> (IQR, 433 - 891) e de 6.392 cópias/mL (IQR, 537-18.000), respectivamente. Nos casos classificados como prevalentes, a mediana da contagem dos linfócitos CD4 e da carga viral para o HIV-1 foi de 494 células/mm<sup>3</sup> (IQR, 364 - 598) e de 8.000 cópias/mL (IQR, 1340 - 27.000). Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre as medianas de carga viral para HIV-1 entre os casos classificados como incidentes e aqueles classificados como prevalentes ( $p = 0,18$ ). Dentre as mulheres classificadas como SR, 21,0% (4/19) apresentou mutações principais de resistência primária nas seqüências obtidas das amostras da visita de inclusão na coorte (antes do início do tratamento). A carga viral para o HIV-1 na amostra de inclusão na coorte foi maior do que 10.000 cópias em 2/4 casos e menor do que 10.000 cópias nos outros dois casos.

## 5.10 ANÁLISE FILOGENÉTICA DA REGIÃO DA POLIMERASE VIRAL

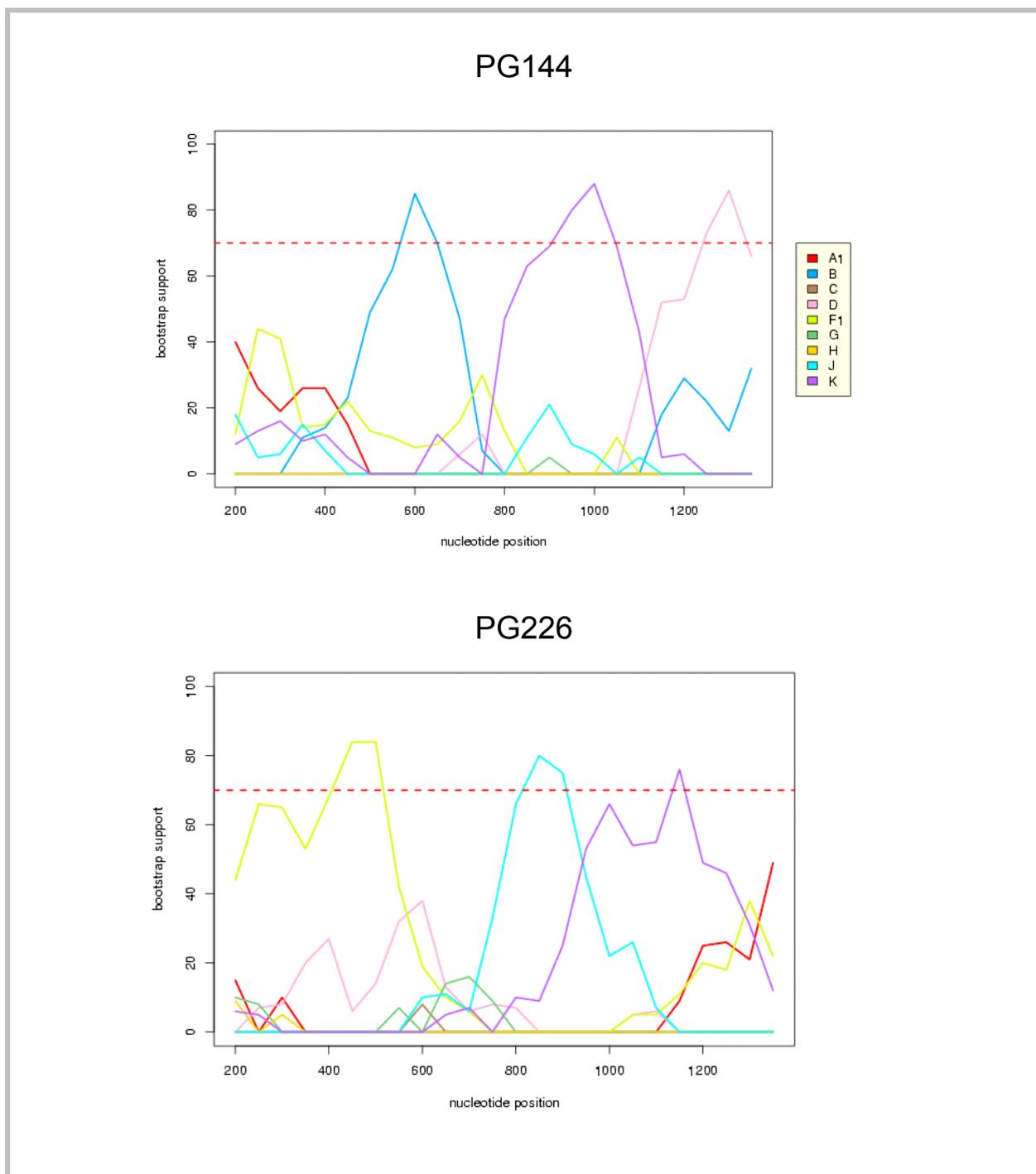
O subtipo do HIV foi determinado em 123/139 (88,4%) amostras para a polimerase, incluindo as regiões da protease e da transcriptase reversa; 16 mulheres apresentaram carga viral abaixo do limite de detecção em todas as amostras (visita inicial e visitas de seguimento), não sendo, portanto, possível a avaliação do subtipo viral. O subtipo B foi identificado em 94/123 (76,4%) amostras e subtipos não-B em 29/123 (23,5%) amostras. Dentre estas, 12/123 (9,7%) foram identificadas como subtipo F e 17/123 (13,8%) como perfis recombinantes. A Figura 12 apresenta os

percentuais dos subtipos e genomas recombinantes de HIV-1 observados entre as gestantes incluídas neste estudo. Cabe ressaltar que todas as gestantes com perfil sorológico de infecção recente estavam infectadas pelo subtipo B do HIV-1. A Figura 13 é representativa das análises filogenéticas utilizadas na determinação dos subtipos de HIV-1 determinados com base na região da polimerase dos genomas virais analisados. Os genomas recombinantes, identificados inicialmente através do programa REGA, foram excluídos da análise. Entre estes, 11/123 (8,9%) amostras correspondiam a infecções por subtipo BF, 2/123 (1,6%) por subtipo UF, 2/123 (1,6%) por subtipo DB e 2/123 (1,6%) por subtipo UK. Entre os genomas BF verificamos um alto grau de polimorfismo, onde cada amostra correspondia a uma forma recombinante única (URF) (Figura 14). Foi verificada ainda a ocorrência de duas amostras apresentando genomas recombinantes entre os subtipos K e os subtipos B e D (PG144) e FJ (PG226) (Figura 15).

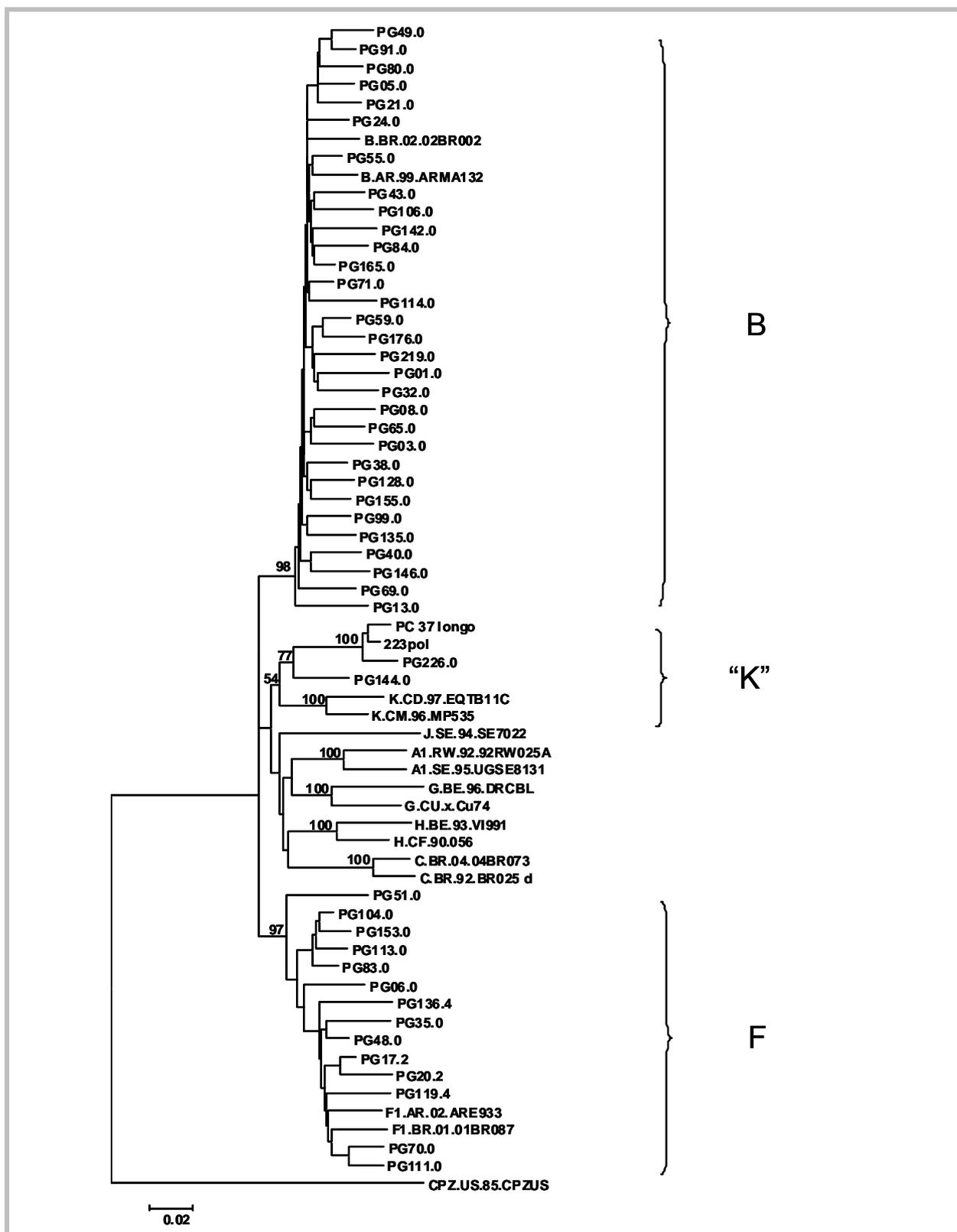


**Figura 12** - Subtipos do HIV-1 e genomas recombinantes identificados nas gestantes acompanhadas no HGNI. Rio de Janeiro, 2005-2008 (N = 123). Fonte: Elaborado pelo Autor.





**Figura 14** - Representação gráfica da análise de seqüências nucleotídicas do gene pol de genomas recombinantes do HIV-1 associados ao subtipo K. Fonte: Elaborado pelo Autor após avaliação por bootscanning através da ferramenta REGA HIV-1 Subtyping Tool versão 2.0, com janelas de 400pb, movendo em passos de 50pb.



**Figura 15** - Análise filogenética do gene pol de amostras de HIV-1. Fonte: Elaborado pelo Autor a partir de gestantes soropositivas para o HIV acompanhadas no HGNI. Rio de Janeiro, 2005-2008. O alinhamento foi realizado com amostras de referência do grupo M do HIV-1 e o SIVcpz. As amostras do estudo estão representadas em negrito. A análise filogenética foi realizada através do método de *Neighbor joining* com *pairwise distance* incluídas no pacote Mega 4.0.. Foi considerado o valor de bootstrap de 70 para os grupos filogeneticamente relacionados.

## 5.11 ANÁLISE DA PRESENÇA DE MUTAÇÕES DE RESISTÊNCIA DO HIV-1 AOS ANTI-RETROVIRAIS

### 5.11.1 Análise de Resistência Primária

A genotipagem foi obtida para 123/139 (88,4%) gestantes na visita de inclusão na coorte. Em 19/123 (15,4%) gestantes foram detectadas mutações da lista SDRM (Quadro 7). Mutações principais foram detectadas em 14/123 (11,3%) gestantes e foram consideradas para o cálculo da prevalência de resistência primária. Outras 5/123 (4,0%) gestantes apresentavam exclusivamente mutações consideradas “borderline/suspeitas”. Todas elas foram identificadas como pertencentes ao subtipo B. Entre as 19 gestantes que apresentavam qualquer mutação de resistência primária (principal ou borderline/suspeita), 5 (26,3%) eram soroconvertores recentes.

#### 5.11.1.1 Resistência Primária aos Inibidores da Transcriptase Reversa Análogo aos Nucleosídeos

Mutações principais para os ITRN foram detectadas em 10/123 (8,1%) gestantes. Dentre o total das gestantes, 1,6% (2/123) apresentou a mutação **M41L** que confere resistência de nível intermediário a alto para a Zidovudina (AZT) e Estavudina (d4T) e baixo nível de resistência para a Didanosina (ddl), Abacavir (ABC) e Tenofovir (TDF), 0,8% (1/123) apresentou a mutação **D67N** que contribui com algum grau de resistência para cada um dos ITRN, exceto para a Lamivudina (3TC) e Emtricitabina (FTC), 0,8% (1/123) apresentou a mutação **M184V** que gera resistência às drogas Emtricitabina (FTC) e Lamivudina (3TC) e baixos níveis *in vitro* ao ddl e ABC; esta última mutação também é conhecida por reverter parcialmente a resistência ao AZT, d4T e TDF causadas por outras mutações à AZT. Essa última gestante também apresentava a mutação **V179D**, considerada borderline/suspeita na lista SDRM, mas que pode reduzir a sensibilidade à Nevirapina em duas a cinco

vezes. As mutações **T215S/I** e **K219R** foram detectadas em 2,4% (3/123) e 2,4% (3/123), respectivamente, e ambas conferem baixos níveis de resistência às drogas Zidovudina (AZT) e Estavudina (d4T) e reduzem a susceptibilidade ao ABC, ddl e TDF.

#### 5.11.1.2 Resistência Primária aos Inibidores da Transcriptase Reversa Não Análogo aos Nucleosídeos

Mutações principais de resistência primária para os ITRNN foram detectadas em 4/123 (3,2%) gestantes. Entre o total de gestantes, 1,6% (2/123) apresentaram a mutação **K103N**, que isoladamente causa alto nível de resistência para a Nevirapina e Efavirenz, mas não tem efeito sobre a Etravirina. Em uma destas gestantes, além da mutação **K103N**, também foi detectada a mutação **Y181C** que confere alto nível de resistência para a Nevirapina (NVP), baixo nível de resistência para o Efavirenz (EFV), reduz em 5-10 vezes a sensibilidade a Etravirina (ETR), além de aumentar a sensibilidade ao AZT e Tenofovir (TDF).

Uma gestante apresentou a mutação **K101E** que está associada com resistência de nível intermediário para a NVP e de baixo nível para o EFV e ETR. Outra gestante apresentou a mutação **E138K** que é selecionada *in vitro* pela ETR e reduz a sensibilidade a esta droga em até 5 vezes. Para essa última gestante foi detectada também a mutação **V179E** que é considerada “borderline/suspeita” pela lista SDRM.

#### 5.11.1.3 Resistência Primária aos Inibidores da Protease

Não foram detectadas mutações principais para os IP pela lista SDRM. Quatro gestantes apresentaram mutações consideradas “borderline/suspeitas” para os IP. Três gestantes apresentaram a mutação **M46L** que diminui a sensibilidade ao Indinavir (IDV), Nelfinavir (NFV), Fosamprenavir (FPV), Atazanavir (ATV) e Tipranavir (TPV). A outra gestante apresentava a mutação **L33F** acompanhada da mutação **V77I**.

ID	Subtipo	HIV-1 RNA Inicial	Mutações ITRN	Mutações ITRNN	Mutações Protease	Resistência
Pg_01 BED SLT	B/B	7.500	V35T, M41L, V60I, I135T, D177E, I178M, R211K, T215L, V245K, D250E, A272P, K277R, T286A, I293V, G333E, Q334L	-	T4I, K14R, I15V, G17E, D60E, L63S, L63P, I64V, H69Y, K70R, I72V	AZT <sup>↑</sup> , d4T
Pg_13 BED SLT	B/B	27.000	K20R, V35L, T39A, W88C, K173E, I178L, G196E, I202V, E204D, F214L, D218E, K219R, V245L, K281R, L283F, T286A, A288S, I293V, P294T, E297R, D324E, Q334E	-	L10I, L10V, L19V, E35D, L63S, K70R	AZT, d4T
Pg_36 BED SLT	B/B	6.800	K49R, D67N, K122E, I142V, Y146S, Y146F, L149F, S162C, D177E, I178L, T200A, I244V, V245K, D250E, A272P, I293V	-	G16E, N37I, R57K, D60E, Q61D, I62V	AZT, d4T
Pg_39 BED SLT	B/B	32.000	K20R, K43N, K43Q, K43H, K49R, I50V, K104N, K104T, T200A, E204K, V245I, E248D, A272P, K277R, L283I, I293V, E297K, D324E	V179E	L19I, K20T, M36I, R57K, D60E, I62V, L63P, I64V, H69Q	NVP, EFV
Pg_41 BED SR	B/B	6.100	M16T, K20R, W88G, K122E, T131S, I135Q, P170S, I202V, Q207H, R211K, T215S, D250E, N265D, A272P, K277R, K311R, D324E, L325V	-	T12A, K14R, I15V, M36I, N37T	AZT, d4T
Pg_57 BED SLT	B/B	1.400	G18V, K30N, K32S, K32R, K32N, E40D, M41V, K43G, K43R, K43E, E44G, K46N, I50S, K64E, K66R, D76H, F87L, V90A, D121H, K122E, I135T, Q161K, S162W, S162C, H198Y, R211S, R211M, R211I, F214L, E233K, V245Q, T286A, V292I, I293V, E297A, K323R, I329L	K101E	T12N, I15V, L19I, E35D, M36I, N37S, R41K, L63P, A71T, I93L	NVP
Pg_58 BED SLT	B/B	40.000	I135T, K166R, G196K, V245I, A272G, I293V, E297K, Q334L	-	T12A, I15V, Q18L, L19I, R41K, M46L, L63V, K70R, P79D	NFV, ATV, FPV.
Pg_65 BED SLT	B/B	7.600	K20R, S48T, K49R, D86S, K102Q, K122E, I135T, Y183N, I195L, I202V, Q207H, R211K, T215S, V245K, V245M, V245E, K249R, S251I, A272P, K277R, K311R, D324E, L325V, I326V, I329L	-	M36I, N37A	AZT, d4T
Pg_69 BED SLT	B/B	5.600	T7A, K11N, K20R, I31L, V35I, G45V, K49R, E53G, Q91H, S117P, K122E, I135T, F160S, G196R, T200I, I202V, F214L, T215I, K277R, T286A, A288S, I293V, P294T, S322	-	T12N, E35D, N37S, R41K, P44S, I62V, L63P, H69Q, K70N, V77I, N98K	AZT, d4T
Pg_103 BED SLT	B/B	8.600	K43R, I135T, A158S, S162C, E169D, R211K, V245E, E248K, A272P, K277R, I293V, P294T, S322A	-	L33F, N37S, R57K, Q61N, I64M, V77I, L89M	TPV, ATV, FPV.
Pg_107 BED SR	B/B	18.000	M41R, K65T, T69I, K73R, F77S, K102T, K104R, I132V, S134R, I135T, S163T, M184R, V189I, K201R, I202M, R211K, F214L, K219R, K238R, W239L, V245T, K249R, K281R, T290R, I293V, D324E, I329L	-	K14R, D29N	AZT, d4T
Pg_110 BED SLT	B/B	30.000	K11R, K20R, V35E, I50L, D121H, K122E, I178L, T200I, Q207K, F214L, D250E, I274V, K287R, V292I, I293V, E297A, S322A	K103N	I13V, K14R, E35D, L63P, I64M, A71V, V77I, I93L	NVP, EFV
Pg_112 BED SR	B/B	19.000	K20R, I135T, S162C, D177E, F214L, V245K, V292I, I293V, I326V, Q334L	E138K V179E	I13V, L19I, M36L, R57K, I62V, L63Q, E65D, I93L	NVP

ID	Subtipo	HIV-1 RNA Inicial	Mutações ITRN	Mutações ITRNN	Mutações Protease	Resistência
Pg_117 <b>BED</b> <b>SR</b>	B/B	6.900	K20R, K122P, D123E, I135T, I142V, <b>D177N</b> , T200A, R211K, F214L, <b>H221Y</b> , V245M, A272P, K277R, A288S, I293V, E297T, A327V	<b>K103N</b> , <b>Y181C</b>	E35D, N37D, L63P, I72V	<i>NVP, EFV</i>
P_g125 <b>BED</b> <b>SLT</b>	B/B	30.000	D121H, K122E, I135T, A158S, Q174E, <b>M184V</b> , T200A, F214L, E248D, K277R, I293V, K311R, S322A	<b>V179D</b>	E35D, D60E, I62V, L63P, V77I	<i>NVP, EFV</i> <i>3TC,FTC</i>
Pg_138 <b>BED</b> <b>SR</b>	B/B	18.000	K20R, V90I, A98S, K122E, K277R, T286A, I293V, <b>Q334R</b>	-	<b>T12R</b> , K14R, G16E, L19V, R41K, <b>M46L</b> , Q61N, L63T, C67S, I72T, V77I	<i>NFV, ATV</i> , <i>FPV.</i>
Pg_149 <b>BED</b> <b>SLT</b>	B/B	16.870	E6D, T39A, <b>M41L</b> , <b>K82R</b> , K122E, D123N, D123S, D123G, I135T, <b>N136D</b> , I142T, S162C, D177E, I178V, G196E, T200A, I202V, Q207K, <b>H221Y</b> , V245I, A272P, K277R, A288S, <b>E291G</b> , V292I, I293V, E297T, Q334L	-	I13V, G17E, I62V, L63P, A71T, V77I, I93L	<i>AZT</i> , <i>d4T,ddl,ABC</i>  <i>TDF</i>
Pg_156 <b>BED</b> <b>SLT</b>	B/B	26.592	K49R, K122E, D123N, I135T, <b>L149P</b> , T165I, D177E, G196E, T200A, I202V, F214L, <b>K219R</b> , V245I, A272P, I293V, <b>T296I</b> , K311R, D324E, G333E	-	I13V, R41K, L63P, <b>H69R</b> , K70R, I93L	<i>AZT, d4T</i>
Pg_169 <b>BED</b> <b>SLT</b>	B/B	1.330	K20R, V35T, T39M, <b>K70Q</b> , I135T, <b>I142G</b> , I142V, F171Y, <b>Q197P</b> , T200A, E204D, <b>E204G</b> , F214L, V245M, I293V, S322T, <b>Q334G</b>	-	<b>Q18H</b> , N37S, <b>M46L</b> , D60E, L63T, I64V, H69Y, A71V, I72T, V77I, <b>P79S</b> , <b>I85M</b> , <b>G86E</b> , I93L	<i>NFV, ATV</i> , <i>FPV.</i>

Em **vermelho** estão representadas as mutações principais, em **azul** estão representadas as mutações **suspeitas/borderline** em **verde** as mutações pouco encontradas.

**Quadro 7** - Perfil de mutações de resistência primária nos genes da protease e da transcriptase reversa e a sensibilidade aos anti-retrovirais na população de gestantes infectadas pelo HIV-1 com resistência primária (n = 19). Fonte: Elaborado pelo Autor.

### 5.11.2. Análise de mutações acessórias polimórficas e não polimórficas na região da Protease e da Transcriptase Reversa

#### 5.11.2.1 Mutações acessórias na região da Protease

O seqüenciamento do gene da protease viral foi realizado nas amostras de inclusão na coorte para 123 gestantes. As freqüências de mutações acessórias polimórficas para os inibidores de protease estão listadas abaixo e apresentados no quadro 8.

Entre os polimorfismos detectados, observamos a mutação **10I/V/F** em 8,9% das amostras; essa mutação ocorre geralmente em 5 a 10% dos pacientes não tratados, sendo esta uma mutação acessória responsável por conferir resistência aos IP apenas quando presente com outras mutações. A **13V** foi detectada em 22% das amostras, e é uma mutação que confere baixa resistência ao TPV apenas quando presente em associação com outras mutações.

A mutação **20M/R** foi encontrada em 10% das amostras do subtipo B e em 17,2% das amostras do subtipo não-B; esta mutação é frequentemente identificada em vírus subtipo não-B e está associada à resistência aos IP somente quando presente com demais mutações.

A mutação acessória **33I/V** foi encontrada em somente 2% das amostras do subtipo B. Sua forma **33I** é menos comum, porém pode ter efeito similar na diminuição da sensibilidade aos mesmos medicamentos desta classe quando presente com demais mutações.

A mutação acessória **36I/V/L**, que é uma mutação polimórfica frequentemente identificada em vírus subtipo não-B, e confere baixa resistência aos IP quando em combinação com outras mutações, foi encontrada em 55,2% das gestantes infectadas com subtipo não-B e em 21,3% nas gestantes infectadas com o subtipo B.

Os polimorfismos **71V/T/I** (12,8%) e **85V** (1,0%) foram encontrados somente em amostras do subtipo B, estes polimorfismos ocorrem em cerca de 2% da população não tratada, sendo considerado uma mutação acessória.

A mutação **77I** foi encontrada em 28,7% das amostras do subtipo B e em 6,9% das amostras do subtipo não-B. É um polimorfismo comum em vírus do subtipo B, e está associado ao uso de NFV quando presente com demais mutações (Bossi, Mouroux et al. 1999).

Os polimorfismos **93L**, **69K** e **16A/E** mostraram-se em proporções equivalentes entre as amostras subtipo B e não-B. O polimorfismo **93L** geralmente é encontrado em isolados virais de pacientes tratados com Indinavir e Nelfinavir.

A mutação **63P** foi a mais prevalente (41,5%), sendo detectada em 45,7% das gestantes infectadas por vírus subtipo B e em 27,6% das infectadas por vírus subtipo não-B. O polimorfismo **63P** é muito freqüente e significativamente associado com tratamento anti-retroviral, geralmente associado ao uso de Lopinavir/Ritonavir (Masquelier, Breilh et al. 2002).

As mutações **60E** (17% e 6,9%), **62V** (22,3% e 3,4%) e **89L/M** (3,2% e 31%), respectivamente apresentadas em subtipos B e não-B se mostram como assinaturas específicas de diferentes subtipos.

Mutações Polimórficas	Subtipo do HIV		Total (N=123) n (%)
	B (N= 94) n (%)	Não-B (N=29) n (%)	
<b>10I/V/F/R</b>	9 (9,6)	2 (6,9)	11 (8,9)
<b>13V</b>	22 (23,4)	5 (17,2)	27 (21,9)
<b>16AE</b>	3 (3,19)	2 (6,9)	5 (4,0)
<b>20R/M/I</b>	10 (10,6)	5 (17,2)	15 (12,2)
<b>36I</b>	20 (21,3)	16 (55,2)	36 (29,2)
<b>60E</b>	16 (17,0)	2 (6,9)	18 (14,6)
<b>62V</b>	21 (22,3)	1 (3,4)	22 (17,9)
<b>63P</b>	43 (45,7)	8 (27,6)	51 (41,5)
<b>71V/T/I</b>	12 (12,8)	0 (0,0)	12 (9,7)
<b>77I</b>	27 (28,7)	2 (6,9)	29 (23,6)
<b>89LM</b>	3 (3,2)	9 (31,0)	12 (9,7)
<b>93L</b>	22 (23,4)	5 (17,2)	27 (21,9)
Mutações Não Polimórficas	B (N= 94) n (%)	Não-B (N=29) n (%)	Total (N=123) n (%)
<b>11I</b>	-	-	-
<b>35G</b>	-	-	-
<b>43T</b>	-	-	-
<b>58E</b>	-	-	-
<b>74P/A/S</b>	-	-	-
<b>83D</b>	-	-	-
<b>85V</b>	1(1,0)	0	1(0,81)
<b>89V</b>	-	-	-

**Quadro 8** - Prevalência de mutações acessórias polimórficas e não polimórficas detectadas na região da protease do HIV-1 nas amostras da visita de inclusão das gestantes na Coorte do HGNI. Fonte: Elaborado pelo Autor.

As mutações não polimórficas **11I**, **35G**, **43T**, **58E**, **79P/A/S**, **83D** e **89V** não foram detectadas nas amostras analisadas.

Dentre as 123 amostras amplificadas, 31 (25%) apresentavam genoma selvagem para a região da protease, ou seja, não apresentavam mutações associadas à resistência aos IP.

#### 5.11.2.2 Mutações acessórias na região da Transcriptase Reversa

A análise do gene da transcriptase reversa também foi realizada para as 123 gestantes que tiveram amostras amplificadas no estudo. Entre as mutações acessórias detectadas, podemos citar a **118I**, **44A/D**, **67E/G**, **69S/A/I** e **333DE** (Quadro 9).

Na nossa casuística a mutação acessória **118I** foi detectada em 6,4% das amostras do subtipo B, e em uma amostra 0,8% (1/123) estava associada com a mutação **E44D**. A mutação **118I** aparece em isolados de pacientes tratados com múltiplos inibidores Nucleosídeos, geralmente associadas a **44A** ou **44D**, e costuma ser um preditor de falha virológica em tratamento contínuo com HAART contendo d4T (Gianotti, Galli et al. 2006), e, de forma geral, pode ser considerado um marcador de progressão de doença (Zaccarelli, Tozzi et al. 2007).

Encontramos baixa prevalência da mutação **67EG** (0,8%) e da mutação **69S/A/I** (2,4%), e essas mutações foram detectadas em pacientes infectadas pelo subtipo B.

A mutação **333D/E** foi encontrada em 8,8% das amostras do subtipo B, e é um polimorfismo encontrado em até 11% de pacientes portadores de infecção pelo HIV-1, virgens de tratamento anti-retroviral (Gallego, Corral et al. 2002).

Não foram encontradas mutações acessórias aos Inibidores não-nucleosídeos da Transcriptase Reversa, somente mutações principais que já foram descritas anteriormente.

Observamos a presença do polimorfismo **G335C/D** em **9,7%** (12/123) das gestantes no momento da inclusão na coorte. Das gestantes que apresentavam esse polimorfismo, **75%** (9/12) estavam infectadas por vírus subtipo B, e **25%** (3/12) por subtipo não-B.

Mutações Acessórias Polimórficas	Subtipo do HIV		Total (N=123) n (%)
	B (N= 94) n (%)	Não-B (N=29) n (%)	
<b>44AD</b>	<b>1 (1,6)</b>	<b>0</b>	<b>1 (0,8)</b>
<b>67EG</b>	<b>1 (1,6)</b>	<b>0</b>	<b>1 (0,8)</b>
<b>69SAI</b>	<b>3 (3,2)</b>	<b>0</b>	<b>3 (2,4)</b>
<b>118I</b>	<b>6 (6,4)</b>	<b>0</b>	<b>6 (4,9)</b>
<b>333D/E</b>	<b>8 (8,5)</b>	<b>2 (6,8)</b>	<b>10 (8,1)</b>
<b>335CD</b>	<b>9 (9,5)</b>	<b>3 (10,0)</b>	<b>12 (9,7)</b>

**Quadro 9** - Prevalência de mutações acessórias polimórficas detectadas na região da Transcriptase Reversa de acordo com o subtipo do HIV nas amostras da visita de inclusão das gestantes na Coorte do HGNI. Fonte: Elaborado pelo Autor.

### 5.11.3 Análise das mutações detectadas após a introdução dos anti-retrovirais

A detecção de mutações de resistência após a introdução de terapia anti-retroviral de alta potência (HAART) neste estudo foi observada em **13,8%** (17/123) das mulheres; **7,3%** (9/123) desenvolveram mutações para os ITRN, **19%** (6/31) para os ITRNN e **3,2%** (3/92) para os IP. Em uma mulher foi detectada mutação para ITRN e para IP. O quadro 10 apresenta as incidências de mutações detectadas após a introdução de HAART, de acordo com a classe de ARV e com as mutações específicas de cada classe calculadas para o universo de mulheres que tiveram genotipagens satisfatórias em cada ponto. A incidência de mutação no parto, na visita de 02 e 04 semanas e de 06 meses foi de 14,0%, 10,7%, 8,4% e 2,0%, respectivamente. A maioria das mutações para os ITRN ocorreu na visita de 02 semanas, para os ITRNN na visita de 04 semanas e metade das mutações para IP na visita de 06 meses.

Classe ARV	Mutação	Parto n=genotipagens (n=14)	02 Semanas n=genotipagens (n=84)	04 Semanas n=genotipagens (n=107)	06 Meses n=genotipagens (n=103)
ITRN	V75A	-	1,1% (1/84)	-	-
	M184V	7,1% (1/14)	5,9% (5/84)	0,9% (1/107)	-
	K219E	-	-	-	1,0% (1/103)
	<b>Total</b>	7,1% (1/14)	7,1% (6/84)	0,9% (1/107)	1,0% (1/103)
ITRNN	K101E	-	-	0,9% (1/107)	-
	K103N	-	1,1% (1/84)	0,9% (1/107)	-
	V106A	-	-	1,8% (2/107)	-
	V179D	-	-	0,9% (1/107)	-
	Y181C	-	1,1% (1/84)	-	-
	Y188C	-	1,1% (1/84)	0,9% (1/107)	-
	G190A	-	-	0,9% (1/107)	-
<b>Total</b>	-	3,5% (3/84)	6,5% (7/107)	-	
IP	L33F	-	-	-	1,0% (1/103)
	M46L	-	-	0,9% (1/107)	-
	L90M	7,1% (1/14)	-	-	-
	<b>Total</b>	7,1% (1/14)	-	0,9% (1/107)	2,0% (2/103)
<b>Incidência global de mutações em cada ponto</b>		<b>14,0% (2/14)</b>	<b>10,7% (9/84)</b>	<b>8,4% (9/107)</b>	<b>2,0% (2/103)</b>

**Quadro 10** - Incidência de mutações detectadas após a introdução de HAART em cada visita, de acordo com a classe de ARV e com as mutações específicas. Fonte: Elaborado pelo Autor.

#### 5.11.4 Mutações de resistência secundária em gestantes que tinham mutação de resistência primária na visita de inclusão na coorte (n = 14)

Entre as gestantes que tinham mutações de resistência primária na amostra de entrada na coorte, **28,5%** (4/14) desenvolveram novas mutações após a interrupção da quimioprofilaxia (Quadro 11). Duas gestantes que apresentavam mutação de resistência primária para os ITRNN (**K103N e K103N+Y181C**) e outras duas que apresentavam resistência primária para os ITRN (**219R e D67N**), desenvolveram novas mutações após o início/interrupção dos anti-retrovirais. A mutação **V106A** foi detectada em duas gestantes após 04 semanas da interrupção da quimioprofilaxia com anti-retrovirais; em ambos os casos, as gestantes haviam feito uso de esquema contendo Nevirapina.

A mutação **M184V**, freqüente em indivíduos após tratamento com 3TC, foi encontrada em dois casos. Para uma gestante detectamos essa mutação na amostra colhida no parto, essa mesma mutação permaneceu detectável nas amostras colhidas 2 e 4 semanas após o parto, e não mais na amostra de 6 meses. Para a outra gestante, está mutação foi detectada somente na amostra colhida 2 semanas após o parto, apesar das amostras subseqüentes terem sido amplificadas e gerado boas seqüências. Em ambos os casos, as gestantes fizeram uso de Nelfinavir como parte do esquema anti-retroviral.

**Quadro 11** - Gestantes com mutação principal de resistência primária que desenvolveram novas mutações após a introdução dos anti-retrovirais (n = 14). Fonte: Elaborado pelo Autor.

Sub	ARV	ITRN Amostra Inicial	ITRNN Amostra Inicial	IP Amostra Inicial	RNA HIV- 1 Parto	ITRN Amostra parto/ pós parto	ITRNN Amostra parto/ pós parto	IP Amostra parto/ pós parto	Resistência
<sup>13</sup> B/B	<b>NVP</b>	<b>219R, D218E</b>	-	<b>L10V</b>	<80	-	<b>V106A 4sem</b>	-	NVP, EFV, ETR, AZT
<sup>36</sup> B/B	<b>NVP</b>	<b>D67N</b>	-	<b>G16E, D60E, I62V</b>	6.800	-	<b>V106A 4sem</b>	-	d4T, AZT, NVP, EFV, ETR
<sup>110</sup> B/B	<b>NFV</b>	-	<b>K103N</b>	<b>I13V,A71V, V77I,L63P, I93L</b>	1.600	<b>M184V Parto 2sem, 4sem</b>	-	<b>L10I</b>	FTC, 3TC, ABC, NVP, EFV,
<sup>117</sup> B/B	<b>NFV</b>	-	<b>K103N/ Y181C</b>	<b>L63P</b>	<80	<b>M184V 2sem</b>	-	-	3TC, FTC, ABC NVP, EFV ETR

O RNA do HIV-1 no momento do parto para as gestantes que tinham resistência primária e desenvolveram novas mutações estava assim distribuída: 02 tinham RNA do HIV-1 menor que 80 cópias/mL, enquanto outras 02 tinham RNA do HIV-1 maior que 80 cópias/mL. Todas encontravam-se infectadas por vírus subtipo B.

#### 5.11.5 Análise de mutações de resistência secundária em gestantes que não tinham mutação de resistência primária na entrada na coorte (n = 109)

Entre as gestantes que não tinham resistência primária na amostra de inclusão na coorte, **11,9%** (13/109) desenvolveram mutações de resistência após a introdução dos anti-retrovirais (Quadro 12). Dessa população de gestantes, dez eram infectadas por vírus subtipo B, enquanto três estavam infectadas por vírus subtipo não-B. Em relação ao esquema anti-retroviral utilizado, nove gestantes fizeram esquema contendo Nelfinavir e quatro utilizaram esquema contendo Nevirapina.

Cinco gestantes, 4,5% (5/109) desenvolveram a mutação **M184V**, sendo que uma delas também apresentou a mutação **L33I**. A mutação **M184V** foi detectada em 04 casos na amostra colhida duas semanas após o parto, mas não foi detectada nas amostras colhidas 04 semanas e 06 meses pós-parto. As cinco mulheres que desenvolveram a mutação **M184V** fizeram uso de esquema contendo Nelfinavir. Uma gestante desenvolveu a mutação **V75A**, que está associada à redução da sensibilidade aos ITRN, principalmente para o d4T.

Três mulheres que fizeram uso de esquema contendo Nevirapina desenvolveram mutações de resistência alto nível para os ITRNN e apresentaram as seguintes mutações: **K103N**, **K103N+Y188C+Y181C** e **K101E+Y188C+G190A**. Uma outra mulher desenvolveu a mutação **V179D**, que determina baixo nível de resistência para NVP, EFV e ETR. As mutações desenvolvidas para os ITRNN foram detectadas nas gestantes, na maioria das vezes, 04 semanas após o parto e estavam detectáveis nas amostras colhidas 06 meses após o parto.

Em relação às mutações desenvolvidas para os IP, as seguintes mutações de resistência foram detectadas: uma gestante apresentou a mutação **M46L** na amostra colhida 4 semanas após o parto; essa mutação determina baixo nível de resistência para NFV e SQV. Essa mesma gestante tinha a substituição **H208Y** na amostra pré-tratamento, que é um polimorfismo que pode facilitar a resistência ao AZT e 3TC (Kemp, 1998), e também desenvolveu a mutação **F77L** na amostra colhida 4 semanas após o parto. Essa mutação é encontrada em isolados virais resistentes a múltiplos inibidores da transcriptase reversa (Kavlick, 1998). Outra desenvolveu a mutação **L90M** que determina nível intermediário de resistência para NFV e SQV e baixo nível de resistência para FPV e IDV; essa mutação só pode ser detectada na amostra colhida no parto; a terceira apresentou a mutação **L33F**, que foi detectada

06 meses após o parto. Entre as mulheres que desenvolveram mutações após a introdução da quimioprofilaxia, 30% (4/13) apresentavam a mutação polimórfica **G335D**; uma outra gestante tinha a substituição **H208Y** na amostra pré-tratamento, que é um polimorfismo que pode facilitar a resistência ao AZT e 3TC (Kemp, Shi et al. 1998).

Sub	ARV	ITRN Amostra Inicial	ITRNN Amostra Inicial	IP Amostra Inicial	RNA HIV-1 Parto	ITRN Amostra pós parto	ITRNN Amostra pós parto	IP Amostra pós parto	Resistência
16 B/F	NFV	G335D	-	I13V, M36I, L63P, L89M	<80	M184V, 2sem; K219E 6 meses	-	-	FTC, 3TC, ABC
39 B/B	NFV	K43N, K43Q	V179E	M36I, D60E, I62V, L63P	110	M184V 4sem	-	K20M	FTC, 3TC, ABC NVP, EFV
49 B/B	NFV	-	-	V77I	1.500	-	-	V77I, L90M Parto	NFV, SQV, ATV, FPV, IDV
87 B/B	NFV	-	-	L10V, H69K, D60E, L63P, I93L	<80	M184V 2sem	-	L10V,L33I, H69K,V77I	FTC, 3TC, ABC
120 B/B	NVP	-	-	L10I,I13V G16E, Q92K	<80	-	K103N 4sem	-	NVP, EFV, ETR
128 B/B	NFV	H208Y	-	I13V, M36I, I62V, L63P, I93L	640	F77L, V118I 4sem	-	M46L, A71T 4sem	ATV, NFV, AZT, ABC, DDI
130 B/B	NFV	-	-	M36I	466	V75A 2sem	-	-	d4T, DDI
138 B/B	NFV	G335D	-	M46L, V77I, G16E	101	M184V 2sem	-	-	FTC, 3TC, ATV, NFV, FPV, IDV
144 U/K	NFV	-	-	L10V, K20R, M36I, H69K, L89M I93L	13.000	M184V, H208Y 2sem	-	-	FTC, 3TC, ABC
153 F/F	NVP	G335D	-	M36I, L89M	452	G335D	K103N, Y181C, Y188C 2sem	-	EFV, NVP, ETR
180 B/B	NFV	G333E	-	K45R	<80	G333E	-	L33F K45R,V77I 6meses	ATV, NFV, SQV
189 B/B	NVP	G335D	-	-	5.330	V118I	V179D 4sem	A71V,V77I	EFV, NVP
197 B/B	NVP	-	-	-	<80	-	K101E Y188C, G190A 4sem	-	NVP, EFV, ETR

**Quadro 12** - Gestantes sem mutações principais de resistência primária na amostra de inclusão na coorte que desenvolveram mutações após a introdução de HAART. Fonte: Elaborado pelo Autor.

Ao analisarmos o RNA do HIV-1 no momento do parto para o grupo de gestantes que desenvolveu mutações após o parto, observamos que sete mulheres, 41% (7/17), apresentaram carga viral menor que 80 cópias/mL, enquanto 58% (10/17), tinham carga viral do HIV-1 maior que 80 cópias/mL.

### 5.11.6 Análise de mutações de resistência secundária na presença de polimorfismo **G335C/D** na visita de inclusão na coorte (n = 12)

Em duas gestantes que apresentavam a substituição **G335D** na amostra inicial, foram detectadas as seguintes mutações para os ITRN após a introdução de HAART: **M184V+K219E** (01) e **M184V** (01). Em outras duas gestantes que também apresentavam o polimorfismo **G335D** na amostra pré-tratamento, observamos as seguintes mutações para os ITRNN após a interrupção dos anti-retrovirais: **K103N, Y181C, Y188C** (01) e a mutação **V179D** (01).

Subtipo	ITRN Amostra Inicial	ITRNN Amostra Inicial	IP Amostra Inicial	ARV	Nova Mutação	ITRN	ITRNN	IP
02 B/B	<b>G335C</b>	-	<b>M36I</b>	NVP	Não	-	-	-
16 B/F	<b>G335D</b>	-	<b>I13V, M36I</b>	NFV	Sim	<b>M184V 2 sem K219E 6meses</b>	-	-
37 B/F	<b>G335D</b>	-	<b>K20M, M36I</b>	NVP	Não	-	-	-
40 B/B	<b>G335D</b>	-	<b>D60E, I62V, L63P V75I, I85V</b>	NVP	Não	-	-	-
80 B/B	<b>G335C</b>	-	<b>L10V, K45R, A71V</b>	NFV	Não	-	-	-
138 B/B	<b>G335D</b>	-	<b>M46L, V77I</b>	NFV	Sim	<b>M184V 2 sem</b>	-	-
142 B/B	<b>G335D</b>	-	-	NFV	Não	-	-	-
146 B/B	<b>G335D</b>	-	<b>D60E, L63P</b>		Não			
153 F/F	<b>G335D</b>	-	<b>M36I</b>	NVP	Sim	-	<b>K103N, Y181C, Y188C 2 sem</b>	-
167 B/B	<b>G335D</b>	<b>K101Q</b>	-	NVP	Não	-	-	-
179 B/B	<b>G335C</b>	-	<b>M36I, V77I, I62V, L63P</b>	NVP	Não	-	-	-
189 B/B	<b>G335D</b>	-	<b>A71V, V77I, I93L, L63P, I62V</b>	NVP	Sim	-	<b>V179D 4 sem</b>	-

**Quadro 13** - Prevalência do polimorfismo **G335CD** na visita de inclusão na coorte de acordo com subtipo do HIV, e desenvolvimento de mutações após a introdução da terapia anti-retroviral. Fonte: Elaborado pelo Autor.

## 5.12 FATORES PREDITORES DE NOVAS MUTAÇÕES APÓS A INTRODUÇÃO DE HAART PARA PMTCT

### 5.12.1 Análise univariada

A tabela 8 apresenta a estimativa de risco relativo não ajustado para a incidência de qualquer mutação após o início de HAART.

Observou-se uma maior incidência de detecção de mutação entre as mulheres que apresentaram carga viral detectável no parto, ou seja, 22,9% *versus* 7,9% entre aquelas cuja carga viral era indetectável (RR = 2,88; IC 95%: 1,00-8,31; valor de p = 0,04).

A incidência de mutação após a introdução de HAART nas mulheres que apresentaram resistência primária foi de 35,7% comparadas à 9,2% nas mulheres que não tinham mutação principal de resistência primária (RR = 3,24; IC 95%: 1,14-9,2; valor de p = 0,02).

No grupo de mulheres que apresentaram polimorfismo G335CD ou E312Q (pré-HAART) a incidência de detecção de mutação foi de 36,4% frente a 11,6% entre as que não apresentavam estes polimorfismos (RR = 3,13; IC 95%: 1,02-9,60; valor de p = 0,04).

Quanto maior o tempo (número de dias) de uso de HAART, maior a incidência de mutações de resistência (RR = 1,01; IC 95%: 1,00-1,02; valor de p = 0,02), ou seja, para o acréscimo de um dia no tempo de uso de HAART, a magnitude do risco de detecção de mutação eleva-se em 1,0% neste grupo de mulheres.

Quanto mais avançada a idade gestacional por ocasião do início do acompanhamento do pré-natal no HGNI, menor a incidência de mutações (RR = 0,94; IC 95%: 0,89-1,00; valor de p = 0,05).

**Tabela 8** - Risco relativo não ajustado para detecção de qualquer mutação nas gestantes infectadas pelo HIV da coorte do HGNI, 2005-2008 (N = 111).

Características	Mutação		Risco relativo não ajustado - IC 95%	Valor de p
	Não N (%)	Sim N (%)		
<b>RNA HIV-1 no parto (cópias/mL)</b>				
≤ 80	58 (92,1)	5 (7,9)	1,00	0,04
>80	37(77,1)	11(22,9)	2,88 (1,00 – 8,31)	
Sem informação (n=12)	11(91,7)	1(8,3)		
<b>CD4 pré-HAART (cels./mm<sup>3</sup>)</b>				
≤350	26 (92,8)	2 (7,2)	0,45 (0,10 - 1,95)	0,28
>350	79 (84,0)	15 (16,0)	1,00	
Sem informação (n=1)	1(100)	0		
<b>Infecção recente (Calypste HIV-1 BED EIA)</b>				
Incidente	15 (88,3)	2 (11,7)	1,07 (0,30 - 3,73)	0,91
Prevalente	90 (85,7)	15 (14,3)	1,00	
Sem informação (n=1)	1(100)	0		
<b>Subtipo do HIV</b>				
B	86 (86,0)	14 (14,0)	0,53 (0,16-1,73)	0,30
Não B	20 (86,9)	3 (13,1)	1,00	
<b>Esquema para PMTCT</b>				
IP	80 (86,9)	12 (13,1)	0,80 (0,28-2,29)	0,69
ITRNN	26 (83,8)	5 (16,2)	1,00	
<b>Resistencia Primária (mutação principal)</b>				
Sim	9 (64,3)	5 (35,7)	3,24 (1,14-9,20)	0,02
Não	97 (88,9)	12 (9,2)	1,00	
<b>Presença de polimorfismo G335CD ou E312Q (pré-HAART)</b>				
Sim	7 (63,6)	4 (36,4)	3,13 (1,02 – 9,60)	0,04
Não	99 (88,4)	13 (11,6)	1,00	
<b>Idade Gestacional no início do pré-natal no HGNI (semanas)</b>	-	-	0,94 (0,89 – 1,00)	0,05
<b>Tempo de uso de HAART (dias)</b>	-	-	1,01 (1,00 - 1,02)	0,02

Não foram identificadas associações estatisticamente significativas entre contagem de linfócitos CD4 (pré-HAART), infecção recente pelo HIV, subtipo do HIV e esquema para PMTCT e o desfecho detecção de mutação nesta coorte de gestantes infectadas pelo HIV.

### 5.12.2 Análise multivariada

A tabela 9 apresenta o passo a passo da modelagem multivariada para o desfecho detecção de nova mutação nesta coorte. Nesta forma de modelagem adicionaram-se, seqüencialmente, as variáveis “RNA do HIV-1 no parto” (Modelo univariado – Tabela 8), “mutação principal de resistência primária” (Modelo 1), “polimorfismo G335CD ou E312Q” na visita pré-HAART (Modelo 2), “tempo de uso de HAART em dias” (Modelo 3) e “idade gestacional no início do pré-natal no HGNI em semanas” (Modelo 4).

Em todos os modelos observou-se que a quantificação do RNA HIV-1 no parto e ter mutação principal de resistência primária permaneceram significativamente associadas ao desfecho, embora a magnitude da estimativa do risco relativo ajustado tenha variado de 2,63 (Modelo 1) a 3,50 (Modelo 3) para a primeira e de 2,53 (Modelo 4) a 3,18 (Modelo 2) para a última.

A magnitude da estimativa do risco relativo na variável “polimorfismo G335CD ou E312Q” na visita pré-HAART variou de 2,04 (Modelo 4) a 2,95 (Modelo 2) com perda de significância ao ser adicionada a variável “tempo de uso de HAART” (Modelo 3), embora com um efeito considerado como expressivo.

Ao ser adicionada a variável “idade gestacional no início do pré-natal no HGNI”, que não foi significativamente associada ao desfecho (Modelo 4), a magnitude da estimativa do risco relativo da variável “tempo de uso de HAART” não sofreu mudança substancial, embora tenha havido perda de significância. Uma possível hipótese é que 90,0% (n=124) das mulheres analisadas chegaram para o início do pré-natal no HGNI com idades gestacionais iguais ou maiores do que 14

semanas e, portanto, iniciaram a terapia nesse momento. Desta forma, se supõe que, as variáveis “tempo de uso de HAART” e “idade gestacional no início do pré-natal no HGNI”, são variáveis que apresentam uma forte associação entre si. Foi estimado o Coeficiente de Correlação de Pearson entre estas duas variáveis e a estimativa foi de -0,87 com valor de  $p < 0,001$ . A interpretação desta análise de correlação é de que, à medida que aumenta a idade gestacional no início do pré-natal no HGNI, diminui o tempo de uso de HAART. Baseando-se nesta estimativa, optou-se por manter apenas a variável “tempo de uso de HAART” que foi considerada como a forma mais direta de expressar o efeito do tempo de exposição à HAART na detecção de mutação de resistência secundária. E, por conseguinte, o Modelo 3 foi considerado o ajuste mais adequado para este conjunto de mulheres analisado.

No Modelo 3, dentre as variáveis independentemente associadas ao desfecho, estimou-se que as mulheres com RNA do HIV-1 detectável no momento do parto apresentaram um risco de detecção de mutação 3,5 vezes aquele observado entre as mulheres com RNA do HIV-1 indetectável neste mesmo momento (RR = 3,50; IC 95%: 1,20-10,65; valor de  $p < 0,05$ ).

As mulheres com resistência primária apresentaram uma estimativa de risco, independentemente associada, para detecção de mutação, três vezes aquela encontrada para as mulheres que não apresentaram mutação principal de resistência primária, embora com significância limítrofe (RR = 3,09; IC 95%: 0,93-10,35; valor de  $p < 0,10$ ).

Quanto às mulheres que apresentaram polimorfismo G335CD ou E312Q (pré-HAART), quando comparadas às que não apresentaram, a estimativa do risco para detecção de nova mutação não foi estatisticamente significativa, porém sua magnitude foi considerada elevada (RR = 2,42; IC 95%: 0,69-8,47; valor de  $p < 0,20$ ), justificando a sua inclusão no modelo final.

Observou-se que, quanto maior o tempo de uso de HAART em dias, maior é o risco de detecção de nova mutação neste grupo de mulheres, ou seja, a cada dia a mais de uso de HAART estima-se um acréscimo de 1,0% na incidência de detecção de nova mutação (RR = 1,01; IC 95%: 1,00-1,02; valor de  $p < 0,005$ ).

**Tabela 9** - Fatores preditores de detecção de mutação após a introdução de HAART apenas para PMTCT nas gestantes com HIV/AIDS acompanhadas no HGNI. Rio de Janeiro, 2005-2008 (N = 111).

Variáveis	RR (IC 95%)			
	Modelo 1	Modelo 2	Modelo 3 (Final)	Modelo 4
<b>RNA HIV-1 no parto (cópias/mL)</b>				
≤ 80	1,00	1,00	1,00	1,00
> 80	2,63 (0,91 – 7,62)***	2,37 (0,80-6,97)	3,50 (1,20 – 10,65) **	3,19 (1,05-9,68)*
<b>Resistência primária (mutação principal)</b>				
Sim	2,98 (1,08 – 8,25)**	3,18 (1,14-8,88)**	3,09 (0,93 – 10,35) ***	2,53 (0,85-7,54)***
Não	1,00	1,00	1,00	1,00
<b>Detecção de polimorfismo<sup>a</sup></b>				
Sim	-	2,95 (0,93-9,31)***	2,42 (0,69 – 8,47)	2,04 (0,61-6,83)
Não	-	1,00	1,00	
<b>Tempo de uso de HAART (dias)</b>	-	-	1,01 (1,00 – 1,02)*	1,00 (0,98-1,02)
<b>Idade gestacional no início do pré-natal (semanas)</b>				0,95 (0,61-6,83)

Número de casos excluídos: 12 (9,7%)

<sup>a</sup> Detecção de polimorfismo G335CD ou E312Q C na coleta pré-HAART

\* p-valor < 0,005

\*\* p-valor < 0,05

\*\*\* p-valor < 0,10

## 6 DISCUSSÃO

Desde a publicação dos resultados do protocolo PACTG 076 em 1994, o controle da transmissão vertical do HIV-1 no Brasil tem sido uma das prioridades do Ministério da Saúde. O Brasil foi o primeiro país em desenvolvimento a implementar um programa para prevenção da Transmissão Vertical do HIV-1, desde 1995, fornecendo gratuitamente AZT a todas as gestantes infectadas (Veloso 1999; de Brito, de Sousa et al. 2006).

Os principais fatores envolvidos na transmissão vertical do HIV-1 são: fatores imunológicos, virológicos, aleitamento materno, uso de anti-retrovirais, estágio nutricional da mãe, além de fatores obstétricos, fetais, placentários, revisto por Gianvecchio e cols (Gianvecchio and Goldberg 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, Simonds et al. 1996; Orloff, Bulterys et al. 2001).

No presente estudo avaliamos os aspectos clínicos, imunológicos, virológicos (quantificação da carga viral do HIV, resistência viral, subtipos) e o uso de anti-retrovirais numa coorte de gestantes infectadas pelo HIV-1 acompanhadas num Centro de Referência para Prevenção da Transmissão Vertical do HIV localizado na Baixada Fluminense, Rio de Janeiro, com o objetivo de estudar o impacto desses fatores na Transmissão Vertical do HIV e posteriormente no tratamento anti-retroviral dessas mulheres.

## 6.1. DADOS DEMOGRÁFICOS

Entre as 139 gestantes incluídas nesse estudo, a idade mediana, 24 anos, está dentro da faixa etária mais acometida no Brasil (MS 2007). A disponibilização de serviços de planejamento familiares devidamente capacitados para o atendimento dessa população é crucial para a prevenção de gestações subseqüentes indesejadas. Nossos dados são comparáveis aos dados publicados pelo Ministério da Saúde em que 55% dos casos notificados estão entre as gestantes de 20 a 29 anos e não existem variações significativas na tendência da distribuição dos casos por faixa etária nos anos analisados (MS 2007).

Quanto a variável raça, observamos que 69,8% das gestantes incluídas na coorte eram não brancas. Esse dado difere do apresentado no Boletim Epidemiológico do Ministério da Saúde que reporta somente 39,5% como não brancas ou pardas, 46,1% brancas, 0,2% indígenas e 0,8% amarelas (MS 2007). Isso está provavelmente associado ao fato desse Centro de Referência estar localizado numa das áreas mais empobrecidas do Estado do Rio de Janeiro, onde a proporção de não brancos é maior.

No nosso estudo, 93% das mulheres encontravam-se assintomáticas e sem evidências laboratoriais de imunodeficiência avançada. O aumento da cobertura de testagem anti-HIV durante a gestação, resultado da implementação das medidas de prevenção da transmissão perinatal do HIV, têm propiciado um diagnóstico mais precoce desta infecção na população feminina (Veloso 1999). Além disso, como para este estudo foram recrutadas somente gestantes virgens de tratamento anti-retroviral, que não necessitavam de terapia anti-retroviral para sua saúde, mas somente profilaxia para prevenção da transmissão materno infantil do HIV-1, a condição clínica/laboratorial das mesmas é naturalmente melhor.

Neste estudo, pudemos observar que a população de gestantes atendidas no HGNI é composta por uma população bastante empobrecida, em que 17,8% das mulheres declararam que não tinham qualquer renda familiar, e que 65% das mulheres tinham renda mensal de até 02 salários mínimos, estando este valor

abaixo da média de renda da população brasileira (PNAD 2007). O Hospital Geral de Nova Iguaçu é o único Hospital geral de grande porte para atendimento de toda a Baixada Fluminense, região que engloba 13 municípios do Rio de Janeiro, e que atende à população mais carente da periferia desse Estado.

A baixa escolaridade destas mulheres, evidenciada pelo número de mulheres com menos de 4 (42/139 - 25%) e até 7 anos de estudo (80/139 -58%) se assemelha ao perfil dos casos de AIDS em mulheres notificados ao Ministério da Saúde, em que se observa que 51% do total de casos têm entre um e sete anos de estudos concluídos, 23,8% tem oito anos ou mais, e 3,4% não possui nenhuma escolaridade. Utilizando-se a escolaridade também como um indicador de condição social, pode-se inferir que o nível sócio-econômico destas mulheres corresponde, a grosso modo, ao dos casos notificados ao Ministério da Saúde (MS 2007). Desde o início da epidemia de AIDS no Brasil, as taxas de incidência de casos entre as mulheres são mais elevadas naquelas com menor escolaridade, em contraste com os casos masculinos. Estes últimos inicialmente concentraram-se na população com escolaridade mais elevada, evoluindo para a situação atual, na qual a maior parte dos novos casos vem sendo registrada na população com escolaridade mais baixa (Fonseca, Bastos et al. 2000).

Com relação à provável via de aquisição da infecção pelo HIV, observamos um predomínio de casos relacionados à exposição heterossexual (83%). A maior parte das mulheres referiu ter adquirido a infecção a partir de parceiros com os quais mantinham relacionamento estável. Destaca-se o elevado percentual de mulheres envolvidas em relações estáveis no momento da inclusão na coorte (80%).

Verificou-se uma elevada proporção de mulheres (16%) cuja modalidade de aquisição da infecção pelo HIV não pode ser definida, proporção esta semelhante à dos casos notificados ao Ministério da Saúde, que, a partir de 1998, passou a se situar em torno de 25% (MS 2007). Esta proporção é bastante significativa, e confirma a dificuldade em identificar fatores de risco na população feminina, já evidenciada em outros estudos nacionais e internacionais (Barbosa, do Lago et al. 1996). Isto pode estar em parte, relacionado aos critérios que balizam a definição de categoria de exposição e à baixa percepção de risco. Chama especialmente a atenção o fato de 39% das mulheres referirem parceiros infectados pelo HIV.

Nesta coorte, 22% das gestantes relataram uso de álcool na gestação atual e 9,6% das mulheres relataram uso de drogas. Vários estudos têm mostrado que a ingestão de álcool e o uso de drogas têm papel importante na aquisição do HIV e acelera a progressão da doença (Webber, Schoenbaum et al. 1999; Bardeguéz, Lindsey et al. 2008). O uso de álcool e de drogas pode impactar o acompanhamento regular de pré-natal, assim como pode também comprometer a adesão aos anti-retrovirais (Cohn, Umbleja et al. 2008).

Neste estudo, 16,5% das mulheres apresentaram diagnóstico de alguma Infecção Sexualmente Transmissível durante o acompanhamento de pré-natal, sendo Sífilis a mais prevalente. A prevalência de sífilis na primeira consulta de pré-natal foi 9%, significativamente maior que àquela verificada na população de gestantes no município do Rio de Janeiro, em 2004 (1,6%) (MS 2007). Essa diferença poderia estar associada à maior exposição das mulheres infectadas pelo HIV a outras IST. A sífilis e a infecção pelo HIV podem interagir de várias formas, aumentando mutuamente o potencial de aquisição e transmissão de ambas (Hutchinson, Rompalo et al. 1991; Theus, Harrich et al. 1998). A prevalência de IST em mulheres sabidamente infectadas pelo HIV é bastante variável nos diversos estudos, de acordo com a população avaliada (Kalichman, Rompa et al. 2000). A prevalência de gonorréia e de infecção por *Clamidia* mostrou-se baixa nesta coorte, 0,8% e 5,3% respectivamente, conforme já observado em outras coortes de mulheres infectadas pelo HIV (Cu-Uvin, Hogan et al. 1999; Minkoff, Eisenberger-Matityahu et al. 1999; Grinsztejn, Bastos et al. 2006).

Os resultados das sorologias para Toxoplasmose e Rubéola na nossa coorte de gestantes estão em concordância com os estudos de Reiche *et al*, realizados no Hospital Universitário Regional Norte do Paraná, Paraná, onde análise retrospectiva de 1500 resultados de testes sorológicos efetuados em gestantes no período de junho de 1996 a junho de 1998 revelou as seguintes taxas de positividade: 67% (IgG) e 1,8% (IgM) para toxoplasmose, 89% (IgG) e 1,2% (IgM) para rubeola (Reiche, Morimoto et al. 2000).

Silveira *et al* ao avaliar a soroprevalência de hepatite B na América Latina, constatou que o Brasil foi o único país que apresentou uma associação entre alta soroprevalência e baixo nível socioeconômico (Silveira, Figueiredo et al. 1999),

entretanto, na nossa coorte em que 65% das mulheres tinham renda familiar menor que dois salários mínimos, encontramos baixa prevalência de infecção pelo vírus da Hepatite B 3,0% e Hepatite C 1,5%. Essas taxas foram mais altas que as encontradas por Reiche *et al* no estudo descrito acima, que observaram 0,8% de prevalência para hepatite B (HBsAg) e 0,8% para hepatite C.

A realização de sorologia para Hepatite B para todas as gestantes durante o período de pré-natal é essencial, uma vez que se a gestante tiver sorologia reagente para o HBsAg, o recém nascido deverá receber imunoprofilaxia dentro das primeiras 12 horas de vida (vacina + imunoglobulina específica). Se a sorologia da gestante for não reagente para o HBsAg, deverá ser vacinada durante a gestação. Apesar da baixa prevalência de Hepatite B encontrada na nossa coorte de gestantes, especial atenção deve ser dada ao grupo de mulheres com sorologia reagente para o HBsAg, uma vez que logo após a interrupção da quimioprofilaxia com anti-retrovirais para prevenção da transmissão materno infantil do HIV-1, existe o risco de apresentarem quadros de “agudização” da Hepatite pela suspensão da Lamivudina, droga presente na grande maioria dos esquemas utilizados para prevenção da transmissão vertical do HIV-1 em gestantes. Chama também atenção na nossa coorte a proporção de gestantes, 68% com sorologias para AntiHbC e AntiHBS não reagentes, revelando que a cobertura de vacinação para Hepatite B ainda é pequena para as mulheres em idade reprodutiva no nosso país.

## 6.2 AVALIAÇÃO IMUNOLÓGICA E VIROLÓGICA

A maioria das gestantes incluídas nesta coorte estava na categoria A1/A2 CDC93, com mediana de CD4 pré-tratamento de 518 células/mm<sup>3</sup>. Na nossa coorte a mediana do RNA do HIV-1 era menor que 80 cópias/mL no período entre 06 a 08 semanas após o início do esquema HAART, o que mostra a rápida e potente ação dos esquemas HAART na redução do RNA do HIV-1. Estes resultados estão em concordância com vários estudos publicados anteriormente sobre a potência dos esquemas HAART (Thea, Steketee *et al.* 1997; Mandelbrot, Landreau-Mascaro *et al.*

2001). Sessenta por cento das gestantes tinham carga viral indetectável no parto, enquanto que 76% tinham carga viral < 400 cópias/mL. Esses resultados são comparáveis àqueles publicados por Tungsiripat *et al.* para 114 gestantes acompanhadas na Universidade de Washington, EUA (Tungsiripat, Drechsler et al. 2007).

As medianas das contagens de linfócitos CD4 na visita de inclusão (pré-HAART) e de seis meses após a interrupção de HAART foi de 509 (IQR: 378,2-635,0) e de 514 (IQR: 420,0-690,0) células/mm<sup>3</sup>, e esta diferença foi estatisticamente significativa (p=0,03). Estes resultados também estão em concordância com os resultados descritos por Tungsiripat *et al.* (Tungsiripat, Drechsler et al. 2007). Na nossa coorte observamos um decréscimo nos níveis de RNA do HIV-1 durante a gravidez, seguido de um significativo aumento do RNA do HIV-1 nas primeiras 12 semanas após o parto. Esses resultados são comparáveis com os resultados publicados por Watts e colaboradores que avaliaram a carga viral durante a gravidez em mulheres, que na sua maioria haviam tomado AZT monoterapia durante o pré-natal (Watts, Lambert et al. 2003). As implicações clínicas de um aumento da carga viral no período de pós-parto seriam a possibilidade de aceleração na progressão da infecção pelo HIV-1, o risco de desenvolvimento de mutações de resistência e o aumento do risco de transmissão do HIV-1 para um parceiro.

Vários autores abordaram a questão gravidez e risco de progressão da infecção pelo HIV (Sabin and Phillip 1994; Temmerman, Chomba et al. 1994; Hocke, Morlat et al. 1995; Alliegro, Dorrucci et al. 1997; Weisser, Rudin et al. 1998; Saada, Le Chenadec et al. 2000; Minkoff 2003); todos esses estudos tiveram como conclusão que a gravidez não tem efeito na progressão da doença e que mulheres grávidas portadoras de infecção pelo HIV tinham uma tendência a ser mais saudáveis do que as mulheres não-grávidas portadoras de infecção pelo HIV-1 (Bessinger, Clark et al. 1998; Weisser, Rudin et al. 1998; Minkoff 2003).

A ausência de efeito deletério da gravidez na infecção pelo HIV-1 é consistente com os resultados de vários estudos imunológicos. Num grande estudo de mulheres não tratadas (1997), foi observado um declínio na contagem absoluta de células CD4 durante o primeiro trimestre da gestação, seguido de um aumento

gradual a partir de então, até o momento do parto; as células CD4 voltavam aos níveis do início do pré-natal seis meses após o parto. Em contraste, os percentuais de CD4 ficavam mais estáveis durante a gravidez.

A dinâmica do CD4 e do RNA do HIV-1 durante o período gestacional estão ligadas às mudanças fisiológicas da gravidez, com reversão no pós-parto. Um mecanismo dilucional secundário a expansão de volume poderia explicar parcialmente essas mudanças (Tuomala, Kalish et al. 1997). Os níveis elevados de estradiol e progesterona durante a gravidez também teriam um efeito na replicação viral, efeito esse, que seria removido após o parto quando os níveis hormonais retornam para níveis pré-gestação (Asin, Heimberg et al. 2008).

### 6.3 INFECÇÃO RECENTE PELO HIV-1

O fato de que 13,9% das gestantes foram classificadas como portadoras de infecção recente pelo HIV-1, quando suas amostras pré-tratamento foram testadas com o ensaio sorológico BED-CEIA é digno de nota. Não existem dados na literatura sobre estudos de prevalência de Infecção recente pelo HIV-1 com BED-CEIA em população de gestantes. Esse achado é preocupante, principalmente, por que diversos estudos já demonstraram que durante a infecção aguda pelo HIV, existe uma viremia importante, e, portanto, maior risco de transmissão materno infantil do HIV-1 (Burton, O'Shea et al. 1996; Coll, Hernandez et al. 1997; Patterson, Leone et al. 2007). Alguns autores acreditam que o BED-CEIA possa superestimar a prevalência de infecção recente, principalmente em populações onde os subtipos não-B são prevalentes (UNAIDS 2005). Entretanto, na nossa casuística todas as gestantes classificadas como tendo infecção recente pelo HIV-1 foram infectadas por vírus do subtipo B.

Não encontramos diferença estatisticamente significativa ( $p=0.18$ ) entre a mediana de carga viral do HIV-1 dos casos classificados como incidentes (SR) e a mediana de carga viral do HIV-1 dos casos classificados como prevalentes (SLT),

entretanto, não podemos excluir a possibilidade de que essas gestantes estivessem perto do final da janela estabelecida para o BED-CEIA, que é de 153 dias (Dobbs and Parekh 2003; Dobbs, Kennedy et al. 2004), pois é possível que já tivessem atingido o “set point”, apresentando, portanto, uma carga viral para o HIV-1 mais baixa no momento em que foram testadas (Deeks and Walker 2004; Geskus, Prins et al. 2007).

Chama atenção também o fato de que **28,5%** (4/19) das gestantes que apresentavam diagnóstico de infecção recente pelo BED, apresentaram mutações de resistência primária no seqüenciamento das amostras pré-tratamento; metade tinha resistência para os ITRN (AZT e d4T), enquanto a outra metade tinha resistência para os ITRNN (Nevirapina e Efavirenz)

#### 6.4 DIVERSIDADE GENÉTICA DO HIV-1

A diversidade do vírus HIV-1 é foco de estudo para diversos grupos de pesquisa no Brasil. Para a região sudeste, dados do nosso grupo, em adição aos demais, têm mostrado que o subtipo B corresponde a 85% das infecções, enquanto que o subtipo F corresponde a 15% (Morgado, Sabino et al. 1994; Morgado, Guimaraes et al. 1998; Tanuri, Swanson et al. 1999; Brindeiro, Diaz et al. 2003; Bello, Eyer-Silva et al. 2007).

Analisando os genes da polimerase viral, grande parte das amostras analisadas 94/123 (76,4%) apresentou o perfil B/B. Este resultado condiz com os dados publicados na literatura sobre a diversidade genética do vírus HIV-1 para a região sudeste, onde de 70 a 85% das infecções parecem ser causadas por vírus do subtipo B (Brindeiro, Diaz et al. 2003).

O perfil F/F foi apresentado por 9,7% (12/123) das gestantes. O perfil da epidemia causado pelo vírus HIV-1 no Brasil é composto em grande parte por vírus dos subtipos B, F e C existindo uma alta prevalência de formas recombinantes entre os subtipos circulantes. Assim como em nossa análise, um outro estudo realizado

utilizando amostras de doadores de sangue pôde verificar a presença de cepas do subtipo F (2,7%) e vírus recombinantes B/F (11%), mostrando a natureza complexa e dinâmica da epidemia da AIDS no Brasil e a presença de cepas recombinantes B/F circulantes no Rio de Janeiro (Sa-Ferreira, Brindeiro et al. 2007).

Dezessete gestantes apresentaram perfis discordantes entre as regiões da polimerase, sugestivos de genomas recombinantes, 11 amostras apresentaram subtipos B/F, 2 amostras com subtipo F e uma parte da protease não tipável [U /U/F) , 2 amostras com subtipos D/B e 2 amostras com subtipo U/K .

Estas amostras em conjunto representam 13,8% das gestantes analisadas sugerindo a ocorrência de formas recombinantes únicas (URF) entre diferentes subtipos em áreas do Estado do Rio de Janeiro.

Os diferentes subtipos do HIV-1 podem ter propriedades biológicas, imunológicas e patológicas distintas. A transmissibilidade de mãe para filho, pode ser afetada por estas propriedades, porém há controvérsias nos estudos realizados até o momento. Em um estudo realizado no Rio Grande do Sul envolvendo mais de 100 crianças e suas mães, não foi possível evidenciar a influência no subtipo C como sendo mais favorável à transmissão vertical (Martinez, Hora et al. 2006). Em estudo realizado na Nigéria envolvendo mães HIV-1 positivas e seus respectivos bebês, altas taxas de transmissão vertical foram observadas, sendo que 100% das mães infectadas transmitiram o vírus para seus filhos. Destas, 66,7% eram infectadas pelo subtipo G e 36,4% pela forma recombinante CRF02 que também foi transmitida para seus filhos (Odaibo, Olaleye et al. 2006). Outros estudos sugerem que as formas recombinantes podem ser mais favoráveis à transmissão (Kouliniska, Villamor et al. 2006), uma vez que mesmo quando presente em uma mãe multi-infectada com um subtipo A e com a forma recombinante A/D, apenas a cepa A/D recombinante foi transmitida para seu bebe (Steain, Wang et al. 2006). Os achados dos demais autores, nos leva a crer que as formas recombinantes circulantes parecem ter um *fitness* viral que favorece a transmissão vertical,

A detecção de variantes recombinantes em gestantes no presente estudo, juntamente com os achados dos demais autores de que as formas recombinantes circulantes parecem ter um *fitness* viral que favorece a transmissão vertical, é fator

preocupante na dinâmica da infecção perinatal do HIV-1, apesar de no nosso estudo não ter ocorrido transmissão vertical do HIV-1.

## 6.5 RESISTÊNCIA PRIMÁRIA AOS ANTI-RETROVIRAIS

A descoberta de cepas resistentes às drogas anti-retrovirais trouxe a tona um dos principais problemas enfrentado pelos pacientes portadores de infecção pelo HIV-1: a falha virológica ao tratamento. Além das mutações de resistência causadas pela baixa adesão do tratamento, ou mesmo tratamento inadequado, a transmissão de cepas virais já resistentes, evento conhecido como resistência primária, vem ganhando destaque tornando-se um grande problema de Saúde Pública em todo o mundo.

Desde a publicação dos dados do estudo PACTG 076 e do advento do uso da terapia anti-retroviral de alta potência (HAART) para prevenção da transmissão materno infantil do HIV-1, muito se tem discutido em relação ao desenvolvimento de resistência aos anti-retrovirais e em relação à transmissão de vírus resistente para os bebês infectados por transmissão vertical.

A seleção de variantes virais que causam resistência aos anti-retrovirais tem sido uma grande preocupação, particularmente com respeito à nevirapina, visto que uma única mutação pode levar a uma resistência de alto nível a este medicamento, assim como a outros ITRNN (Coovadia 2004).

Documentação de transmissão de vírus resistente às drogas anti-retrovirais (TVRD) em indivíduos infectados pelo HIV-1, virgens de terapia anti-retroviral, tem sido reportado mais frequentemente nos últimos cinco anos. Publicações em diferentes regiões geográficas revelam prevalência de transmissão de vírus resistente a drogas variando de 3,3% a 24,1% (Lama, Sanchez et al. 2006; Shet, Berry et al. 2006; Geretti 2007). Entretanto, é difícil fazer comparações entre os diversos estudos, porque na maior parte das publicações não foi usada uma lista

uniforme de mutações, assim como não foram usados os mesmos algoritmos de interpretação para estimar a prevalência de transmissão de vírus resistente.

Shafer e cols. (Shafer, Rhee et al. 2007) propuseram uma lista de critérios para selecionar mutações relacionadas à TVRD. Entretanto, além da resistência transmitida, como definida por Shafer, todas as mutações associadas com resistência ou capazes de alterar a barreira genética – número de mutações necessárias para perda de sensibilidade – devem ser consideradas como preditoras do impacto de resistência para o primeiro esquema anti-retroviral usado (Vercauteren, Derdelinckx et al. 2008).

A avaliação de TVRD é capaz de fornecer informação valiosa, uma vez que alerta às autoridades ligadas a Saúde Pública sobre a necessidade de realização de genotipagem de rotina para pacientes portadores de infecção pelo HIV-1 antes do início da terapia anti-retroviral, aumentando a chance de sucesso após o início do primeiro esquema desse tratamento. Além disso, ajudam na identificação dos grupos mais afetados pela TVRD, assim como também colaboram na elaboração de programas com estratégias de intervenção mais eficazes, voltados para estes grupos mais afetados, limitando, portanto, o desenvolvimento de novas infecções. Além disso, a TVRD persiste ao longo dos anos (Ghosn, Pellegrin et al. 2006; Brenner, Roger et al. 2007), e indivíduos ainda não tratados podem estar infectados com vírus resistente, e possivelmente transmitir infecção com vírus resistente a drogas anti-retrovirais (Van Laethem and Vandamme 2006).

As recomendações do programa Nacional de DST/AIDS do Ministério da Saúde para tratamento da infecção pelo HIV ainda não preconizam a genotipagem para indivíduos recém diagnosticados com infecção pelo HIV-1 e para os que necessitem iniciar o seu primeiro esquema anti-retroviral. As últimas orientações a esse respeito, publicadas pelos consensos Americano e Europeu recomendam testes de resistência genotípica para todos os indivíduos com infecção aguda ou recente pelo HIV-1, enquanto para os cronicamente infectados, o teste deve ser realizado se a prevalência de resistência exceder 10% na fenotipagem ou 5% na genotipagem (Vandamme, Sonnerborg et al. 2004).

Uma atualização mais recente estende a abrangência de testagem de resistência genotípica, incluindo todos os indivíduos portadores de infecção pelo HIV-1, virgens para tratamento anti-retroviral. Um estudo publicado por Sax e colaboradores mostrou que a testagem genotípica é custo-efetivo para pacientes virgens de terapia anti-retroviral, quando a TVRD for > 1% (Sax, Islam et al. 2005).

No nosso estudo, encontramos uma prevalência global de 11,3% (14/123) de resistência primária, bem superior à encontrada em outros estudos nacionais que identificaram baixa prevalência de resistência primária (2,5%) em indivíduos com diagnóstico recente de infecção pelo HIV-1 (Dumans, Soares et al. 2002; Soares, Brindeiro et al. 2004), e o dobro da encontrada por Brindeiro e cols. (7%) em 2003, Lorete e cols. (8,7%) em 2007, e Gonzalez e cols. (6,5%) em 2007 (Brindeiro, Diaz et al. 2003; Gonzalez, Alcalde et al. 2007).

A prevalência encontrada no nosso estudo é também maior que a descrita em um estudo prospectivo, realizado em 17 países europeus que encontrou uma prevalência global de 9,1% (Wensing, van de Vijver et al. 2005), e que os dados publicados por outras coortes européias, como a de Portugal (Palma, Araujo et al. 2007), Grécia (Paraskevis, Magiorkinis et al. 2005) e a descrita no estudo SPREAD, publicado em 2003 pela comunidade européia, com taxas de 9,1%.

A prevalência de resistência primária no nosso estudo, só não foi maior que a descrita por Sucupira e colaboradores, num estudo conduzido na cidade de Santos, região com alta prevalência de usuários de drogas Intravenosas, onde a taxa de resistência primária foi 36%, (Sucupira 2007). Dessa forma, é importante salientar que a resistência primária está intimamente associada à localidade pesquisada e às peculiaridades relacionadas ao uso de terapia anti-retroviral, sendo difícil fazer generalizações muito amplas.

O Brasil foi o primeiro país em desenvolvimento a implementar um programa de acesso universal aos anti-retrovirais em larga escala. Atualmente, aproximadamente, 180.000 pacientes com HIV/AIDS recebem anti-retrovirais pelo SUS (MS 2007). A efetividade do tratamento anti-retroviral nesta população pôde ser evidenciada pelo impacto no aumento da sobrevida (Marins, Jamal et al. 2003; Campos, Ribeiro et al. 2005; Grinsztejn, Veloso et al. 2007), na diminuição da

incidência de infecções oportunistas e na diminuição das hospitalizações (Brigido, Rodrigues et al. 2004; MS 2007).

Com o amplo e crescente acesso ao tratamento anti-retroviral no Brasil, a seleção de variantes resistentes a estes medicamentos vem crescendo em larga escala. Desta forma, a transmissão de vírus mutantes que conferem resistência primária vem sendo documentada cada vez mais, e pessoas infectadas por estes vírus podem ter opções limitadas de tratamento futuro, mesmo sem nunca terem recebido medicamentos anti-retrovirais.

Deve-se observar, entretanto, que as prevalências de resistência primária têm sido relatadas a partir de estudos que envolvem indivíduos com infecção primária ou infecção recente. Os indivíduos que estão se infectando neste momento podem demorar em média 10 anos para precisar de tratamento de acordo com as diretrizes atuais e, da mesma forma, as pessoas que devem iniciar o tratamento agora podem ter sido infectadas há cerca de 10 anos atrás. É provável que, há 10 anos, a transmissão de vírus resistentes fosse desprezível, e que a prevalência de resistência primária nos pacientes que necessitam iniciar tratamento hoje, em algumas áreas, seja muito baixa ou inexistente.

Um estudo para definir a necessidade do uso de testes de resistência pré-tratamento deve ser feito na população candidata a iniciar terapia anti-retroviral neste momento. Nosso estudo traz essa contribuição por acessar uma população de gestantes recém diagnosticadas, sem necessidade de tratamento no momento, mas trazendo informação valiosa a respeito da transmissão de vírus resistente num país que faz distribuição gratuita de anti-retrovirais há mais de 15 anos. Nosso estudo é o primeiro estudo prospectivo que estima a prevalência de resistência a drogas anti-retrovirais em gestantes virgens de terapia anti-retroviral, na qual a lista de mutações proposta por Shafer *et al* foi utilizada como marcadores genuínos de TVRD (Shafer, Rhee et al. 2007).

A prevalência encontrada no nosso estudo (11,3%) é significativamente maior que 5% ( $p < 0.001$ ), limite considerado pela Organização Mundial de Saúde e por alguns autores (Hecht and Grant 2005) como o limite de TVRD considerado custo-

efetivo para a realização de testes de resistência genotípica em indivíduos recém diagnosticados como portadores de infecção pelo HIV-1.

Entre as mutações indicativas de TVRD, as mutações para os ITRN foram dominantes na nossa população de gestantes com resistência primária, atingindo **71%** (10/14). Isso pode ser um reflexo do uso por alguns anos no Brasil de monoterapia (AZT e d4T), e terapia dupla antes da era HAART. Entretanto, na ausência de pressão seletiva da droga anti-retroviral, vírus com mutações de resistência tem tendência à reversão para vírus selvagem por causa do menor *fitness* do vírus que contém as mutações de resistência (Little 2001). O baixo impacto das TAMs e mutações do códon **215** na capacidade replicativa do vírus em pacientes virgens de terapia anti-retroviral, faz com que essas mutações permaneçam por longo tempo nos pacientes não tratados, e tem um papel importante na transmissão de vírus resistente (Garcia-Lerma and Heneine 2001).

Na nossa casuística, cerca de uma em cada dez gestantes diagnosticadas como portadoras de infecção pelo HIV-1, virgens de tratamento anti-retroviral, tinham mutações de resistência na amostra pré-tratamento. Entretanto, podemos considerar que essa prevalência possa ainda estar subestimada, uma vez que várias mutações de resistência podem reduzir o “fitness” viral de tal forma que após a transmissão, e na ausência de tratamento, elas desapareçam da população de vírus majoritária (Little 2001). Neste sentido, estudos futuros empregando abordagens moleculares que permitam detectar populações minoritárias carreando mutações de resistência aos anti-retrovirais serão de relevância para definir melhor a prevalência de resistência primária nesta população. Além disso, a mutação **M46L** foi detectada em três seqüências, a mutação **V179E** em outra, e uma amostra apresentava a mutação **L33F**, o que provavelmente reflete transmissão de vírus resistente, embora estas mutações não estejam contempladas na lista de Shafer e cols como mutações principais, mas como mutações borderline/suspeitas. Portanto, ao considerarmos essa lista, podemos estar subestimando a real prevalência de TVRD.

Aplicamos o algoritmo de Stanford nas seqüências das amostras que apresentaram mutações de resistência indicando TVRD, para avaliação de vírus com diminuição de sensibilidade para as drogas anti-retrovirais disponíveis e recomendadas pelas diretrizes do programa nacional de DST/AIDS. Em relação à

avaliação da sensibilidade aos anti-retrovirais, pudemos observar que no nosso estudo, 100% (14/14) das gestantes portadoras de resistência primária na amostra inicial pré-HAART, não apresentavam sensibilidade completa para a combinação Zidovudina + Lamivudina + Nevirapina/Efavirenz, que é o esquema de primeira linha proposto pelo Ministério da Saúde (MS 2008).

Resistência primária para os ITRNN foi observada em 31,5% (4/14) das gestantes; esse resultado pode ser reflexo das diretrizes nacionais e internacionais para uso de ITRNN como opção para a primeira terapia anti-retroviral. A predominância de esquemas baseados em ITRNN reflete uma prática pautada pelas recomendações do Ministério da Saúde, como já evidenciado por Loo e colaboradores no Rio de Janeiro (Loo, Diaz et al. 2004). Esse perfil é também o mais frequentemente encontrado nos países desenvolvidos e em desenvolvimento, sendo que nesses últimos o ITRNN mais utilizado tem sido a Nevirapina (Kumarasamy 2004; Kiguba, Byakika-Tusiime et al. 2007).

Baseado nesses achados recomendamos que os testes de resistência genotípica sejam considerados rotina no Brasil para todos os indivíduos recém diagnosticados como portadores de infecção pelo HIV, no intuito de otimizar o sucesso da terapia inicial, prevenir o desenvolvimento de mais resistência e da transmissão de vírus resistente para outros indivíduos. Entretanto, é importante notar que a genotipagem pode não dar um perfil completo da resistência existente. A genotipagem padrão só é capaz de detectar população viral mutante >20%, perdendo as populações mutantes minoritárias (Van Laethem, Van Vaerenbergh et al. 1999). Além disso, a interpretação dos algoritmos para análise de resistência do HIV-1 às drogas anti-retrovirais deve ser feita com cautela, uma vez que são principalmente baseados em informações para o subtipo B, e incorporam apenas regras preliminares para as novas drogas (Vercauteren and Vandamme 2006).

A alta prevalência de resistência primária aos anti-retrovirais encontrada na nossa população de gestantes, mostra que um grande número de pessoas infectadas pelo HIV-1 em tratamento anti-retroviral com falência virológica e, portanto, com mutações de resistência, continuam a ter comportamento sexual de risco, ou que pessoas infectadas com vírus resistente, possivelmente não

conhecedoras do seu status sorológico, estejam transmitindo vírus resistente a outras pessoas.

Os padrões de resistência encontrados na população de mulheres no nosso estudo, que apresentam na sua maioria uma única mutação de resistência, são diferentes dos padrões vistos em pacientes com falha terapêutica, na maior parte das vezes com múltiplas mutações de resistência. Essa discrepância nos dados, não significa necessariamente que a fonte de transmissão de vírus resistente não seja de pacientes com falha ao esquema anti-retroviral em uso, pois o menor número de mutações pode resultar de reversão da população mutante viral para população selvagem para algumas mutações. Nesse caso, o paciente com resistência transmitida pode ser portador de vírus com múltiplas mutações de resistência, e cuidado especial deve ser tomado na escolha do primeiro esquema de tratamento anti-retroviral. Entretanto, se a resistência transmitida é resultado de uma transmissão recém adquirida, como recentemente publicada por Brenner e cols. (Brenner, Roger et al. 2007), e também descrita por Van Laethem e cols. (Van Laethem and Vandamme 2006), então, possivelmente não devem existir variantes menores com mutações de resistência, e mais opções estarão disponíveis para esses pacientes.

Existem dados na literatura internacional mostrando tendências temporais discordantes em relação à prevalência de transmissão de vírus resistente (Masquelier, Bhaskaran et al. 2005; 2007), entretanto as publicações nacionais sobre resistência primária têm apontado para um crescente aumento na prevalência de transmissão de vírus resistente, o que pode ser corroborado pelos resultados do nosso estudo, quando comparamos com os dados publicados por outros pesquisadores (Dumans, Soares et al. 2002; Brindeiro, Diaz et al. 2003; Soares, Brindeiro et al. 2004; Kakehasi, Tupinambas et al. 2007). Na nossa casuística todas as mulheres que apresentaram resistência primária foram infectadas por vírus subtipo B. É importante notar que 28,5% das gestantes que apresentavam resistência primária na visita de inclusão na coorte desenvolveram novas mutações após o início e interrupção dos anti-retrovirais.

A mutação polimórfica **G335CD** estava presente em 9,7% (12/123) das gestantes nas amostras pré-tratamento. Essa substituição facilita a resistência simultânea para AZT/3TC em pacientes que apresentem TAMs (Nikolenko, Delviks-Frankenberry et al. 2007). É importante notar que apesar do suporte de equipe multiprofissional com aconselhamento e proposta de anticoncepção para essas gestantes, novas gestações acabam por ocorrer. Na nossa coorte, atualmente com uma mediana de tempo de acompanhamento de 550 dias, 20% das mulheres já tiveram uma segunda gestação. Tal fato é preocupante, porque além da possibilidade de desenvolvimento de resistência durante o uso de cada quimioprofilaxia para prevenção da transmissão vertical do HIV-1, as mulheres que tem vírus com o polimorfismo **G335CD**, estarão mais propensas ao desenvolvimento de resistência de alto nível ao AZT se acumularem TAMs.

Entre as mutações polimórficas para a protease encontradas nas amostras pré-tratamento, mutação **63P** foi a mais prevalente (41,5%), sendo detectada em 45,7% das gestantes infectadas por vírus subtipo B e em 27,6% das infectadas por vírus subtipo não-B. O polimorfismo **63P** é muito freqüente e significativamente associado com tratamento anti-retroviral, geralmente associado ao uso de Lopinavir/Ritonavir (Masquelier, Breilh et al. 2002). As mutações **60E** (17% e 6,9%), **62V** (22,3% e 3,4%), foram detectadas, respectivamente em subtipos B e não-B, e se mostram como assinaturas específicas de diferentes subtipos. Em relação ao polimorfismo **89L/M**, foi encontrado em subtipos B e não-B em 3,2% e 31%, respectivamente. Um aspecto peculiar em relação a essa mutação é que se relaciona a um polimorfismo natural em vírus do subtipo não-B, e pode levar a uma diminuição de suscetibilidade à maior parte dos inibidores de protease, especialmente ao Indinavir, Nelfinavir, Ritonavir e Amprenavir (Calazans, Brindeiro et al. 2005).

## 6.6 DETECÇÃO DE MUTAÇÕES APÓS A INTERRUPÇÃO DOS ANTI-RETROVIRAIS NO PARTO

A incidência de mutações de resistência em cada visita após o início de terapia anti-retroviral de alta potência (HAART), foi de 14% (2/14) no momento do parto, 10,7% nas amostras colhidas duas semanas após o parto, 8,45% nas amostras colhidas 4 semanas após o parto e 2,95% nas amostras de 6 meses. Entretanto, é importante notar que a incidência de mutações no parto (14%) foi calculada com um denominador de somente 14 gestantes, pois a maioria delas apresentava RNA do HIV-1 indetectável ou menor que 1.000 cópias no momento do parto, não sendo possível realizar a genotipagem. As mutações para os ITRN foram detectadas mais frequentemente entre o parto e duas semanas após o parto e para os ITRNN, principalmente nas amostras colhidas 4 semanas pós parto.

Dezessete gestantes (13,8%) desenvolveram mutações após a introdução e interrupção da quimioprofilaxia com anti-retrovirais. Dentre estas gestantes, 82,3% (14/17) eram infectadas por vírus subtipo B, enquanto 17,6% (3/17) estavam infectadas por vírus subtipo não-B (F/B, U/K, F/F). Em relação ao esquema anti-retroviral utilizado, 64,7% (11/17) fizeram esquema contendo Nelfinavir e 35,2% (6/17) utilizaram esquema contendo Nevirapina. É importante notar que 28,5% (4/14) gestantes que apresentavam resistência primária na visita de inclusão na coorte desenvolveram nova mutações.

Sete gestantes desenvolveram a mutação **M184V**, sendo que uma delas também apresentou a mutação **L33I**. Essa última mutação aparece ocasionalmente como mutação secundária em vírus de indivíduos tratados com Ritonavir (Koch, Yahi et al. 1999), ou Atazanavir/ritonavir (Vora, Marcelin et al. 2006) ou Tipranavir (Naeger and Struble 2007). Das sete gestantes que desenvolveram a mutação **M184V** após a interrupção da quimioprofilaxia, em 100% dos casos o esquema anti-retroviral utilizado continha **Nelfinavir**. Chama também atenção que nesse grupo de mulheres detectamos a mutação **M184V** tão cedo quanto na coleta do parto e principalmente no período entre 02 e 04 semanas após o parto. O RNA do HIV-1 no momento do parto estava indetectável em somente 42% (7/17) dos casos. Uma explicação para a detecção de novas mutações poderia estar relacionada ao esquema anti-retroviral utilizado, devido às concentrações baixas de Nelfinavir atingidas durante a gestação (Nellen, Schillevoort et al. 2004; Villani, Florida et al. 2006; Bryson, Mirochnick et al. 2008), pelo fato de 58% não terem atingido RNA do

HIV-1 menor que 80 cópias/mL no momento do parto e pela baixa barreira genética da Lamivudina. Poderíamos inferir que essas pacientes estavam potencialmente utilizando terapia anti-retroviral dupla (zidovudina + lamivudina) e, portanto, subótima.

Seis mulheres, 19% (6/31) desenvolveram mutações de resistência para os ITRNN. Para essas mulheres, metade tinha RNA do HIV-1 maior que 80 cópias/mL no parto. Recentemente, Hare, Mellors e colaboradores observaram que indivíduos que descontinuavam terapia anti-retroviral com esquema contendo ITRNN, quando a carga viral plasmática para o HIV-1 era menor que 400 cópias/mL, apresentavam risco substancial (20%) de “rebound” virológico com vírus resistente aos ITRNN. No estudo de Mellors & Hare, esse risco era maior para os que descontinuaram a terapia com RNA do HIV-1 entre 51- 400 cópias/mL do que quando estava menor que 50 cópias/mL (Hare, Mellors et al. 2008).

No nosso estudo três gestantes, 3,2% (3/92), desenvolveram mutações para os Inibidores de Protease. Uma das gestantes desenvolveu a mutação **M46L** e as mutações **F77L** e **V118I** para os ITRN. Essa mesma gestante tinha a substituição **H208Y** na amostra pré-HAART; esse polimorfismo pode facilitar a resistência para o AZT/3TC (Kemp, Shi et al. 1998), e também está associado com terapia contendo inibidores da transcriptase reversa, particularmente no contexto da mutação **M184V** e TAMs **M41L**, **L210W** e **T215Y** (Cane, Green et al. 2007; Deshpande, Jauvin et al. 2007).

Entre o grupo de gestantes que desenvolveu mutações de resistência após a introdução/interrupção dos anti-retrovirais, 23,5% (4/17) tinha a mutação polimórfica **G335D** nas amostras pré-HAART, sendo que uma delas a mutação **M184V** apareceu na amostra de 2 semanas pós-parto e a mutação **K219E** apareceu na amostra de 6 meses. Essa substituição facilita a resistência simultânea para AZT/3TC em pacientes que apresentem TAMs (Nikolenko, Delviks-Frankenberry et al. 2007).

Na nossa casuística, entre as 17 mulheres nas quais detectamos qualquer mutação após o início da quimioprofilaxia, 43% (7/17) apresentavam RNA do HIV-1 na amostra pré-tratamento maior que 10.000 cópias/mL. Destas, 85% (6/7) não

atingiram RNA do HIV-1 menor que 80 cópias/mL no parto, apesar de terem uma mediana de tempo de uso de anti-retroviral de 148 dias (IQR, 38 -162). Estes dados estão em concordância com os resultados descritos por Louis e colaboradores, que avaliaram as características associadas com supressão viral subótima no parto em 146 gestantes portadoras de infecção pelo HIV-1. Estes observaram que mulheres com carga viral para o HIV-1  $\geq 1.000$  cópias/mL no parto tinham mais chance de ter uma carga viral para o HIV-1  $\geq 10.000$  cópias/mL na amostra pré-tratamento no início do pré-natal, e tinham uma adesão pior aos anti-retrovirais (Louis, Buhari et al. 2005).

Em relação à adesão, na nossa coorte todas as mulheres foram aconselhadas por duas farmacêuticas em cada consulta pré-natal, para que fizessem uso correto da medicação. Embora não tenha sido solicitado o retorno dos frascos de medicamento dispensados em cada consulta, as gestantes retornaram na data prevista para o próximo fornecimento de medicação, quando eram então aconselhadas novamente para o uso correto da medicação. Recentemente, estudo publicado em São Paulo por Vaz e cols (Vaz, Barros et al. 2007) que tinha por objetivo avaliar a influencia da gravidez no nível de adesão as drogas anti-retrovirais numa coorte prospectiva de 72 mulheres portadoras de HIV grávidas e 79 mulheres portadoras de HIV não grávidas, fez uma análise multivariada que mostrou que idade  $>29$  anos (OR 3, 58, CI 95% 0.10 – 0.75,  $p=0.011$ ), número médio de pílulas/dia  $<6$  (OR 2,53, CI 95% 1.07 - 6,01,  $p=0.035$ ) e estar grávida (OR3.33, CI 95% 1.36 - 8.13,  $p=0.008$ ) estavam independentemente associados com maior adesão aos anti-retrovirais.

A mediana de tempo de uso dos anti-retrovirais para a nossa coorte de gestantes foi de 84 dias (IQR, 13-122), semelhante à mediana de tempo descrita em outros estudos (Lyons, Coughlan et al. 2005; Kakehasi, Tupinambas et al. 2007). Ao analisarmos a mediana de tempo de uso dos anti-retrovirais para a população de gestantes em que detectamos mutações principais após o início da quimioprofilaxia, observamos que a mesma foi de 121,5 dias (77,5 – 149,5). Na nossa análise multivariada observamos que quanto maior o tempo de uso de HAART em dias, maior é o risco de detecção de nova mutação neste grupo de mulheres, ou seja, a cada dia a mais de uso de HAART estima-se um acréscimo de 1,0% na incidência

de detecção de nova mutação (RR=1,01; IC 95%: 1,00-1,02; valor de  $p < 0,005$ ). Isso poderia ser explicado pelo maior tempo de exposição às drogas, menor adesão ao regime anti-retroviral com o decorrer do tempo, e, portanto, maior probabilidade de desenvolvimento de mutações de resistência.

No primeiro estudo publicado sobre a emergência de mutações após o início e interrupção de HAART para prevenção da transmissão materno infantil do HIV-1, Lyons e colaboradores detectaram mutações de resistência no pós-parto em 13% (5/39) das mulheres tratadas primariamente para prevenção da transmissão materno infantil do HIV (Lyons, Coughlan et al. 2005). Todas as 39 mulheres tinham contagem de CD4 na primeira visita acima de 300 células/mm<sup>3</sup>, começaram terapia anti-retroviral tríplice no terceiro trimestre, e descontinuaram a profilaxia após o parto. Este estudo mostrou que todas as mulheres que desenvolveram resistência tinham carga viral baixa ou indetectável no momento do parto, e eram mulheres que usaram nevirapina no esquema anti-retroviral. Neste estudo a duração média de exposição aos anti-retrovirais de 70 dias e a nevirapina foi descontinuada imediatamente após o parto, e AZT+3TC foram mantidas por mais 05 dias após o parto. Entretanto, mesmo com essa estratégia 13% das mulheres desenvolveram mutações para a Nevirapina.

O desenvolvimento de mutações de resistência associado aos ITRNN em mulheres recebendo HAART é variável. A resistência é descrita com taxas entre 0%–28,7%, especialmente para os regimes contendo Nevirapina (Cunningham, Chaix et al. 2002; Lyons, Coughlan et al. 2005; Overton, Sungkanuparph et al. 2005; Duran, Losso et al. 2007; Truong 2007; Paredes 2008).

Pesquisadores acreditavam que usando terapia combinada durante a gravidez e a interrupção estruturada da terapia anti-retroviral após o parto pudessem contrabalançar o lento clearance plasmático da nevirapina e de outras drogas com meia-vida plasmática longa. Para corroborar isso, os estudos de McIntyre e colaboradores (McIntyre 2006), observaram menos resistência quando adicionavam Zidovudina/lamivudina ao esquema de dose única de Nevirapina e continuavam essas drogas por 4 a 7 dias no pós-parto (Eshleman, Becker-Pergola et al. 2001).

Na nossa coorte iniciada em 2005, da mesma forma que os estudos conduzidos por Kakehasi *et al* e Perez *et al*, todas as mulheres interromperam os anti-retrovirais logo após o parto (Kakehasi, Tupinambas *et al.* 2007; Perez, Vignoles *et al.* 2008). No nosso estudo 22,3% (31/139) das gestantes fizeram uso de Nevirapina como parte do esquema HAART, e a incidência global de mutações para os ITRNN após o início e interrupção de esquema contendo inibidores de transcriptase reversa não análogo aos nucleosídeos foi de 19%.

Em virtude da possibilidade de emergência de mutações de resistência aos anti-retrovirais após a suspensão da quimioprofilaxia, outras estratégias precisam ser avaliadas mesmo para pacientes que tenham baixa carga viral próximo ao parto. As estratégias poderiam ser de um planejamento diferente de descontinuação de drogas do regime anti-retroviral, ou a mudança da Nevirapina para um Inibidor de Protease com alta barreira genética, como o Lopinavir/r, tendo em vista o período de até três semanas em que se detectam os níveis séricos dos ITRNN. A suspensão de todas as drogas simultaneamente deveria então ser feita após três semanas dessa substituição, se o RNA do HIV-1 estiver menor que 80 cópias/mL. Desta forma, minimiza-se o risco de uma possível terapia dupla.

O aparecimento de mutações significantes em mulheres em uso de anti-retrovirais durante a gestação pode afetar a resposta futura a terapia (Lockman and McIntyre 2007). Jourdain e colaboradores (Jourdain, Ngo-Giang-Huong *et al.* 2004), reportaram que mulheres que posteriormente recebam esquema anti-retroviral de alta potência (HAART) contendo nevirapina, tem menor probabilidade de ter supressão viral.

Diferentemente do nosso estudo que detectou mais mutações para os ITRN e ITRNN, Kakehasi *et al*, observaram alta taxa de resistência ao Nelfinavir (23,5%) entre as pacientes expostas a esta droga: duas mutações principais (**D30N e L90M**) e mutações acessórias (**N88S/D**). Podemos supor que esse achado se deve ao fato dessa coorte tido uma casuística pequena (30 gestantes), e também pelas concentrações baixas de Nelfinavir atingidas durante a gestação (Nellen, 2004; Villani, 2006) podendo levar ao desenvolvimento de resistência. Villani e colaboradores demonstraram que mulheres portadoras de infecção pelo HIV-1 eram expostas a concentrações subterapêuticas de NFV no final da gravidez. No estudo

de Kakehasi, todos os anti-retrovirais foram suspensos logo após o parto. A resposta virológica obtida por esse grupo de mulheres e o número pequeno de observações nesse grupo poderia explicar o não aparecimento de mutação de resistência para os ITRNN. Outro aspecto importante é o momento de coleta das amostras e a metodologia utilizada nesse estudo, que também são fatores limitantes, pois uma única coleta com 24 semanas após a interrupção do uso de anti-retrovirais poderia não ser um momento ideal para detecção de mutações de resistência, uma vez que poderia ter havido reversão da população viral mutante para uma população viral selvagem. No nosso estudo, observamos que a mutação **M184V**, detectada em gestantes que fizeram uso de esquemas com Nelfinavir, apareceram tão cedo quanto no parto, e principalmente nas amostras colhidas entre 02 e 04 semanas pós parto.

Vários estudos têm mostrado dados conflitantes na evolução do perfil de mutações após a interrupção de anti-retrovirais em pacientes altamente experimentados. Devereux e colaboradores relataram um declínio rápido e significativo nas mutações principais quando amostras de 22 pacientes multi-experimentados foram analisadas 6,4 semanas depois da interrupção dos anti-retrovirais (Devereux, 1999). Apenas duas mutações (**70R e 215Y/F**) se mantiveram detectáveis após a interrupção de ZDV. Balduin e cols descreveram que durante as interrupções de tratamento podemos observar diversos padrões evolutivos das mutações de resistência: desaparecimento de todas as mutações, desaparecimento de algumas mutações e permanência de mutações (Balduin, Sierra et al. 2005). Estudo de Little e colaboradores mostraram que a população de vírus selvagem pode retornar após o desenvolvimento de cepas resistentes; o tempo médio para a reversão para vírus selvagem foi de 365 e 362 dias, respectivamente, para as mutações associadas aos ITRNN e para as mutações associadas aos ITRN; para os Inibidores de Protease não houve reversão (Little 2004).

No nosso estudo, por ser prospectivo, pudemos analisar as amostras de plasma colhidas no parto, 02 semanas, 04 semanas, e 06 meses após o parto, aumentando, portanto, a chance de detecção de mutações.

Diferentemente dos resultados do nosso estudo e do estudo de Lyons em que encontramos mutações de resistência para os ITRNN, Perez e colaboradores

(Perez, Vignoles et al. 2008), encontraram baixa detecção de resistência anti-retroviral em gestantes com critérios de inclusão semelhantes aos nossos. No estudo de Perez foram incluídas 20 gestantes que fizeram uso na gestação de esquema com a Nevirapina (NVP). A mediana da Carga Viral para o HIV-1 no momento do parto foi < 50 cópias/mL. As amostras de sangue do pós-parto foram colhidas no período de 01 a 15 meses após a interrupção dos anti-retrovirais, mediana de 03 meses, para avaliação de seqüenciamento padrão (PCR) e seqüenciamento seletivo em tempo real (SPCR) do HIV-1. Nenhuma mutação associada com resistência a 3TC ou NVP foi encontrada pelo seqüenciamento padrão. Uma limitação do estudo de Perez é que o número de mutações pode ter sido subestimado devido ao pequeno número de gestantes observadas neste estudo e a grande variação no tempo para as coletas de amostras para genotipagem (mediana de 03 meses, 1-15, IQR, 2-4 meses).

A nossa incidência global de mutações 13,8% (17/123) após a interrupção dos anti-retrovirais também difere dos resultados de Truong *et al* (Truong 2007) e Perez *et al* (Perez, Vignoles et al. 2008), que não detectaram mutações de resistência após a interrupção da quimioprofilaxia com anti-retrovirais. Entretanto, o pequeno número de observações nessas coortes pode ter subestimado a incidência real de mutações de resistência.

Em outro estudo, Duran e colaboradores (Duran, Losso et al. 2007), avaliaram a presença de mutações de resistência principal em mulheres recebendo terapia anti-retroviral para prevenção da transmissão materno infantil do HIV-1 na coorte observacional do NISDI Perinatal Study. De 819 mulheres acompanhadas, 55 mulheres tinham amostras para análise na primeira visita e no período de 06 a 12 semanas pós-parto, e, destas últimas, mutações de resistência foram detectadas em onze amostras (20%) na visita inicial ou na visita de 06 a 12 semanas pós-parto. Nesse estudo, 16% das mulheres que receberam um esquema anti-retroviral contendo Nevirapina desenvolveram mutações, mas nenhuma delas estava associada ao uso da Nevirapina, diferentemente do nosso estudo, onde detectamos incidência de mutações para os ITRNN de 19% após o início e interrupção de esquema contendo inibidores não análogos aos nucleosídeos.

Mais recentemente, Paredes e Cols. (Paredes 2008) também encontraram alta frequência de mutações para a Lamivudina e para ITRNN em gestantes que fizeram quimioprofilaxia com anti-retrovirais para a prevenção da transmissão vertical do HIV-1 nos Estados Unidos da América - resultados do Women and Infant Transmission Study - WITS. Foram analisadas amostras de 114 gestantes, virgens de terapia anti-retroviral, incluídas na coorte WITS, que tinham amostras de plasma congeladas, colhidas entre 02 e 06 meses pós-parto. Os dados sócio-demográficos, CD4 e carga viral do HIV-1 são comparáveis aos do nosso estudo. Entre os esquemas anti-retrovirais utilizados, 75% receberam AZT+3TC+Nelfinavir e 8,2% AZT+3TC+Nevirapina, e 16,8% receberam AZT+3TC. Nessa coorte foi encontrado na genotipagem padrão a mutação **M184V/I** e a mutação **K103N** em 28,7% e 25% das mulheres, respectivamente. A incidência da mutação **M184V** e da mutação **K103N** foi maior do que a encontrada no nosso estudo, entretanto é importante notar que no estudo de Paredes e colaboradores, 16,8% das gestantes fizeram uso de terapia dupla com AZT+3TC, o que pode ter facilitado a emergência de mutações **M184V**, além do pequeno número de gestantes que fizeram uso de Nevirapina neste estudo (n=10)

## 6.7 DISCUSSÃO DO MODELO MULTIVARIADO

Os fatores de risco para o aparecimento de novas mutações após a introdução de HAART são pouco descritos na literatura. No presente estudo, as mulheres com RNA do HIV-1 detectável no momento do parto apresentaram um risco de detecção de mutação no parto/pós-parto 3,5 vezes aquele observado entre as mulheres com RNA do HIV-1 indetectável neste mesmo momento (RR = 3,50; IC 95%: 1,20-10,65; valor de  $p < 0,05$ ). Este achado está em consonância com o já descrito por outros autores, que mostram que em pacientes tratados com anti-retrovirais e com carga viral plasmática do HIV detectável, a prevalência de resistência a pelo menos uma droga pode alcançar 80% (Richman 2004; Costagliola, Descamps et al. 2007). A associação entre a carga viral detectável no parto e o desenvolvimento de novas mutações possibilita especular acerca da recomendação

da suspensão do anti-retroviral utilizado para a quimioprofilaxia da transmissão vertical somente após o alcance dos níveis de indetectabilidade, e isso não necessariamente ocorre no momento do parto.

A detectabilidade da carga viral plasmática pode estar associada a fatores tais como baixa adesão ao tratamento anti-retroviral, ao uso de esquemas com baixa barreira genética e ao uso de anti-retrovirais com perfil farmacocinético desfavorável. No nosso estudo, 62,8% das grávidas utilizaram nelfinavir como parte do seu esquema anti-retroviral combinado, sendo essa uma droga que atinge baixas concentrações na gestante (Nellen, Schillevoort et al. 2004; Villani, Florida et al. 2006; Bryson, Mirochnick et al. 2008). Além disso, o grande número de comprimidos desse esquema terapêutico certamente interfere na adesão (Bardeguéz, Lindsey et al. 2008).

No nosso estudo, a presença de resistência primária mostrou ser um fator independentemente associado à incidência de mutações no parto e após a interrupção dos anti-retrovirais. Diversos estudos já identificaram o impacto da transmissão de vírus resistente levando a uma pior resposta virológica e imunológica ao tratamento anti-retroviral (Grant, Hecht et al. 2002; Little, Holte et al. 2002; Chaix, Rouet et al. 2005). A resistência transmitida pode levar a uma resposta sub-ótima a terapia anti-retroviral, o que, em países desenvolvidos levou a recomendação de análise genotípica antes do início do tratamento (Hirsch, Brun-Vezinet et al. 2003; Yeni, Cooper et al. 2006).

No nosso estudo, o tempo de uso de HAART mostrou-se independentemente associado à incidência de resistência após a introdução da quimioprofilaxia para a prevenção da transmissão vertical nessa coorte, sendo que quanto maior o tempo de uso desse esquema maior a chance de detecção de mutações. Uma possível explicação para isso pode estar relacionada à adesão insuficiente. Má adesão durante a gestação pode levar a uma supressão viral sub-ótima, desenvolvimento de resistência viral e um maior risco de transmissão vertical do HIV, bem como a possível transmissão de um vírus resistente (Haubrich, Little et al. 1999; Bangsberg, Hecht et al. 2000; Johnson, Petropoulos et al. 2001). Alguns estudos demonstraram que a adesão aos anti-retrovirais é melhor durante a gestação que no pós-parto, mas que ainda assim essa adesão encontra-se significativamente abaixo dos níveis

ideais para manutenção da supressão viral (Bardeguéz, Lindsey et al. 2008). Preditores conhecidos de falha aos antiretrovirais incluem a baixa aderência, falha virológica prévia, elevada carga viral pré-HAART, baixas contagens de linfócitos CD4, consultas perdidas e a menor idade. Destas, a aderência aos anti-retrovirais tem se mostrado como um dos mais importantes preditores de sucesso virológico, prevenindo a progressão da doença (Haubrich, Little et al. 1999; Gifford, Bormann et al. 2000; Bangsberg, Hecht et al. 2001; Gross, Bilker et al. 2001). Entretanto, a avaliação de aderência pelos profissionais de saúde, assim como a documentação da relação entre a aderência e a falha virológica, na maioria das vezes, não ocorre de forma adequada o que prejudica estimar com a acurácia a aderência do paciente aos anti-retrovirais (Gross 2002; Osterberg and Blaschke 2005).

A seleção de variantes do HIV com resistência aos anti-retrovirais é um importante fator limitante da eficácia do tratamento. Em um estudo conduzido com indivíduos com infecção pelo HIV-1 com resistência primária, o vírus não foi suprimido por regimes de tratamento anti-retroviral potente seguinte à terapia de indução (Little, Holte et al. 2002). Respostas mais baixas à terapia podem levar à replicação viral adicional e contribuir para uma maior evolução da resistência aos anti-retrovirais. Este efeito pode ainda ser exacerbado naqueles pacientes com baixa aderência. A presença das mutações reversoras no códon **215**, parece ter um impacto negativo sobre a resposta virológica. *In vitro*, vírus com a substituição **T215D/C** desenvolve resistência à zidovudina mais rapidamente do que o vírus selvagem (Garcia-Lerma, MacInnes et al. 2004). Em um estudo recente, falha virológica à terapia de primeira linha baseada em ITRN foi observada em 47% dos pacientes com variantes **T215** na visita inicial comparada com 30% dos pacientes sem estas mutações (Violin, Velleca et al. 2004).

## 7 CONCLUSÕES

- No nosso estudo observamos alta prevalência de mutações de Resistência Primária (11,3%). A presença de resistência primária mostrou-se um fator independentemente associado à incidência de mutações no parto e após a interrupção dos anti-retrovirais.
- 13,8% das gestantes desenvolveram mutações de resistência nas visitas subseqüentes após a introdução e interrupção de anti-retrovirais (7,3% para os *ITRN*, 19% para os *ITRNN* e 3,2% para os *IP*)
- Entre as gestantes que tinham mutações de resistência primária, 28,5% desenvolveram novas mutações após a interrupção dos anti-retrovirais.
- As mutações polimórficas G335CD estavam presentes em 9,7% das gestantes na visita pré-tratamento.
- O subtipo do HIV-1 mais prevalente na nossa coorte foi o B (76,4%), seguido do F e recombinantes.
- Não houve impacto negativo imunológico (CD4) e virológico (RNA do HIV-1) até seis meses após a interrupção dos anti-retrovirais.
- Encontramos alta prevalência de Infecção Recente para o HIV-1 (13,9%) na nossa coorte.
- Não houve transmissão vertical do HIV-1.

## 8 RECOMENDAÇÕES

- A elevada prevalência de resistência primária em gestantes virgens de terapia anti-retroviral, aponta para a necessidade de realização de genotipagem de rotina para gestantes infectadas pelo HIV-1, em áreas selecionadas do país, onde a exposição aos anti-retrovirais seja mais antiga antes do início da quimioprofilaxia ou tratamento com anti-retrovirais.
- Deve ser utilizado esquema anti-retroviral de alta potência com Inibidor de Protease que tenha alta barreira genética para o desenvolvimento de mutações de resistência, para prevenção da transmissão vertical do HIV-1, e, para as mulheres que não precisem mantê-lo para sua saúde, a terapia só deverá ser interrompida quando o RNA do HIV-1 estiver indetectável.
- Atenção especial deve ser dada ao Terminal C nas genotipagens, devido ao risco de desenvolvimento de resistência de alto nível para a Zidovudina em mulheres HIV+ com a substituição G335CD+TAMs. Essa substituição pode comprometer a profilaxia com anti-retrovirais em gestações subsequentes, ou quando houver necessidade de início de esquema anti-retroviral como tratamento.
- Os nossos dados apontam para a necessidade de realização de ensaios clínicos randomizados para avaliar o impacto da interrupção **vs** manutenção da anti-retrovirais no pós-parto.

## BIBLIOGRAFIA

- (1994). "Caesarean section and risk of vertical transmission of HIV-1 infection. The European Collaborative Study." *Lancet* 343(8911): 1464-7.
- (1996). "Rate of vertical transmission of HIV high in Black South Africans." *AIDS Wkly Plus*: 17-8.
- (2001). "Routinely recommended HIV testing at an urban urgent-care clinic--Atlanta, Georgia, 2000." *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 50(25): 538-41.
- (2003). "Incorporating HIV prevention into the medical care of persons living with HIV. Recommendations of CDC, the Health Resources and Services Administration, the National Institutes of Health, and the HIV Medicine Association of the Infectious Diseases Society of America." *MMWR Recomm Rep* 52(RR-12): 1-24.
- (2007). "Evidence of a decline in transmitted HIV-1 drug resistance in the United Kingdom." *Aids* 21(8): 1035-9.
- Abecasis, A., D. Paraskevis, et al. (2005). "HIV-1 genetic variants circulation in the North of Angola." *Infect Genet Evol* 5(3): 231-7.
- Abecasis, A. B., K. Deforche, et al. (2005). "Protease mutation M89I/V is linked to therapy failure in patients infected with the HIV-1 non-B subtypes C, F or G." *Aids* 19(16): 1799-806.
- Accetturi, C. A., R. Pardini, et al. (2000). "Effects of CCR5 genetic polymorphism and HIV-1 subtype in antiretroviral response in Brazilian HIV-1-infected patients." *J Acquir Immune Defic Syndr* 24(4): 399-400.
- Ala, P. J., E. E. Huston, et al. (1997). "Molecular basis of HIV-1 protease drug resistance: structural analysis of mutant proteases complexed with cyclic urea inhibitors." *Biochemistry* 36(7): 1573-80.
- Alaeus, A. (2000). "Significance of HIV-1 genetic subtypes." *Scand J Infect Dis* 32(5): 455-63.
- Alliegro, M. B., M. Dorrucchi, et al. (1997). "Incidence and consequences of pregnancy in women with known duration of HIV infection. Italian Seroconversion Study Group." *Arch Intern Med* 157(22): 2585-90.
- Alves, K., K. P. Shafer, et al. (2003). "Risk factors for incident HIV infection among anonymous HIV testing site clients in Santos, Brazil: 1996-1999." *J Acquir Immune Defic Syndr* 32(5): 551-9.
- Andries, K., H. Azijn, et al. (2004). "TMC125, a novel next-generation nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor active against nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor-resistant human immunodeficiency virus type 1." *Antimicrob Agents Chemother* 48(12): 4680-6.
- Antinori, A., M. Zaccarelli, et al. (2002). "Cross-resistance among nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors limits recycling efavirenz after nevirapine failure." *AIDS Res Hum Retroviruses* 18(12): 835-8.
- Apetrei, C., I. Buzdugan, et al. (1994). "Nosocomial HIV-1 transmission and primary prevention in Romania." *Lancet* 344(8928): 1028-9.

- Apetrei, C., D. Descamps, et al. (1998). "Human immunodeficiency virus type 1 subtype F reverse transcriptase sequence and drug susceptibility." *J Virol* 72(5): 3534-8.
- Ariyoshi, K., M. Matsuda, et al. (2003). "Patterns of point mutations associated with antiretroviral drug treatment failure in CRF01\_AE (subtype E) infection differ from subtype B infection." *J Acquir Immune Defic Syndr* 33(3): 336-42.
- Asin, S. N., A. M. Heimberg, et al. (2008). "Estradiol and progesterone regulate HIV type 1 replication in peripheral blood cells." *AIDS Res Hum Retroviruses* 24(5): 701-16.
- Atkinson, B., J. Isaacson, et al. (2000). "Correlation between human immunodeficiency virus genotypic resistance and virologic response in patients receiving nelfinavir monotherapy or nelfinavir with lamivudine and zidovudine." *J Infect Dis* 182(2): 420-7.
- Bachelor, L., S. Jeffrey, et al. (2001). "Genotypic correlates of phenotypic resistance to efavirenz in virus isolates from patients failing nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor therapy." *J Virol* 75(11): 4999-5008.
- Bakas, C., D. M. Zarou, et al. (1996). "First-trimester spontaneous abortions and the incidence of human immunodeficiency virus seropositivity." *J Reprod Med* 41(1): 15-8.
- Balduin, M., S. Sierra, et al. (2005). "Evolution of HIV resistance during treatment interruption in experienced patients and after restarting a new therapy." *J Clin Virol* 34(4): 277-87.
- Balzarini, J., H. Pelemans, et al. (1998). "A novel mutation (F227L) arises in the reverse transcriptase of human immunodeficiency virus type 1 on dose-escalating treatment of HIV type 1-infected cell cultures with the nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor thiocarboxanilide UC-781." *AIDS Res Hum Retroviruses* 14(3): 255-60.
- Bangsberg, D. R., E. D. Charlebois, et al. (2003). "High levels of adherence do not prevent accumulation of HIV drug resistance mutations." *AIDS* 17(13): 1925-32.
- Bangsberg, D. R., F. M. Hecht, et al. (2000). "Adherence to protease inhibitors, HIV-1 viral load, and development of drug resistance in an indigent population." *Aids* 14(4): 357-66.
- Bangsberg, D. R., T. C. Porco, et al. (2004). "Modeling the HIV protease inhibitor adherence-resistance curve by use of empirically derived estimates." *J Infect Dis* 190(1): 162-5.
- Barbosa, R. M., T. G. do Lago, et al. (1996). "Sexuality and reproductive health care in Sao Paulo, Brazil." *Health Care Women Int* 17(5): 413-21.
- Barbour, J. D., F. M. Hecht, et al. (2004). "Persistence of primary drug resistance among recently HIV-1 infected adults." *AIDS* 18(12): 1683-9.
- Bardeguet, A. D., J. C. Lindsey, et al. (2008). "Adherence to antiretrovirals among US women during and after pregnancy." *J Acquir Immune Defic Syndr* 48(4): 408-17.
- Bauer, G. R., S. L. Welles, et al. (2003). "Zidovudine resistance phenotype and risk of perinatal HIV-1 transmission in zidovudine monotherapy-treated mothers with moderately advanced disease." *J Acquir Immune Defic Syndr* 34(3): 312-9.
- Beckerman, K. P. (2003). "Long-term findings of HIVNET 012: the next steps." *Lancet* 362(9387): 842-3.

- Bello, G., W. A. Eyer-Silva, et al. (2007). "Demographic history of HIV-1 subtypes B and F in Brazil." *Infect Genet Evol* 7(2): 263-70.
- Kavlick, M. F., K. Wyvill, et al. (1998). "Emergence of multi-dideoxynucleoside-resistant human immunodeficiency virus type 1 variants, viral sequence variation, and disease progression in patients receiving antiretroviral chemotherapy." *J Infect Dis* 177(6): 1506-13.
- Bennett, D. E., S. Bertagnolio, et al. (2008). "The World Health Organization's global strategy for prevention and assessment of HIV drug resistance." *Antivir Ther* 13 Suppl 2: 1-13.
- Bennett, D. E., M. Myatt, et al. (2008). "Recommendations for surveillance of transmitted HIV drug resistance in countries scaling up antiretroviral treatment." *Antivir Ther* 13 Suppl 2: 25-36.
- Bessinger, R., R. Clark, et al. (1998). "Pregnancy is not associated with the progression of HIV disease in women attending an HIV outpatient program." *Am J Epidemiol* 147(5): 434-40.
- Biggar, R. J., P. G. Miotti, et al. (1996). "Perinatal intervention trial in Africa: effect of a birth canal cleansing intervention to prevent HIV transmission." *Lancet* 347(9016): 1647-50.
- Bobkov, A. F., E. V. Kazennova, et al. (2004). "Temporal trends in the HIV-1 epidemic in Russia: predominance of subtype A." *J Med Virol* 74(2): 191-6.
- Bongertz, V., C. I. Costa, et al. (1998). "Neutralization susceptibility of B subtype variant B" primary HIV-1 isolates. The HEC/FIOCRUZ AIDS Clinical Research Group." *Scand J Immunol* 47(6): 603-8.
- Borroto-Esoda, K., F. Myrick, et al. (2004). "In vitro combination of amdoxovir and the inosine monophosphate dehydrogenase inhibitors mycophenolic acid and ribavirin demonstrates potent activity against wild-type and drug-resistant variants of human immunodeficiency virus type 1." *Antimicrob Agents Chemother* 48(11): 4387-94.
- Braun, P. and F. Wiesmann (2007). "Phenotypic assays for the determination of coreceptor tropism in HIV-1 infected individuals." *Eur J Med Res* 12(9): 463-72.
- Brehm, J. H., D. Koontz, et al. (2007). "Selection of mutations in the connection and RNase H domains of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase that increase resistance to 3'-azido-3'-dideoxythymidine." *J Virol* 81(15): 7852-9.
- Brenner, B., D. Turner, et al. (2003). "A V106M mutation in HIV-1 clade C viruses exposed to efavirenz confers cross-resistance to non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors." *AIDS* 17(1): F1-5.
- Brenner, B., M. A. Wainberg, et al. (2000). "Resistance to antiretroviral drugs in patients with primary HIV-1 infection. Investigators of the Quebec Primary Infection Study." *Int J Antimicrob Agents* 16(4): 429-34.
- Brenner, B. G., M. Roger, et al. (2007). "High rates of forward transmission events after acute/early HIV-1 infection." *J Infect Dis* 195(7): 951-9.
- Brigido, L., R. Rodrigues, et al. (2004). "CD4+ T-cell recovery and clinical outcome in HIV-1-infected patients exposed to multiple antiretroviral regimens: partial control of viremia is associated with favorable outcome." *AIDS Patient Care STDS* 18(4): 189-98.

- Brillant, J., Klumpp, K., Swallow, S. (2004). "In vitro resistance development for a second-generation NNRTI: TMC125." HIVDRW2004 [Abstract].
- Brindeiro, R. M., R. S. Diaz, et al. (2003). "Brazilian Network for HIV Drug Resistance Surveillance (HIV-BResNet): a survey of chronically infected individuals." *Aids* 17(7): 1063-9.
- Briones, C., M. Perez-Olmeda, et al. (2001). "Primary genotypic and phenotypic HIV-1 drug resistance in recent seroconverters in Madrid." *J Acquir Immune Defic Syndr* 26(2): 145-50.
- Brocklehurst, P. and R. French (1998). "The association between maternal HIV infection and perinatal outcome: a systematic review of the literature and meta-analysis." *Br J Obstet Gynaecol* 105(8): 836-48.
- Brown, C. R., M. Czapiga, et al. (2007). "Unique pathology in simian immunodeficiency virus-infected rapid progressor macaques is consistent with a pathogenesis distinct from that of classical AIDS." *J Virol* 81(11): 5594-606.
- Bryson, Y. J., M. Mirochnick, et al. (2008). "Pharmacokinetics and safety of nelfinavir when used in combination with zidovudine and lamivudine in HIV-infected pregnant women: Pediatric AIDS Clinical Trials Group (PACTG) Protocol 353." *HIV Clin Trials* 9(2): 115-25.
- Bulterys, M. and P. Lepage (1998). "Mother-to-child transmission of HIV." *Curr Opin Pediatr* 10(2): 143-50.
- Burton, G. J., S. O'Shea, et al. (1996). "Physical breaks in the placental trophoblastic surface: significance in vertical transmission of HIV." *Aids* 10(11): 1294-6.
- Calazans, A., R. Brindeiro, et al. (2005). "Low accumulation of L90M in protease from subtype F HIV-1 with resistance to protease inhibitors is caused by the L89M polymorphism." *J Infect Dis* 191(11): 1961-70.
- Campbell, T. B. and D. Katzenstein (2005). "Antiretroviral rounds. Resistance: how do you know if you don't know?" *AIDS Clin Care* 17(3): 26-7.
- Campodonico, M., W. Janssens, et al. (1996). "HIV type 1 subtypes in Argentina and genetic heterogeneity of the V3 region." *AIDS Res Hum Retroviruses* 12(1): 79-81.
- Campos, D. P., S. R. Ribeiro, et al. (2005). "Survival of AIDS patients using two case definitions, Rio de Janeiro, Brazil, 1986-2003." *Aids* 19 Suppl 4: S22-6.
- Cane, P. A., H. Green, et al. (2007). "Identification of accessory mutations associated with high-level resistance in HIV-1 reverse transcriptase." *AIDS* 21(4): 447-55.
- Cao, Y., P. Krogstad, et al. (1997). "Maternal HIV-1 viral load and vertical transmission of infection: the Ariel Project for the prevention of HIV transmission from mother to infant." *Nat Med* 3(5): 549-52.
- Caride, E., R. Brindeiro, et al. (2000). "Drug-resistant 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* 275(1): 107-15.
- Castro, E., G. Echeverria, et al. (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): 338-44.

CDC (2000). "PHLS abd STD Cebtre - Comunicable Diseases Sueveillance Centre and SCIE." 17 July 2000.

Ceccherini-Silberstein, F., A. Cozzi-Lepri, et al. (2007). "Impact of HIV-1 reverse transcriptase polymorphism F214L on virological response to thymidine analogue-based regimens in antiretroviral therapy (ART)-naive and ART-experienced patients." *J Infect Dis* 196(8): 1180-90.

Ceccherini-Silberstein, F., V. Svicher, et al. (2007). "Characterization and structural analysis of novel mutations in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase involved in the regulation of resistance to nonnucleoside inhibitors." *J Virol* 81(20): 11507-19.

Chaix, M. L., F. Rouet, et al. (2005). "Genotypic human immunodeficiency virus type 1 drug resistance in highly active antiretroviral therapy-treated children in Abidjan, Cote d'Ivoire." *Pediatr Infect Dis J* 24(12): 1072-6.

Chi, B. H., N. Chintu, et al. (2007b). "Expanded services for the prevention of mother-to-child HIV transmission: field acceptability of a pilot program in Lusaka, Zambia." *J Acquir Immune Defic Syndr* 45(1): 125-7.

Chi, B. H., M. Sinkala, et al. (2007a). "Single-dose tenofovir and emtricitabine for reduction of viral resistance to non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor drugs in women given intrapartum nevirapine for perinatal HIV prevention: an open-label randomised trial." *Lancet* 370(9600): 1698-705.

Chi, B. H., M. Sinkala, et al. (2007). "Early clinical and immune response to NNRTI-based antiretroviral therapy among women with prior exposure to single-dose nevirapine." *AIDS* 21(8): 957-64.

Chongsuvivatwong, V. (2008). "epicalc: Epidemiological calculator. R package version 2.7.1.2. ."

Cohn, S. E., T. Umbleja, et al. (2008). "Prior illicit drug use and missed prenatal vitamins predict nonadherence to antiretroviral therapy in pregnancy: adherence analysis A5084." *AIDS Patient Care STDS* 22(1): 29-40.

Colgrove, R. and A. Japour (1999). "A combinatorial ledge: reverse transcriptase fidelity, total body viral burden, and the implications of multiple-drug HIV therapy for the evolution of antiviral resistance." *Antiviral Res* 41(1): 45-56.

Colgrove, R. C., J. Pitt, et al. (1998). "Selective vertical transmission of HIV-1 antiretroviral resistance mutations." *AIDS* 12(17): 2281-8.

Coll, O., M. Hernandez, et al. (1997). "Vertical HIV-1 transmission correlates with a high maternal viral load at delivery." *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 14(1): 26-30.

Colonna, R., R. Rose, et al. (2004). "Identification of I50L as the signature atazanavir (ATV)-resistance mutation in treatment-naive HIV-1-infected patients receiving ATV-containing regimens." *J Infect Dis* 189(10): 1802-10.

Conlon, C. P., P. Klenerman, et al. (1994). "Heterosexual transmission of human immunodeficiency virus type 1 variants associated with zidovudine resistance." *J Infect Dis* 169(2): 411-5.

- Connor, E. M., R. S. Sperling, et al. (1994). "Reduction of maternal-infant transmission of human immunodeficiency virus type 1 with zidovudine treatment. Pediatric AIDS Clinical Trials Group Protocol 076 Study Group." *N Engl J Med* 331(18): 1173-80.
- Conway, B., V. Montessori, et al. (1999). "Primary lamivudine resistance in acute/early human immunodeficiency virus infection." *Clin Infect Dis* 28(4): 910-1.
- Coovadia, H. (2004). "Antiretroviral agents--how best to protect infants from HIV and save their mothers from AIDS." *N Engl J Med* 351(3): 289-92.
- Cornelissen, M., G. Kampinga, et al. (1996). "Human immunodeficiency virus type 1 subtypes defined by env show high frequency of recombinant gag genes. The UNAIDS Network for HIV Isolation and Characterization." *J Virol* 70(11): 8209-12.
- Costagliola, D., D. Descamps, et al. (2007). "Prevalence of HIV-1 drug resistance in treated patients: a French nationwide study." *J Acquir Immune Defic Syndr* 46(1): 12-8.
- Couto-Fernandez, J. C., W. A. Eyer-Silva, et al. (2006). "Phylogenetic analysis of Brazilian HIV type 1 subtype D strains: tracing the origin of this subtype in Brazil." *AIDS Res Hum Retroviruses* 22(2): 207-11.
- Couto-Fernandez, J. C., M. G. Morgado, et al. (1999). "HIV-1 subtyping in Salvador, Bahia, Brazil: a city with African sociodemographic characteristics." *J Acquir Immune Defic Syndr* 22(3): 288-93.
- Couto-Fernandez, J. C., C. Silva-de-Jesus, et al. (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* 100(1): 73-8.
- Couturier, E., F. Damond, et al. (2000). "HIV-1 diversity in France, 1996-1998. The AC 11 laboratory network." *AIDS* 14(3): 289-96.
- Covas, D. T., T. A. Biscaro, et al. (1998). "High frequency of the GWG (Pro Trp) envelope variant of HIV-1 in Southeast Brazil." *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 19(1): 74-9.
- Craft, S. M., R. O. Delaney, et al. (2007). "Pregnancy decisions among women with HIV." *AIDS Behav* 11(6): 927-35.
- Cressey, T. R., G. Jourdain, et al. (2005). "Persistence of nevirapine exposure during the postpartum period after intrapartum single-dose nevirapine in addition to zidovudine prophylaxis for the prevention of mother-to-child transmission of HIV-1." *J Acquir Immune Defic Syndr* 38(3): 283-8.
- Cunningham, C. K., M. L. Chaix, et al. (2002). "Development of resistance mutations in women receiving standard antiretroviral therapy who received intrapartum nevirapine to prevent perinatal human immunodeficiency virus type 1 transmission: a substudy of pediatric AIDS clinical trials group protocol 316." *J Infect Dis* 186(2): 181-8.
- Cunningham, C. K., D. W. Wara, et al. (2001). "Safety of 2 recombinant human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) envelope vaccines in neonates born to HIV-1-infected women." *Clin Infect Dis* 32(5): 801-7.

- Cunningham, S., B. Ank, et al. (2001). "Performance of the applied biosystems ViroSeq human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) genotyping system for sequence-based analysis of HIV-1 in pediatric plasma samples." *J Clin Microbiol* 39(4): 1254-7.
- Cu-Uvin, S., J. W. Hogan, et al. (1999). "Prevalence of lower genital tract infections among human immunodeficiency virus (HIV)-seropositive and high-risk HIV-seronegative women. HIV Epidemiology Research Study Group." *Clin Infect Dis* 29(5): 1145-50.
- Dabis, F., P. Msellati, et al. (1999). "6-month efficacy, tolerance, and acceptability of a short regimen of oral zidovudine to reduce vertical transmission of HIV in breastfed children in Cote d'Ivoire and Burkina Faso: a double-blind placebo-controlled multicentre trial. DITRAME Study Group. Diminution de la Transmission Mere-Enfant." *Lancet* 353(9155): 786-92.
- Darwich, L., A. Esteve, et al. (2008). "Drug-resistance mutations number and K70R or T215Y/F substitutions predict treatment resumption during guided treatment interruptions." *AIDS Res Hum Retroviruses* 24(5): 725-32.
- Datta, P., J. E. Embree, et al. (1994). "Mother-to-child transmission of human immunodeficiency virus type 1: report from the Nairobi Study." *J Infect Dis* 170(5): 1134-40.
- de Brito, A. M., J. L. de Sousa, et al. (2006). "[Trends in maternal-infant transmission of AIDS after antiretroviral therapy in Brazil]." *Rev Saude Publica* 40 Suppl: 18-22.
- De Jose, M. I., J. T. Ramos, et al. (2001). "Vertical transmission of HIV-1 variants resistant to reverse transcriptase and protease inhibitors." *Arch Intern Med* 161(22): 2738-9.
- De Luca, A., S. Di Giambenedetto, et al. (2006). "Three-year clinical outcomes of resistance genotyping and expert advice: extended follow-up of the Argenta trial." *Antivir Ther* 11(3): 321-7.
- de Martinez, A. M., E. F. Barbosa, et al. (2002). "Molecular epidemiology of HIV-1 in Rio Grande, RS, Brazil." *Rev Soc Bras Med Trop* 35(5): 471-6.
- de Ronde, A., E. R. de Rooij, et al. (1996). "[Zidovudine-resistant HIV strains in intravenous drug users and homosexual men in Amsterdam]." *Ned Tijdschr Geneesk* 140(17): 932-4.
- de Ronde, A., R. Schuurman, et al. (1996). "First case of new infection with zidovudine-resistant HIV-1 among prospectively studied intravenous drug users and homosexual men in Amsterdam, The Netherlands." *AIDS* 10(2): 231-2.
- de Ronde, A., M. van Dooren, et al. (2001). "Establishment of new transmissible and drug-sensitive human immunodeficiency virus type 1 wild types due to transmission of nucleoside analogue-resistant virus." *J Virol* 75(2): 595-602.
- De Sa Filho, D. J., M. C. Sucupira, et al. (2006). "Identification of two HIV type 1 circulating recombinant forms in Brazil." *AIDS Res Hum Retroviruses* 22(1): 1-13.
- Deeks, S. G. and B. D. Walker (2004). "The immune response to AIDS virus infection: good, bad, or both?" *J Clin Invest* 113(6): 808-10.
- Deforche, K., R. Camacho, et al. (2007). "Bayesian network analysis of resistance pathways against HIV-1 protease inhibitors." *Infect Genet Evol* 7(3): 382-90.
- Deforche, K., T. Silander, et al. (2006). "Analysis of HIV-1 pol sequences using Bayesian Networks: implications for drug resistance." *Bioinformatics* 22(24): 2975-9.

Delaugerre, C., M. Mouroux, et al. (2001). "Prevalence and conditions of selection of E44D/A and V118I human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase mutations in clinical practice." *Antimicrob Agents Chemother* 45(3): 946-8.

Delaugerre, C., L. Roudiere, et al. (2005). "Selection of a rare resistance profile in an HIV-1-infected patient exhibiting a failure to an antiretroviral regimen including tenofovir DF." *J Clin Virol* 32(3): 241-4.

Deshpande, A., V. Jauvin, et al. (2007). "Resistance mutations in subtype C HIV type 1 isolates from Indian patients of Mumbai receiving NRTIs plus NNRTIs and experiencing a treatment failure: resistance to AR." *AIDS Res Hum Retroviruses* 23(2): 335-40.

Devereux, H. L., M. Youle, et al. (1999). "Rapid decline in detectability of HIV-1 drug resistance mutations after stopping therapy." *Aids* 13(18): F123-7.

DHHS (2008). "Panel on Antiretroviral Guidelines for Adults and Adolescents. Guidelines for the use of antiretroviral agents in HIV-1-infected adults and adolescents. Department of Health and Human Services."

Diaz, R. S. (2006). "Orientações para o manuseio de testes de resistência anti-retroviral no paciente infectado pelo HIV."

Dickover, R. E., E. M. Garratty, et al. (1996). "Identification of levels of maternal HIV-1 RNA associated with risk of perinatal transmission. Effect of maternal zidovudine treatment on viral load." *Jama* 275(8): 599-605.

Dobbs, T., S. Kennedy, et al. (2004). "Performance characteristics of the immunoglobulin G-capture BED-enzyme immunoassay, an assay to detect recent human immunodeficiency virus type 1 seroconversion." *J Clin Microbiol* 42(6): 2623-8.

Dobbs, T. and B. S. Parekh (2003). "Detecting recent human immunodeficiency virus type 1 infection: why and how?" *MLO Med Lab Obs* 35(5): 12-4, 16, 19-20 passim; quiz 24-5.

Dorenbaum, A. and A. R. Miserez (2001). "HIV medical advances explored at retrovirus conference." *AIDS Policy Law* 16(10): 4.

D'Ubaldo, C., P. Pezzotti, et al. (1998). "Association between HIV-1 infection and miscarriage: a retrospective study. DIANAIDS Collaborative Study Group. Diagnosi Iniziale Anomalia Neoplastiche AIDS." *AIDS* 12(9): 1087-93.

Dumans, A. T., M. A. Soares, et al. (2002). "Prevalence of protease and reverse transcriptase 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): 3075-9.

Dunn, D. and M. L. Newell (1994). "Transmission of HIV-1 from one child to another. European Collaborative Study." *N Engl J Med* 330(18): 1313-4.

Duran, A. S., M. H. Losso, et al. (2007). "Drug resistance among HIV-infected pregnant women receiving antiretrovirals for prophylaxis." *AIDS* 21(2): 199-205.

Duwe, S., M. Brunn, et al. (2001). "Frequency of genotypic and phenotypic drug-resistant HIV-1 among therapy-naive patients of the German Seroconverter Study." *J Acquir Immune Defic Syndr* 26(3): 266-73.

Dykes, C. and L. M. Demeter (2007). "Clinical significance of human immunodeficiency virus type 1 replication fitness." *Clin Microbiol Rev* 20(4): 550-78.

Eastman, P. S., D. E. Shapiro, et al. (1998). "Maternal viral genotypic 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(3): 557-64.

Ekpini, R. A., J. N. Nkengasong, et al. (2002). "Changes in plasma HIV-1-RNA viral load and CD4 cell counts, and lack of zidovudine resistance among pregnant women receiving short-course zidovudine." *Aids* 16(4): 625-30.

El-Far, F., E. A. Medeiros, et al. (2005). "Antiretroviral drug resistance among patients with human immunodeficiency virus who act as sources or potential sources in occupational accidents involving healthcare workers." *Infect Control Hosp Epidemiol* 26(9): 782-8.

Erice, A., D. L. Mayers, et al. (1993). "Brief report: primary infection with zidovudine-resistant human immunodeficiency virus type 1." *N Engl J Med* 328(16): 1163-5.

Eron, J., Jr., P. Yeni, et al. (2006). "The KLEAN study of fosamprenavir-ritonavir versus lopinavir-ritonavir, each in combination with abacavir-lamivudine, for initial treatment of HIV infection over 48 weeks: a randomised non-inferiority trial." *Lancet* 368(9534): 476-82.

Eshleman, S. H., G. Becker-Pergola, et al. (2001). "Impact of human immunodeficiency virus type 1 (hiv-1) subtype on women receiving single-dose nevirapine prophylaxis to prevent hiv-1 vertical transmission (hiv network for prevention trials 012 study)." *J Infect Dis* 184(7): 914-7.

Eshleman, S. H., L. A. Guay, et al. (2004). "Characterization of nevirapine resistance mutations in women with subtype A vs. D HIV-1 6-8 weeks after single-dose nevirapine (HIVNET 012)." *J Acquir Immune Defic Syndr* 35(2): 126-30.

Eshleman, S. H., L. A. Guay, et al. (2004). "Comparison of nevirapine (NVP) resistance in Ugandan women 7 days vs. 6-8 weeks after single-dose nvp prophylaxis: HIVNET 012." *AIDS Res Hum Retroviruses* 20(6): 595-9.

Eshleman, S. H., M. Mracna, et al. (2001). "Selection and fading of resistance mutations in women and infants receiving nevirapine to prevent HIV-1 vertical transmission (HIVNET 012)." *Aids* 15(15): 1951-7.

Fang, G., H. Burger, et al. (1995). "Maternal plasma human immunodeficiency virus type 1 RNA level: a determinant and projected threshold for mother-to-child transmission." *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(26): 12100-4.

Ferradini, L., A. Jeannin, et al. (2006). "Scaling up of highly active antiretroviral therapy in a rural district of Malawi: an effectiveness assessment." *Lancet* 367(9519): 1335-42.

Fonseca, M. G., F. I. Bastos, et al. (2000). "[AIDS and level of education in Brazil: temporal evolution from 1986 to 1996]." *Cad Saude Publica* 16(## Suppl 1): 77-87.

Foulkes-Murzycki, J. E., W. R. Scott, et al. (2007). "Hydrophobic sliding: a possible mechanism for drug resistance in human immunodeficiency virus type 1 protease." *Structure* 15(2): 225-33.

Frenkel, L. M., L. E. Wagner, 2nd, et al. (1995a). "Specific, sensitive, and rapid assay for human immunodeficiency virus type 1 pol mutations associated with resistance to zidovudine and didanosine." *J Clin Microbiol* 33(2): 342-7.

Frenkel, L. M., L. E. Wagner, 2nd, et al. (1995b). "Effects of zidovudine use during pregnancy on resistance and vertical transmission of human immunodeficiency virus type 1." *Clin Infect Dis* 20(5): 1321-6.

Frenkel, L. M., Y. Wang, et al. (2003). "Multiple viral genetic analyses detect low-level human immunodeficiency virus type 1 replication during effective highly active antiretroviral therapy." *J Virol* 77(10): 5721-30.

Gallant, J. E. (2004). "HIV infection--how to lower your risk." *Am Fam Physician* 70(2): 307-8.

Gallant, J. E., E. DeJesus, et al. (2006). "Tenofovir DF, emtricitabine, and efavirenz vs. zidovudine, lamivudine, and efavirenz for HIV." *N Engl J Med* 354(3): 251-60.

Gallego, O., A. Corral, et al. (2002). "Prevalence of G333D/E in naive and pretreated HIV-infected patients." *AIDS Res Hum Retroviruses* 18(12): 857-60.

Gallego, O., L. Ruiz, et al. (2001). "Changes in the rate of genotypic resistance to antiretroviral drugs in Spain." *AIDS* 15(14): 1894-6.

Galvao-Castro, B., J. Ivo-Dos-Santos, et al. (1987). "Isolation and antigenic characterization of human immunodeficiency virus (HIV) in Brazil." *Mem Inst Oswaldo Cruz* 82(4): 453-6.

Garcia-Lerma, J. G. and W. Heneine (2001). "Resistance of human immunodeficiency virus type 1 to reverse transcriptase and protease inhibitors: genotypic and phenotypic testing." *J Clin Virol* 21(3): 197-212.

Garcia-Lerma, J. G., H. Maclnnes, et al. (2004). "Transmitted human immunodeficiency virus type 1 carrying the D67N or K219Q/E mutation evolves rapidly to zidovudine resistance in vitro and shows a high replicative fitness in the presence of zidovudine." *J Virol* 78(14): 7545-52.

Geretti, A. M. (2007). "Resistance testing methodologies and mechanisms of resistance." *J HIV Ther* 12(4): 84-7.

Geskus, R. B., M. Prins, et al. (2007). "The HIV RNA setpoint theory revisited." *Retrovirology* 4: 65.

Ghosn, J., I. Pellegrin, et al. (2006). "HIV-1 resistant strains acquired at the time of primary infection massively fuel the cellular reservoir and persist for lengthy periods of time." *Aids* 20(2): 159-70.

Gianotti, N., L. Galli, et al. (2006). "The 118I reverse transcriptase mutation is the only independent genotypic predictor of virologic failure to a stavudine-containing salvage therapy in HIV-1-infected patients." *J Acquir Immune Defic Syndr* 41(4): 447-52.

Gianvecchio, R. P. and T. B. Goldberg (2005). "[Protective and risk factors related to vertical transmission of the HIV-1]." *Cad Saude Publica* 21(2): 581-8.

Gifford, A. L., J. E. Bormann, et al. (2000). "Predictors of self-reported adherence and plasma HIV concentrations in patients on multidrug antiretroviral regimens." *J Acquir Immune Defic Syndr* 23(5): 386-95.

Girouard, M., K. Diallo, et al. (2003). "Mutations E44D and V118I in the reverse transcriptase of HIV-1 play distinct mechanistic roles in dual resistance to AZT and 3TC." J Biol Chem **278**(36): 34403-10.

Gonzalez, C. R., R. Alcalde, et al. (2007). "Drug resistance among chronic HIV-1-infected patients naive for use of anti-retroviral therapy in Sao Paulo city." Virus Res **129**(2): 87-90.

Gonzales, M. J., I. Belitskaya, et al. (2003). "Protease and reverse transcriptase mutation patterns in HIV type 1 isolates from heavily treated persons: comparison of isolates from Northern California with isolates from other regions." AIDS Res Hum Retroviruses **19**(10): 909-15.

Goudsmit, J., A. de Ronde, et al. (1997). "Broad spectrum of in vivo fitness of human immunodeficiency virus type 1 subpopulations differing at reverse transcriptase codons 41 and 215." J Virol **71**(6): 4479-84.

Gouws, E., B. G. Williams, et al. (2002). "High incidence of HIV-1 in South Africa using a standardized algorithm for recent HIV seroconversion." J Acquir Immune Defic Syndr **29**(5): 531-5.

Grant, R. M., F. M. Hecht, et al. (2002). "Time trends in primary HIV-1 drug resistance among recently infected persons." Jama **288**(2): 181-8.

Grinsztejn, B., F. I. Bastos, et al. (2006). "Assessing sexually transmitted infections in a cohort of women living with HIV/AIDS, in Rio de Janeiro, Brazil." Int J STD AIDS **17**(7): 473-8.

Grinsztejn, B., V. G. Veloso, et al. (2007). "Comparison of Clinical Response to Initial Highly Active Antiretroviral Therapy in the Patients in Clinical Care in the United States and Brazil." J Acquir Immune Defic Syndr.

Gross, R. (2002). "Adherence to HIV drug therapy." LDI Issue Brief **8**(3): 1-4.

Gross, R., W. B. Bilker, et al. (2001). "Effect of adherence to newly initiated antiretroviral therapy on plasma viral load." Aids **15**(16): 2109-17.

Grossman, Z., E. E. Paxinos, et al. (2004). "Mutation D30N is not preferentially selected by human immunodeficiency virus type 1 subtype C in the development of resistance to nelfinavir." Antimicrob Agents Chemother **48**(6): 2159-65.

Guay, L. A., P. Musoke, et al. (1999). "Intrapartum and neonatal single-dose nevirapine compared with zidovudine for prevention of mother-to-child transmission of HIV-1 in Kampala, Uganda: HIVNET 012 randomised trial." Lancet **354**(9181): 795-802.

Guimaraes, M. L., A. dos Santos Moreira, et al. (2002). "High frequency of recombinant genomes in HIV type 1 samples from Brazilian southeastern and southern regions." AIDS Res Hum Retroviruses **18**(17): 1261-9.

Guimaraes, M. L., W. A. Eyer-Silva, et al. (2008). "Identification of two new CRF\_BF in Rio de Janeiro State, Brazil." AIDS **22**(3): 433-5.

Gupta, P., L. Kingsley, et al. (2003). "High incidence and prevalence of HIV-1 infection in high risk population in Calcutta, India." Int J STD AIDS **14**(7): 463-8.

Hachiya, A., P. Sriwiranont, et al. (2007). "Gene transfer in human skin with different pseudotyped HIV-based vectors." Gene Ther **14**(8): 648-56.

Hammer, S. M., R. Bassett, et al. (2003). "A randomized trial of nelfinavir and abacavir in combination with efavirenz and adefovir dipivoxil in HIV-1-infected persons with virological failure receiving indinavir." *Antivir Ther* 8(6): 507-18.

Hare, C. B., J. Mellors, et al. (2008). "Detection of nonnucleoside reverse-transcriptase inhibitor-resistant HIV-1 after discontinuation of virologically suppressive antiretroviral therapy." *Clin Infect Dis* 47(3): 421-4.

Harrigan, P. R., R. S. Hogg, et al. (2005). "Predictors of HIV drug-resistance mutations in a large antiretroviral-naive cohort initiating triple antiretroviral therapy." *J Infect Dis* 191(3): 339-47.

Harrigan, P. R., M. Salim, et al. (2002). "A mutation in the 3' region of the human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase (Y318F) associated with nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor resistance." *J Virol* 76(13): 6836-40.

Haubrich, R. H., S. J. Little, et al. (1999). "The value of patient-reported adherence to antiretroviral therapy in predicting virologic and immunologic response. California Collaborative Treatment Group." *Aids* 13(9): 1099-107.

Heard, I., R. Sitta, et al. (2007). "Reproductive choice in men and women living with HIV: evidence from a large representative sample of outpatients attending French hospitals (ANRS-EN12-VESPA Study)." *Aids* 21 Suppl 1: S77-82.

Hecht, F. M. and R. M. Grant (2005). "Resistance testing in drug-naive HIV-infected patients: is it time?" *Clin Infect Dis* 41(9): 1324-5.

Hecht, F. M., R. M. Grant, et al. (1998). "Sexual transmission of an HIV-1 variant resistant to multiple reverse-transcriptase and protease inhibitors." *N Engl J Med* 339(5): 307-11.

Hertogs, K., S. Bloor, et al. (2000). "A novel human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase mutational pattern confers phenotypic lamivudine resistance in the absence of mutation 184V." *Antimicrob Agents Chemother* 44(3): 568-73.

Hirsch, M. S., F. Brun-Vezinet, et al. (2003). "Antiretroviral drug resistance testing in adults infected with human immunodeficiency virus type 1: 2003 recommendations of an International AIDS Society-USA Panel." *Clin Infect Dis* 37(1): 113-28.

Hirsch, M. S., B. Conway, et al. (1998). "Antiretroviral drug resistance testing in adults with HIV infection: implications for clinical management. International AIDS Society--USA Panel." *Jama* 279(24): 1984-91.

Hocke, C., P. Morlat, et al. (1995). "Prospective cohort study of the effect of pregnancy on the progression of human immunodeficiency virus infection. The Groupe d'Epidemiologie Clinique Du SIDA en Aquitaine." *Obstet Gynecol* 86(6): 886-91.

Howard, A. A., J. H. Arnsten, et al. (2002). "A prospective study of adherence and viral load in a large multi-center cohort of HIV-infected women." *AIDS* 16(16): 2175-82.

Hu, D. J., S. Vanichseni, et al. (2003). "HIV type 1 incidence estimates by detection of recent infection from a cross-sectional sampling of injection drug users in Bangkok: use of the IgG capture BED enzyme immunoassay." *AIDS Res Hum Retroviruses* 19(9): 727-30.

Huang, H., R. Chopra, et al. (1998). "Structure of a covalently trapped catalytic complex of HIV-1 reverse transcriptase: implications for drug resistance." *Science* 282(5394): 1669-75.

Hutchinson, C. M., A. M. Rompalo, et al. (1991). "Characteristics of patients with syphilis attending Baltimore STD clinics. Multiple high-risk subgroups and interactions with human immunodeficiency virus infection." *Arch Intern Med* 151(3): 511-6.

Imrie, A., A. Beveridge, et al. (1997). "Transmission of human immunodeficiency virus type 1 resistant to nevirapine and zidovudine. Sydney Primary HIV Infection Study Group." *J Infect Dis* 175(6): 1502-6.

Jackson, J. B., G. Becker-Pergola, et al. (2000). "Identification of the K103N resistance mutation in Ugandan women receiving nevirapine to prevent HIV-1 vertical transmission." *Aids* 14(11): F111-5.

Jackson, J. B., P. Musoke, et al. (2003). "Intrapartum and neonatal single-dose nevirapine compared with zidovudine for prevention of mother-to-child transmission of HIV-1 in Kampala, Uganda: 18-month follow-up of the HIVNET 012 randomised trial." *Lancet* 362(9387): 859-68.

Janssen, R. S., G. A. Satten, et al. (1998). "New testing strategy to detect early HIV-1 infection for use in incidence estimates and for clinical and prevention purposes." *Jama* 280(1): 42-8.

Janssens, W., A. Buve, et al. (1997). "The puzzle of HIV-1 subtypes in Africa." *AIDS* 11(6): 705-12.

John, G. C. and J. Kreiss (1996). "Mother-to-child transmission of human immunodeficiency virus type 1." *Epidemiol Rev* 18(2): 149-57.

John, G. C., R. W. Nduati, et al. (1997). "Genital shedding of human immunodeficiency virus type 1 DNA during pregnancy: association with immunosuppression, abnormal cervical or vaginal discharge, and severe vitamin A deficiency." *J Infect Dis* 175(1): 57-62.

Johnson, V. A., C. J. Petropoulos, et al. (2001). "Vertical transmission of multidrug-resistant human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and continued evolution of drug resistance in an HIV-1-infected infant." *J Infect Dis* 183(11): 1688-93.

Johnston, E., M. A. Winters, et al. (2004). "Association of a novel human immunodeficiency virus type 1 protease substrate cleft mutation, L23I, with protease inhibitor therapy and in vitro drug resistance." *Antimicrob Agents Chemother* 48(12): 4864-8.

Johnston, M. I. (1996). "HIV/AIDS Vaccine Development: Challenges, Progress and Future Directions." *Rev Med Virol* 6(3): 123-140.

Johnston, M. I. and D. F. Hoth (1993). "Present status and future prospects for HIV therapies." *Science* 260(5112): 1286-93.

Jordan, M. R., D. E. Bennett, et al. (2008). "World Health Organization surveys to monitor HIV drug resistance prevention and associated factors in sentinel antiretroviral treatment sites." *Antivir Ther* 13 Suppl 2: 15-23.

Jourdain, G., N. Ngo-Giang-Huong, et al. (2004). "Intrapartum exposure to nevirapine and subsequent maternal responses to nevirapine-based antiretroviral therapy." *N Engl J Med* 351(3): 229-40.

- Takehisa, F. M., U. Tupinambas, et al. (2007). "Persistence of genotypic resistance to nelfinavir among women exposed to prophylactic antiretroviral therapy during pregnancy." *AIDS Res Hum Retroviruses* 23(12): 1515-20.
- Kalichman, S. C., D. Rompa, et al. (2000). "Sexually transmitted infections among HIV seropositive men and women." *Sex Transm Infect* 76(5): 350-4.
- Kamkamidze, G., T. Sullivan, et al. (2001). "Occurrence of HIV-1 reverse transcriptase gene mutation at codon 215 in HIV-infected infants." *J Clin Virol* 22(1): 143-8.
- Kantor, R., D. A. Katzenstein, et al. (2005). "Impact of HIV-1 subtype and antiretroviral therapy on protease and reverse transcriptase genotype: results of a global collaboration." *PLoS Med* 2(4): e112.
- Kassaye, S., E. Lee, et al. (2007). "Drug resistance in plasma and breast milk after single-dose nevirapine in subtype C HIV type 1: population and clonal sequence analysis." *AIDS Res Hum Retroviruses* 23(8): 1055-61.
- Kavlick, M. F., K. Wyvill, et al. (1998). "Emergence of multi-dideoxynucleoside-resistant human immunodeficiency virus type 1 variants, viral sequence variation, and disease progression in patients receiving antiretroviral chemotherapy." *J Infect Dis* 177(6): 1506-13.
- Kemp, S. D., C. Shi, et al. (1998). "A novel polymorphism at codon 333 of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase can facilitate dual resistance to zidovudine and L-2',3'-dideoxy-3'-thiacytidine." *J Virol* 72(6): 5093-8.
- Kempf, D. J., M. S. King, et al. (2004). "Incidence of resistance in a double-blind study comparing lopinavir/ritonavir plus stavudine and lamivudine to nelfinavir plus stavudine and lamivudine." *J Infect Dis* 189(1): 51-60.
- Kiguba, R., J. Byakika-Tusiime, et al. (2007). "Discontinuation and modification of highly active antiretroviral therapy in HIV-infected Ugandans: prevalence and associated factors." *J Acquir Immune Defic Syndr* 45(2): 218-23.
- Kind, C., C. Rudin, et al. (1998). "Prevention of vertical HIV transmission: additive protective effect of elective Cesarean section and zidovudine prophylaxis. Swiss Neonatal HIV Study Group." *Aids* 12(2): 205-10.
- Kleim, J. P., M. Rosner, et al. (1996). "Selective pressure of a quinoxaline nonnucleoside inhibitor of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) reverse transcriptase (RT) on HIV-1 replication results in the emergence of nucleoside RT-inhibitor-specific (RT Leu-74-->Val or Ile and Val-75-->Leu or Ile) HIV-1 mutants." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(1): 34-8.
- Koch, N., N. Yahi, et al. (1999). "Comparison of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) protease mutations in HIV-1 genomes detected in plasma and in peripheral blood mononuclear cells from patients receiving combination drug therapy." *J Clin Microbiol* 37(5): 1595-7.
- Koch, N., N. Yahi, et al. (1999). "Genetic polymorphism near HIV-1 reverse transcriptase resistance-associated codons is a major obstacle for the line probe assay as an alternative method to sequence analysis." *J Virol Methods* 80(1): 25-31.
- Korber, B. T., E. E. Allen, et al. (1995). "Heterogeneity of HIV-1 and HIV-2." *AIDS* 9 Suppl A: S5-18.

- Korber, B. T., G. Learn, et al. (1995). "Protecting HIV databases." *Nature* 378(6554): 242-4.
- Koulinska, I. N., E. Villamor, et al. (2006). "Transmission of cell-free and cell-associated HIV-1 through breast-feeding." *J Acquir Immune Defic Syndr* 41(1): 93-9.
- Koulinska, I. N., E. Villamor, et al. (2006). "Risk of HIV-1 transmission by breastfeeding among mothers infected with recombinant and non-recombinant HIV-1 genotypes." *Virus Res* 120(1-2): 191-8.
- Koval, C. E., C. Dykes, et al. (2006). "Relative replication fitness of efavirenz-resistant mutants of HIV-1: correlation with frequency during clinical therapy and evidence of compensation for the reduced fitness of K103N + L100I by the nucleoside resistance mutation L74V." *Virology* 353(1): 184-92.
- Kozal, M. J., K. R. Amico, et al. (2004). "Antiretroviral resistance and high-risk transmission behavior among HIV-positive patients in clinical care." *AIDS* 18(16): 2185-9.
- Kuhn, L., R. Bobat, et al. (1996). "Cesarean deliveries and maternal-infant HIV transmission: results from a prospective study in South Africa." *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 11(5): 478-83.
- Kully, C., S. Yerly, et al. (1999). "Codon 215 mutations in human immunodeficiency virus-infected pregnant women. Swiss Collaborative 'HIV and Pregnancy' Study." *J Infect Dis* 179(3): 705-8.
- Kumarasamy, N. (2004). "Generic antiretroviral drugs--will they be the answer to HIV in the developing world?" *Lancet* 364(9428): 3-4.
- Lallemant, M., S. Le Coeur, et al. (1994a). "Mother-to-child transmission of HIV-1 in Congo, central Africa. Congolese Research Group on Mother-to-Child Transmission of HIV." *AIDS* 8(10): 1451-6.
- Lallemant, M., S. Le Coeur, et al. (1994b). "Antiretroviral prevention of HIV perinatal transmission." *Lancet* 343(8910): 1429-30.
- Lama, J. R., J. Sanchez, et al. (2006). "Linking HIV and antiretroviral drug resistance surveillance in Peru: a model for a third-generation HIV sentinel surveillance." *J Acquir Immune Defic Syndr* 42(4): 501-5.
- Landman, R., D. Descamps, et al. (2005). "Early virologic failure and rescue therapy of tenofovir, abacavir, and lamivudine for initial treatment of HIV-1 infection: TONUS study." *HIV Clin Trials* 6(6): 291-301.
- Langston, C., D. E. Lewis, et al. (1995). "Excess intrauterine fetal demise associated with maternal human immunodeficiency virus infection." *J Infect Dis* 172(6): 1451-60.
- Larder, B. A. (1995). "Viral resistance and the selection of antiretroviral combinations." *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 10 Suppl 1: S28-33.
- Lecossier, D., N. S. Shulman, et al. (2005). "Detection of minority populations of HIV-1 expressing the K103N resistance mutation in patients failing nevirapine." *J Acquir Immune Defic Syndr* 38(1): 37-42.
- Lee, B. (2003). "Pregnant and with HIV: facts and feelings." *RCM Midwives* 6(8): 348-51.

- Levin, J. (1987). "Estatística Aplicada a Ciências Humanas." Editora Harbra, 2a edição, São Paulo.
- Lewis, M. P., A. Colbert, et al. (2006). "A qualitative study of persons who are 100% adherent to antiretroviral therapy." *AIDS Care* 18(2): 140-8.
- Lin, P. F., C. J. Gonzalez, et al. (1999). "Stavudine resistance: an update on susceptibility following prolonged therapy." *Antivir Ther* 4(1): 21-8.
- Little, S. J. (2001). "Is transmitted drug resistance in HIV on the rise? It seems so." *Bmj* 322(7294): 1074-5.
- Little, S. J., Koelsch, K.K., Ignacio, C.C., Wong, J.K., et al (2004). "Persistence of transmitted drug resistance virus among subjects with primary HIV infection deferring antiretroviral therapy." Abstract book. 11th Conference on Retrovirus and Opportunistic Infections, San Francisco, CA. .
- Little, S. J., E. S. Daar, et al. (1999). "Reduced antiretroviral drug susceptibility among patients with primary HIV infection." *JAMA* 282(12): 1142-9.
- Little, S. J., S. Holte, et al. (2002). "Antiretroviral-drug resistance among patients recently infected with HIV." *N Engl J Med* 347(6): 385-94.
- Lockman, S. and J. A. McIntyre (2007). "Reduction of HIV-1 drug resistance after intrapartum single-dose nevirapine." *Lancet* 370(9600): 1668-70.
- Lockman, S., R. L. Shapiro, et al. (2007). "Response to antiretroviral therapy after a single, peripartum dose of nevirapine." *N Engl J Med* 356(2): 135-47.
- Loemba, H., B. Brenner, et al. (2002). "Co-receptor usage and HIV-1 intra-clade C polymorphisms in the protease and reverse transcriptase genes of HIV-1 isolates from Ethiopia and Botswana." *Antivir Ther* 7(2): 141-8.
- Loo, V. S., T. Diaz, et al. (2004). "Managing HIV-infected patients on antiretroviral therapy in Rio de Janeiro, Brazil: do providers follow national guidelines?" *AIDS Care* 16(7): 834-40.
- Louis, J. M., M. A. Buhari, et al. (2005). "Characteristics associated with suboptimal viral suppression at delivery in human immunodeficiency virus-1-infected pregnant women." *Am J Obstet Gynecol* 193(3 Pt 2): 1266-9.
- Lyons, F. E., S. Coughlan, et al. (2005). "Emergence of antiretroviral resistance in HIV-positive women receiving combination antiretroviral therapy in pregnancy." *Aids* 19(1): 63-7.
- Mackie, N. E., S. Fidler, et al. (2004). "Clinical implications of stopping nevirapine-based antiretroviral therapy: relative pharmacokinetics and avoidance of drug resistance." *HIV Med* 5(3): 180-4.
- Maggiolo, F., D. Ripamonti, et al. (2004). "Effect of prolonged discontinuation of successful antiretroviral therapy on CD4 T cells: a controlled, prospective trial." *AIDS* 18(3): 439-46.
- Mahalingam, B., J. M. Louis, et al. (2001). "Structural implications of drug-resistant mutants of HIV-1 protease: high-resolution crystal structures of the mutant protease/substrate analogue complexes." *Proteins* 43(4): 455-64.

Mandelbrot, L., A. Landreau-Mascaro, et al. (2001). "Lamivudine-zidovudine combination for prevention of maternal-infant transmission of HIV-1." *Jama* 285(16): 2083-93.

Mandelbrot, L., J. Le Chenadec, et al. (1998). "Perinatal HIV-1 transmission: interaction between zidovudine prophylaxis and mode of delivery in the French Perinatal Cohort." *Jama* 280(1): 55-60.

Mandelbrot, L., M. J. Mayaux, et al. (1996). "Obstetric factors and mother-to-child transmission of human immunodeficiency virus type 1: the French perinatal cohorts. SEROGEST French Pediatric HIV Infection Study Group." *Am J Obstet Gynecol* 175(3 Pt 1): 661-7.

Marcelin, A. G., C. Dalban, et al. (2004). "Clinically relevant interpretation of genotype and relationship to plasma drug concentrations for resistance to saquinavir-ritonavir in human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitor-experienced patients." *Antimicrob Agents Chemother* 48(12): 4687-92.

Margot, N. A., B. Lu, et al. (2006). "Resistance development over 144 weeks in treatment-naive patients receiving tenofovir disoproxil fumarate or stavudine with lamivudine and efavirenz in Study 903." *HIV Med* 7(7): 442-50.

Marins, J. R., L. F. Jamal, et al. (2003). "Dramatic improvement in survival among adult Brazilian AIDS patients." *Aids* 17(11): 1675-82.

Markowitz, M., H. Mohri, et al. (2005). "Infection with multidrug resistant, dual-tropic HIV-1 and rapid progression to AIDS: a case report." *Lancet* 365(9464): 1031-8.

Martinez, A. M., V. P. Hora, et al. (2006). "Determinants of HIV-1 mother-to-child transmission in Southern Brazil." *An Acad Bras Cienc* 78(1): 113-21.

Masquelier, B., K. Bhaskaran, et al. (2005). "Prevalence of transmitted HIV-1 drug resistance and the role of resistance algorithms: data from seroconverters in the CASCADE collaboration from 1987 to 2003." *J Acquir Immune Defic Syndr* 40(5): 505-11.

Masquelier, B., D. Breilh, et al. (2002). "Human immunodeficiency virus type 1 genotypic and pharmacokinetic determinants of the virological response to lopinavir-ritonavir-containing therapy in protease inhibitor-experienced patients." *Antimicrob Agents Chemother* 46(9): 2926-32.

Masquelier, B., D. Descamps, et al. (1999). "Zidovudine resensitization and dual HIV-1 resistance to zidovudine and lamivudine in the delta lamivudine roll-over study." *Antivir Ther* 4(2): 69-77.

Mayaux, M. J., S. Blanche, et al. (1995). "Maternal factors associated with perinatal HIV-1 transmission: the French Cohort Study: 7 years of follow-up observation. The French Pediatric HIV Infection Study Group." *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 8(2): 188-94.

Mayaux, M. J., E. Dussaix, et al. (1997). "Maternal virus load during pregnancy and mother-to-child transmission of human immunodeficiency virus type 1: the French perinatal cohort studies. SEROGEST Cohort Group." *J Infect Dis* 175(1): 172-5.

Mccullagh, P., Nelder, J.A. (1989). "Generalized Linear Models. 2<sup>a</sup> ed. Chapman and Hall, London."

- McFarland, W., M. P. Busch, et al. (1999). "Detection of early HIV infection and estimation of incidence using a sensitive/less-sensitive enzyme immunoassay testing strategy at anonymous counseling and testing sites in San Francisco." *J Acquir Immune Defic Syndr* 22(5): 484-9.
- McIntyre, J. (2005). "Preventing mother-to-child transmission of HIV: successes and challenges." *BJOG* 112(9): 1196-203.
- McIntyre, J. (2005). "Prevention of mother-to-child transmission of HIV: treatment options." *Expert Rev Anti Infect Ther* 3(6): 971-80.
- McIntyre, J. (2006). "Strategies to prevent mother-to-child transmission of HIV." *Curr Opin Infect Dis* 19(1): 33-8.
- Melbourne, K. M., S. M. Geletko, et al. (1999). "Medication adherence in patients with HIV infection: a comparison of two measurement methods." *AIDS Read* 9(5): 329-38.
- Mellors, J. (1998). "Salvage antiretroviral therapy." *Newsline People AIDS Coalit N Y*: 18-21.
- Miller, L. G., H. Liu, et al. (2003). "Knowledge of antiretroviral regimen dosing and adherence: a longitudinal study." *Clin Infect Dis* 36(4): 514-8.
- Miller, M. D. (2004). "K65R, TAMs and tenofovir." *AIDS Rev* 6(1): 22-33.
- Miller, V., M. Sturmer, et al. (1998). "The M184V mutation in HIV-1 reverse transcriptase (RT) conferring lamivudine resistance does not result in broad cross-resistance to nucleoside analogue RT inhibitors." *Aids* 12(7): 705-12.
- Minkoff, H. (2003). "Human immunodeficiency virus infection in pregnancy." *Obstet Gynecol* 101(4): 797-810.
- Minkoff, H., D. N. Burns, et al. (1995). "The relationship of the duration of ruptured membranes to vertical transmission of human immunodeficiency virus." *Am J Obstet Gynecol* 173(2): 585-9.
- Minkoff, H. L., D. Eisenberger-Matityahu, et al. (1999). "Prevalence and incidence of gynecologic disorders among women infected with human immunodeficiency virus." *Am J Obstet Gynecol* 180(4): 824-36.
- Miotti, P. G., G. A. Dallabetta, et al. (1992). "A retrospective study of childhood mortality and spontaneous abortion in HIV-1 infected women in urban Malawi." *Int J Epidemiol* 21(4): 792-9.
- Mitsuya, Y., M. A. Winters, et al. (2006). "N88D facilitates the co-occurrence of D30N and L90M and the development of multidrug resistance in HIV type 1 protease following nelfinavir treatment failure." *AIDS Res Hum Retroviruses* 22(12): 1300-5.
- Mofenson, L. M. (1997). "Interaction between timing of perinatal human immunodeficiency virus infection and the design of preventive and therapeutic interventions." *Acta Paediatr Suppl* 421: 1-9.
- Mofenson, L. M. (1997). "Mother-child HIV-1 transmission: Timing and determinants." *Obstet Gynecol Clin North Am* 24(4): 759-84.

Mofenson, L. M. (1997). "Reducing the risk of perinatal HIV-1 transmission with zidovudine: results and implications of AIDS Clinical Trials Group protocol 076." *Acta Paediatr Suppl* 421: 89-96.

Mofenson, L. M. (2002). "U.S. Public Health Service Task Force recommendations for use of antiretroviral drugs in pregnant HIV-1-infected women for maternal health and interventions to reduce perinatal HIV-1 transmission in the United States." *MMWR Recomm Rep* 51(RR-18): 1-38; quiz CE1-4.

Montes, B. and M. Segondy (2002). "Amino acid substitutions at position 69 of the reverse transcriptase of human immunodeficiency virus type 1 are frequent in zalcitabine-naïve antiretroviral-drug-experienced patients." *Antimicrob Agents Chemother* 46(9): 3110-1.

Morgado, M. G., M. L. Guimaraes, et al. (1998). "Molecular epidemiology of HIV-1 in Brazil: high prevalence of HIV-1 subtype B and identification of an HIV-1 subtype D infection in the city of Rio de Janeiro, Brazil. Evandro Chagas Hospital AIDS Clinical Research Group." *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 18(5): 488-94.

Morgado, M. G., M. L. Guimaraes, et al. (1998). "Molecular epidemiology of HIV in Brazil: polymorphism of the antigenically distinct HIV-1 B subtype strains. The Hospital Evandro Chagas AIDS Clinical Research Group." *Mem Inst Oswaldo Cruz* 93(3): 383-6.

Morgado, M. G., E. C. Sabino, et al. (1994). "V3 region polymorphisms in HIV-1 from Brazil: prevalence of subtype B strains divergent from North American/European prototype and detection of subtype F." *AIDS Res Hum Retroviruses* 10(5): 569-76.

Mostad, S. B. and J. K. Kreiss (1996). "Shedding of HIV-1 in the genital tract." *AIDS* 10(12): 1305-15.

MS (2006). "Recomendações para Profilaxia da Transmissão Vertical do HIV e Terapia Anti-Retroviral em Gestantes; Ministério da Saúde; Secretaria de Vigilância em Saúde - Programa Nacional de DST e AIDS."

MS (2007). *Boletim Epidemiológico - Aids e DST Ano IV - nº 1 - 27ª - 52ª - semanas epidemiológicas - julho a dezembro de 2006; Ano IV - nº 1 - 01ª - 26ª - semanas epidemiológicas - janeiro a junho de 2007.*

MS (2008). "Recomendações para terapia anti-retroviral em adultos infectados pelo HIV 2007/2008; Comitê Assessor em Terapia Anti-Retroviral para Adultos infectados pelo HIV. Ministério da Saúde, Brasil."

Naeger, L. K. and K. A. Struble (2007). "Food and Drug Administration analysis of tipranavir clinical resistance in HIV-1-infected treatment-experienced patients." *Aids* 21(2): 179-85.

Nduati, R. and G. John (1995). "Breast milk transmission of HIV-1." *NARESA Mongr*(18): 1-3.

Nduati, R. W., G. C. John, et al. (1995). "Human immunodeficiency virus type 1-infected cells in breast milk: association with immunosuppression and vitamin A deficiency." *J Infect Dis* 172(6): 1461-8.

Nellen, J. F., I. Schillevoort, et al. (2004). "Nelfinavir plasma concentrations are low during pregnancy." *Clin Infect Dis* 39(5): 736-40.

Newell, M. L., G. Gray, et al. (1997). "Prevention of mother-to-child transmission of HIV-1 infection." *Aids* 11 Suppl A: S165-72.

Nijhuis, M., R. Schuurman, et al. (1997). "Lamivudine-resistant human immunodeficiency virus type 1 variants (184V) require multiple amino acid changes to become co-resistant to zidovudine in vivo." *J Infect Dis* 176(2): 398-405.

Nikolenko, G. N., K. A. Delviks-Frankenberry, et al. (2007). "Mutations in the connection domain of HIV-1 reverse transcriptase increase 3'-azido-3'-deoxythymidine resistance." *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(1): 317-22.

Ntemgwa, M., M. A. Wainberg, et al. (2007). "Variations in reverse transcriptase and RNase H domain mutations in human immunodeficiency virus type 1 clinical isolates are associated with divergent phenotypic resistance to zidovudine." *Antimicrob Agents Chemother* 51(11): 3861-9.

Odaibo, G. N., D. O. Olaleye, et al. (2006). "Mother-to-child transmission of different HIV-1 subtypes among ARV Naive infected pregnant women in Nigeria." *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 48(2): 77-80.

Ogilvie, G. S., A. Palepu, et al. (2007). "Fertility intentions of women of reproductive age living with HIV in British Columbia, Canada." *Aids* 21 Suppl 1: S83-8.

Orloff, S. L., M. Bulterys, et al. (2001). "Maternal characteristics associated with antenatal, intrapartum, and neonatal zidovudine use in four US cities, 1994-1998." *J Acquir Immune Defic Syndr* 28(1): 65-72.

Orloff, S. L., R. J. Simonds, et al. (1996). "Determinants of perinatal HIV-1 transmission." *Clin Obstet Gynecol* 39(2): 386-95.

O'Shea, S., M. L. Newell, et al. (1998). "Maternal viral load, CD4 cell count and vertical transmission of HIV-1." *J Med Virol* 54(2): 113-7.

Osmanov, S., C. Pattou, et al. (2002). "Estimated global distribution and regional spread of HIV-1 genetic subtypes in the year 2000." *J Acquir Immune Defic Syndr* 29(2): 184-90.

Osterberg, L. and T. Blaschke (2005). "Adherence to medication." *N Engl J Med* 353(5): 487-97.

Overton, E. T., S. Sungkanuparph, et al. (2005). "Antiretroviral resistance among HIV-positive pregnant women who have antiretroviral experience from previous pregnancy." *AIDS* 19(13): 1439.

Palacios, R., Sucupira, M.C.A., et al (2007). "HIV-1 resistance associated mutations was not selected in women subjected to a prophylaxis for mother-to-child transmission with short-term antiretroviral therapy (START)." Abstract book 4th IAS Conference on HIV Pathogenesis, Treatment and Prevention.

Palacios, R., J. Santos, et al. (2007). "Incidence and prevalence of the metabolic syndrome in a cohort of naive HIV-infected patients: prospective analysis at 48 weeks of highly active antiretroviral therapy." *Int J STD AIDS* 18(3): 184-7.

Palella, F. J., Jr., K. M. Delaney, et al. (1998). "Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigators." *N Engl J Med* 338(13): 853-60.

- Palma, A. C., F. Araujo, et al. (2007). "Molecular epidemiology and prevalence of drug resistance-associated mutations in newly diagnosed HIV-1 patients in Portugal." *Infect Genet Evol* 7(3): 391-8.
- Palumbo, P., B. Holland, et al. (2001). "Antiretroviral resistance mutations among pregnant human immunodeficiency virus type 1-infected women and their newborns in the United States: vertical transmission and clades." *J Infect Dis* 184(9): 1120-6.
- Paraskevis, D., E. Magiorkinis, et al. (2005). "Prevalence of resistance-associated mutations in newly diagnosed HIV-1 patients in Greece." *Virus Res* 112(1-2): 115-22.
- Paredes, R., Cheng, I., Kuritzkes, D.R., et al. (2008). "Frequent emergence of lamivudine and NNRTI drug-resistance during pregnancy-limited antiretroviral therapy in the US. Results from the women and infants transmission study." *Retroconferency* [Abstract].
- Parekh, B. S., D. J. Hu, et al. (2001). "Evaluation of a sensitive/less-sensitive testing algorithm using the 3A11-LS assay for detecting recent HIV seroconversion among individuals with HIV-1 subtype B or E infection in Thailand." *AIDS Res Hum Retroviruses* 17(5): 453-8.
- Parekh, B. S., M. S. Kennedy, et al. (2002). "Quantitative detection of increasing HIV type 1 antibodies after seroconversion: a simple assay for detecting recent HIV infection and estimating incidence." *AIDS Res Hum Retroviruses* 18(4): 295-307.
- Parekh, B. S. and J. S. McDougal (2005). "Application of laboratory methods for estimation of HIV-1 incidence." *Indian J Med Res* 121(4): 510-8.
- Parietti, J. J., V. Massari, et al. (2004). "Predictors of virologic failure and resistance in HIV-infected patients treated with nevirapine- or efavirenz-based antiretroviral therapy." *Clin Infect Dis* 38(9): 1311-6.
- Parker, M. M., N. Wade, et al. (2003). "Prevalence of genotypic drug resistance among a cohort of HIV-infected newborns." *J Acquir Immune Defic Syndr* 32(3): 292-7.
- Parkin, N. T., S. Gupta, et al. (2006). "The K101P and K103R/V179D mutations in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase confer resistance to nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors." *Antimicrob Agents Chemother* 50(1): 351-4.
- Park-Wyllie, L. Y., A. Scalera, et al. (2002). "High rate of discontinuations of highly active antiretroviral therapy as a result of antiretroviral intolerance in clinical practice: missed opportunities for adherence support?" *AIDS* 16(7): 1084-6.
- Paterson, D. L., S. Swindells, et al. (2000). "Adherence to protease inhibitor therapy and outcomes in patients with HIV infection." *Ann Intern Med* 133(1): 21-30.
- Patick, A. K., M. Duran, et al. (1998). "Genotypic and phenotypic characterization of human immunodeficiency virus type 1 variants isolated from patients treated with the protease inhibitor nelfinavir." *Antimicrob Agents Chemother* 42(10): 2637-44.
- Patick, A. K., H. Mo, et al. (1996). "Antiviral and resistance studies of AG1343, an orally bioavailable inhibitor of human immunodeficiency virus protease." *Antimicrob Agents Chemother* 40(2): 292-7.
- Patterson, K. B., P. A. Leone, et al. (2007). "Frequent detection of acute HIV infection in pregnant women." *Aids* 21(17): 2303-8.

- Pelemans, H., R. M. Esnouf, et al. (1998). "Mutational analysis of Tyr-318 within the non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor binding pocket of human immunodeficiency virus type I reverse transcriptase." *J Biol Chem* 273(51): 34234-9.
- Perez, H., M. Vignoles, et al. (2008). "Low rate of emergence of nevirapine and lamivudine resistance after post-partum interruption of a triple-drug regimen." *Antivir Ther* 13(1): 135-9.
- Perez, L., M. M. Thomson, et al. (2006). "HIV Type 1 molecular epidemiology in cuba: high genetic diversity, frequent mosaicism, and recent expansion of BG intersubtype recombinant forms." *AIDS Res Hum Retroviruses* 22(8): 724-33.
- Perno, C. F., A. Cozzi-Lepri, et al. (2001). "Impact of mutations conferring reduced susceptibility to lamivudine on the response to antiretroviral therapy." *Antivir Ther* 6(3): 195-8.
- Pieniazek, D., D. Ellenberger, et al. (1999). "Predominance of human immunodeficiency virus type 2 subtype B in Abidjan, Ivory Coast." *AIDS Res Hum Retroviruses* 15(6): 603-8.
- Pieniazek, D., M. Rayfield, et al. (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. HIV Variant Working Group." *Aids* 14(11): 1489-95.
- Pillay, D., K. Bhaskaran, et al. (2006). "The impact of transmitted drug resistance on the natural history of HIV infection and response to first-line therapy." *Aids* 20(1): 21-8.
- Pitt, J., D. Brambilla, et al. (1997). "Maternal immunologic and virologic risk factors for infant human immunodeficiency virus type 1 infection: findings from the Women and Infants Transmission Study." *J Infect Dis* 175(3): 567-75.
- Pitt, J. and D. Cotton (1997). "Treating the HIV-infected pregnant woman and her child." *AIDS Clin Care* 9(12): 91-3, 95.
- Plummer, F. A., J. N. Simonsen, et al. (1991). "Cofactors in male-female sexual transmission of human immunodeficiency virus type 1." *J Infect Dis* 163(2): 233-9.
- PNAD (2007). "Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios - Síntese de Indicadores 2006; Ipea, Brasília / Rio de Janeiro, setembro de 2007."
- Potts, K. E., M. L. Kalish, et al. (1993). "Genetic heterogeneity of the V3 region of the HIV-1 envelope glycoprotein in Brazil. Brazilian Collaborative AIDS Research Group." *AIDS* 7(9): 1191-7.
- Powderly, W. G., M. S. Saag, et al. (1999). "Predictors of optimal virological response to potent antiretroviral therapy." *AIDS* 13(14): 1873-80.
- Quigg, M., S. Rebus, et al. (1997). "Mutations associated with zidovudine resistance in HIV-1 among recent seroconvertors." *AIDS* 11(6): 835-6.
- Rawal, B. D., A. Degula, et al. (2003). "Development of a new less-sensitive enzyme immunoassay for detection of early HIV-1 infection." *J Acquir Immune Defic Syndr* 33(3): 349-55.

- Read, J. S., C. E. Frasch, et al. (1998). "The immunogenicity of Haemophilus influenzae type b conjugate vaccines in children born to human immunodeficiency virus-infected women. Women and Infants Transmission Study Group." *Pediatr Infect Dis J* 17(5): 391-7.
- Reiche, E. M., H. K. Morimoto, et al. (2000). "[Prevalence of American trypanosomiasis, syphilis, toxoplasmosis, rubella, hepatitis B, hepatitis C, human immunodeficiency virus infection, assayed through serological tests among pregnant patients, from 1996 to 1998, at the Regional University Hospital Norte do Parana]." *Rev Soc Bras Med Trop* 33(6): 519-27.
- Renjifo, B., M. Chung, et al. (2003). "In-utero transmission of quasispecies among human immunodeficiency virus type 1 genotypes." *Virology* 307(2): 278-82.
- Rhee, S. Y., W. J. Fessel, et al. (2005). "HIV-1 Protease and reverse-transcriptase mutations: correlations with antiretroviral therapy in subtype B isolates and implications for drug-resistance surveillance." *J Infect Dis* 192(3): 456-65.
- Rhee, S. Y., M. J. Gonzales, et al. (2003). "Human immunodeficiency virus reverse transcriptase and protease sequence database." *Nucleic Acids Res* 31(1): 298-303.
- Rhee, S. Y., J. Taylor, et al. (2006). "Genotypic predictors of human immunodeficiency virus type 1 drug resistance." *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(46): 17355-60.
- Richman, D. D. (2004). "Benefits and limitations of testing for resistance to HIV drugs." *J Antimicrob Chemother* 53(4): 555-7.
- Richman, D. D., J. M. Grimes, et al. (1990). "Effect of stage of disease and drug dose on zidovudine susceptibilities of isolates of human immunodeficiency virus." *J Acquir Immune Defic Syndr* 3(8): 743-6.
- Robertson, D. L., B. H. Hahn, et al. (1995). "Recombination in AIDS viruses." *J Mol Evol* 40(3): 249-59.
- Robertson, D. L., P. M. Sharp, et al. (1995). "Recombination in HIV-1." *Nature* 374(6518): 124-6.
- Romano, L., G. Venturi, et al. (2002). "Development and significance of resistance to protease inhibitors in HIV-1-infected adults under triple-drug therapy in clinical practice." *J Med Virol* 66(2): 143-50.
- Romano, L., G. Venturi, et al. (2002). "Detection of a drug-resistant human immunodeficiency virus variant in a newly infected heterosexual couple." *Clin Infect Dis* 34(1): 116-7.
- Roquebert, B., M. Wirden, et al. (2007). "Relationship between mutations in HIV-1 RNase H domain and nucleoside reverse transcriptase inhibitors resistance mutations in naive and pre-treated HIV infected patients." *J Med Virol* 79(3): 207-11.
- Ross, L., N. Parkin, et al. (2004). "Phenotypic impact of HIV reverse transcriptase M184I/V mutations in combination with single thymidine analog mutations on nucleoside reverse transcriptase inhibitor resistance." *AIDS* 18(12): 1691-6.
- Ross, L. L., N. Parkin, et al. (2006). "Differential impact of thymidine analogue mutations on emtricitabine and lamivudine susceptibility." *J Acquir Immune Defic Syndr* 43(5): 567-70.

- Rubio, A., M. Leal, et al. (1997). "Increase in the frequency of mutation at codon 215 associated with zidovudine resistance in HIV-1-infected antiviral-naive patients from 1989 to 1996." *AIDS* 11(9): 1184-6.
- Rutherford, G. W., S. K. Schwarcz, et al. (2000). "Surveillance for incident HIV infection: new technology and new opportunities." *J Acquir Immune Defic Syndr* 25 Suppl 2: S115-9.
- Saada, M., J. Le Chenadec, et al. (2000). "Pregnancy and progression to AIDS: results of the French prospective cohorts. SEROGEST and SEROCO Study Groups." *Aids* 14(15): 2355-60.
- Saag, M. S., B. H. Hahn, et al. (1988). "Extensive variation of human immunodeficiency virus type-1 in vivo." *Nature* 334(6181): 440-4.
- Sabin, C. A. and A. N. Phillips (1994). "The effect of pregnancy on HIV disease progression." *J Acquir Immune Defic Syndr* 7(3): 317.
- Sabino, E. C., E. G. Shpaer, et al. (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* 68(10): 6340-6.
- Sa-Ferreira, J. A., P. A. Brindeiro, et al. (2007). "Human immunodeficiency virus-1 subtypes and antiretroviral drug resistance profiles among drug-naive Brazilian blood donors." *Transfusion* 47(1): 97-102.
- Saitou, N. and M. Nei (1987). "The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees." *Mol Biol Evol* 4(4): 406-25.
- Sax, P. E., R. Islam, et al. (2005). "Should resistance testing be performed for treatment-naive HIV-infected patients? A cost-effectiveness analysis." *Clin Infect Dis* 41(9): 1316-23.
- Schurmann, D., R. Elston, et al. (2006). "Evolution of resistance during first-line treatment with boosted fosamprenavir is associated with baseline mutations." *Aids* 20(1): 138-40.
- Seoighe, C., F. Ketwaroo, et al. (2007). "A model of directional selection applied to the evolution of drug resistance in HIV-1." *Mol Biol Evol* 24(4): 1025-31.
- Sethi, A. K., D. D. Celentano, et al. (2003). "Association between adherence to antiretroviral therapy and human immunodeficiency virus drug resistance." *Clin Infect Dis* 37(8): 1112-8.
- Shafer, R. W. (2002). "Genotypic testing for human immunodeficiency virus type 1 drug resistance." *Clin Microbiol Rev* 15(2): 247-77.
- Shafer, R. W. and T. C. Merigan (1995). "HIV virology for clinical trials." *Aids* 9 Suppl A: S193-202.
- Shafer, R. W., S. Y. Rhee, et al. (2007). "HIV-1 protease and reverse transcriptase mutations for drug resistance surveillance." *Aids* 21(2): 215-23.
- Shafer, R. W., L. M. Smeaton, et al. (2003). "Comparison of four-drug regimens and pairs of sequential three-drug regimens as initial therapy for HIV-1 infection." *N Engl J Med* 349(24): 2304-15.
- Shaffer, N., M. Bulterys, et al. (1999). "Short courses of zidovudine and perinatal transmission of HIV." *N Engl J Med* 340(13): 1042-3.

- Shaffer, N., R. Chuachoowong, et al. (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(9155): 773-80.
- Shaffer, N., A. Roongpisuthipong, et al. (1999). "Maternal virus load and perinatal human immunodeficiency virus type 1 subtype E transmission, Thailand. Bangkok Collaborative Perinatal HIV Transmission Study Group." *J Infect Dis* 179(3): 590-9.
- Shearer, W. T., T. C. Quinn, et al. (1997). "Viral load and disease progression in infants infected with human immunodeficiency virus type 1. Women and Infants Transmission Study Group." *N Engl J Med* 336(19): 1337-42.
- Shet, A., L. Berry, et al. (2006). "Tracking the prevalence of transmitted antiretroviral drug-resistant HIV-1: a decade of experience." *J Acquir Immune Defic Syndr* 41(4): 439-46.
- Shulman, N. S., M. D. Hughes, et al. (2002). "Subtle decreases in stavudine phenotypic susceptibility predict poor virologic response to stavudine monotherapy in zidovudine-experienced patients." *J Acquir Immune Defic Syndr* 31(2): 121-7.
- Silveira, S. A., J. F. Figueiredo, et al. (1999). "[Malnutrition and hypovitaminosis A in AIDS patients]." *Rev Soc Bras Med Trop* 32(2): 119-24.
- Soares, E. A., R. P. Santos, et al. (2003). "Epidemiologic and molecular characterization of human immunodeficiency virus type 1 in southern Brazil." *J Acquir Immune Defic Syndr* 34(5): 520-6.
- Soares, M. A., R. M. Brindeiro, et al. (2004). "Primary HIV-1 drug resistance in Brazil." *Aids* 18 Suppl 3: S9-13.
- Soares, M. A., T. De Oliveira, et al. (2003). "A specific subtype C of human immunodeficiency virus type 1 circulates in Brazil." *Aids* 17(1): 11-21.
- Sperling, R. S., D. E. Shapiro, et al. (1996). "Maternal viral load, zidovudine treatment, and the risk of transmission of human immunodeficiency virus type 1 from mother to infant. Pediatric AIDS Clinical Trials Group Protocol 076 Study Group." *N Engl J Med* 335(22): 1621-9.
- Stanwood, N. L., S. E. Cohn, et al. (2007). "Contraception and fertility plans in a cohort of HIV-positive women in care." *Contraception* 75(4): 294-8.
- Steain, M. C., B. Wang, et al. (2006). "Analysis of HIV-1 sequences vertically transmitted to infants in Kisumu, Kenya." *J Clin Virol* 36(4): 298-302.
- Stefani, M. M., G. A. Pereira, et al. (2000). "Evidence of HIV-1 genetic diversity among pregnant women with AIDS or infected with HIV-1 in Central Brazil." *J Acquir Immune Defic Syndr* 23(2): 205-7.
- Steinbrook, R. (1997). "Battling HIV on many fronts." *N Engl J Med* 337(11): 779-81.
- Stiehm, E. R., L. Mofenson, et al. (1995). "Summary of the workshop on passive immunotherapy in the prevention and treatment of HIV infection. The Passive Antibody Workshop Participants." *Clin Immunol Immunopathol* 75(1): 84-93.
- Study, E. C. (2005). "Mother-to-child transmission of HIV infection in the era of highly active antiretroviral therapy." *Clin Infect Dis* 40(3): 458-65.

Sucupira MC, Caseiro MM, Alves K, Tescarollo G, Janini LM, Sabino EC, et al. High levels of primary antiretroviral resistance genotypic mutations and B/F recombinants in Santos, Brazil. *AIDS Patient Care STDS* 2007,21:116-128.

Sun, X., N. Wang, et al. (2007). "The development of HIV/AIDS surveillance in China." *AIDS* 21 Suppl 8: S33-8.

Susman, E. (2002). "Many HIV patients carry mutated drug-resistant strains." *Lancet* 359(9300): 49.

Tamura, K., J. Dudley, et al. (2007). "MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0." *Mol Biol Evol* 24(8): 1596-9.

Tanuri, A., P. Swanson, et al. (1999). "HIV-1 subtypes among blood donors from Rio de Janeiro, Brazil." *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 20(1): 60-6.

Teixeira, S. L., F. I. Bastos, et al. (2004). "HIV-1 infection among injection and ex-injection drug users from Rio de Janeiro, Brazil: prevalence, estimated incidence and genetic diversity." *J Clin Virol* 31(3): 221-6.

Temmerman, M., E. N. Chomba, et al. (1994). "Maternal human immunodeficiency virus-1 infection and pregnancy outcome." *Obstet Gynecol* 83(4): 495-501.

Tess, B. H., L. C. Rodrigues, et al. (1998). "Breastfeeding, genetic, obstetric and other risk factors associated with mother-to-child transmission of HIV-1 in Sao Paulo State, Brazil. Sao Paulo Collaborative Study for Vertical Transmission of HIV-1." *Aids* 12(5): 513-20.

Thea, D. M., R. W. Steketee, et al. (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): 437-44.

Theus, S. A., D. A. Harrich, et al. (1998). "Treponema pallidum, lipoproteins, and synthetic lipoprotein analogues induce human immunodeficiency virus type 1 gene expression in monocytes via NF-kappaB activation." *J Infect Dis* 177(4): 941-50.

Tovo, P. A., M. de Martino, et al. (1996). "Mode of delivery and gestational age influence perinatal HIV-1 transmission. Italian Register for HIV Infection in Children." *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 11(1): 88-94.

Tozzi, V., M. Zaccarelli, et al. (2004). "Mutations in HIV-1 reverse transcriptase potentially associated with hypersusceptibility to nonnucleoside reverse-transcriptase inhibitors: effect on response to efavirenz-based therapy in an urban observational cohort." *J Infect Dis* 189(9): 1688-95.

Truong, H. M., R. M. Grant, et al. (2006). "Routine surveillance for the detection of acute and recent HIV infections and transmission of antiretroviral resistance." *AIDS* 20(17): 2193-7.

Truong, T. X. L., Thanh, T. C., Tram, L.T., Ton, T., et al (2007). "Drug resistance in HIV-1 infected pregnant women enrolled in the national PMTCT program in Ho Chi Minh City (HCMC), Vietnam." Programme Supplement; 4th IAS Conference on HIV Pathogenesis, Treatment and Prevention.

Tungsiripat, M., H. Drechsler, et al. (2007). "Discontinuation of antiretroviral therapy postpartum: no evidence for altered viral set point." *J Acquir Immune Defic Syndr* 44(1): 116-7.

Tuomala, R. E., L. A. Kalish, et al. (1997). "Changes in total, CD4+, and CD8+ lymphocytes during pregnancy and 1 year postpartum in human immunodeficiency virus-infected women. The Women and Infants Transmission Study." *Obstet Gynecol* 89(6): 967-74.

UNAIDS (2005). "Statement on the use of the BED-assay for the estimation of HIV-1 incidence for surveillance or epidemic monitoring. Report of a meeting of the UNAIDS Reference Group for Estimates, Modeling and Projections. Athens, Greece, December 13-15th 2005. Geneva: ." Statement following a meeting of the UNAIDS Reference Group for Estimates, Modelling and Projections held in Athens, Greece, December 13th 2005. Uploaded December 2005. .

UNAIDS (2007). "UNAIDS/WHO report highlights epidemic resurgence." *AIDS Alert* 22(1): suppl 1-3.

Van Laethem, K., C. Pannecouque, et al. (2007). "Mutations at 65 and 70 within the context of a Q151M cluster in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase impact the susceptibility to the different nucleoside reverse transcriptase inhibitors in distinct ways." *Infect Genet Evol* 7(5): 600-3.

Van Laethem, K., K. Van Vaerenbergh, et al. (1999). "Phenotypic assays and sequencing are less sensitive than point mutation assays for detection of resistance in mixed HIV-1 genotypic populations." *J Acquir Immune Defic Syndr* 22(2): 107-18.

Van Laethem, K. and A. M. Vandamme (2006). "Interpreting resistance data for HIV-1 therapy management--know the limitations." *AIDS Rev* 8(1): 37-43.

Van Leeuwen, E., J. M. Prins, et al. (2007). "Reproduction and fertility in human immunodeficiency virus type-1 infection." *Hum Reprod Update* 13(2): 197-206.

Vandamme, A. M., A. Sonnerborg, et al. (2004). "Updated European recommendations for the clinical use of HIV drug resistance testing." *Antivir Ther* 9(6): 829-48.

Vaz, M. J., S. M. Barros, et al. (2007). "HIV-infected pregnant women have greater adherence with antiretroviral drugs than non-pregnant women." *Int J STD AIDS* 18(1): 28-32.

Velarde-Dunois, K. G., M. L. Guimaraes, et al. (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): 1921-6.

Vella, S. and L. Palmisano (2005). "The global status of resistance to antiretroviral drugs." *Clin Infect Dis* 41 Suppl 4: S239-46.

Veloso, V. G. (1999). "Boletim Epidemiologico. Ano III." Coordenação Nacional de DST e AIDS. Secretaria de Políticas em Saúde; Ministério da Saúde, Brasil. 04.

Vercauteren, J., I. Derdelinckx, et al. (2008). "Prevalence and epidemiology of HIV type 1 drug resistance among newly diagnosed therapy-naive patients in Belgium from 2003 to 2006." *AIDS Res Hum Retroviruses* 24(3): 355-62.

Vercauteren, J. and A. M. Vandamme (2006). "Algorithms for the interpretation of HIV-1 genotypic drug resistance information." *Antiviral Res* 71(2-3): 335-42.

- Vermeiren, H., E. Van Craenenbroeck, et al. (2007). "Prediction of HIV-1 drug susceptibility phenotype from the viral genotype using linear regression modeling." *J Virol Methods* 145(1): 47-55.
- Vernazza, P. L., L. Troiani, et al. (2000). "Potent antiretroviral treatment of HIV-infection results in suppression of the seminal shedding of HIV. The Swiss HIV Cohort Study." *Aids* 14(2): 117-21.
- Vicente, A. C., K. Otsuki, et al. (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.
- Villani, P., M. Florida, et al. (2006). "Pharmacokinetics of nelfinavir in HIV-1-infected pregnant and nonpregnant women." *Br J Clin Pharmacol* 62(3): 309-15.
- Vingerhoets, J., H. Azijn, et al. (2005). "TMC125 displays a high genetic barrier to the development of resistance: evidence from in vitro selection experiments." *J Virol* 79(20): 12773-82.
- Violin, M., R. Velleca, et al. (2004). "Prevalence of HIV-1 primary drug resistance in seroconverters of the ICoNA cohort over the period 1996-2001." *J Acquir Immune Defic Syndr* 36(2): 761-4.
- Vora, S., A. G. Marcelin, et al. (2006). "Clinical validation of atazanavir/ritonavir genotypic resistance score in protease inhibitor-experienced patients." *Aids* 20(1): 35-40.
- Vray, M., J. L. Meynard, et al. (2003). "Predictors of the virological response to a change in the antiretroviral treatment regimen in HIV-1-infected patients enrolled in a randomized trial comparing genotyping, phenotyping and standard of care (Narval trial, ANRS 088)." *Antivir Ther* 8(5): 427-34.
- Wade, N. A., G. S. Birkhead, et al. (1998). "Abbreviated regimens of zidovudine prophylaxis and perinatal transmission of the human immunodeficiency virus." *N Engl J Med* 339(20): 1409-14.
- Wallis, L. (2007). "HIV disaster." *Nurs Stand* 21(51): 20-1.
- Walmsley, S. L., M. I. Becker, et al. (2001). "Predictors of virological response in HIV-infected patients to salvage antiretroviral therapy that includes nelfinavir." *Antivir Ther* 6(1): 47-54.
- Walsh, J. C. and L. Sherr (2002). "An assessment of current HIV treatment adherence services in the UK." *AIDS Care* 14(3): 329-34.
- Watts, D. H., J. Lambert, et al. (2003). "Progression of HIV disease among women following delivery." *J Acquir Immune Defic Syndr* 33(5): 585-93.
- Webber, M. P., E. E. Schoenbaum, et al. (1999). "A prospective study of HIV disease progression in female and male drug users." *Aids* 13(2): 257-62.
- Weidle, P. J., R. Downing, et al. (2003). "Development of phenotypic and genotypic resistance to antiretroviral therapy in the UNAIDS HIV Drug Access Initiative--Uganda." *Aids* 17 Suppl 3: S39-48.

- Weinstock, H., M. Dale, et al. (2002). "HIV seroincidence among patients at clinics for sexually transmitted diseases in nine cities in the United States." *J Acquir Immune Defic Syndr* 29(5): 478-83.
- Weinstock, H., M. Dale, et al. (2002). "Unrecognized HIV infection among patients attending sexually transmitted disease clinics." *Am J Public Health* 92(2): 280-3.
- Weisser, M., C. Rudin, et al. (1998). "Does pregnancy influence the course of HIV infection? Evidence from two large Swiss cohort studies." *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 17(5): 404-10.
- Welles, S. L., J. Pitt, et al. (2000). "HIV-1 genotypic zidovudine drug resistance and the risk of maternal--infant transmission in the women and infants transmission study. The Women and Infants Transmission Study Group." *Aids* 14(3): 263-71.
- Wensing, A. M. and C. A. Boucher (2003). "Worldwide transmission of drug-resistant HIV." *AIDS Rev* 5(3): 140-55.
- Wensing, A. M., D. A. van de Vijver, et al. (2005). "Prevalence of drug-resistant HIV-1 variants in untreated individuals in Europe: implications for clinical management." *J Infect Dis* 192(6): 958-66.
- Wiktor, S. Z., E. Ekpini, et al. (1999). "Short-course oral zidovudine for prevention of mother-to-child transmission of HIV-1 in Abidjan, Cote d'Ivoire: a randomised trial." *Lancet* 353(9155): 781-5.
- Winters, B., J. Montaner, et al. (2008). "Determination of clinically relevant cutoffs for HIV-1 phenotypic resistance estimates through a combined analysis of clinical trial and cohort data." *J Acquir Immune Defic Syndr* 48(1): 26-34.
- Witvrouw, M., C. Pannecouque, et al. (2004). "Susceptibility of HIV-2, SIV and SHIV to various anti-HIV-1 compounds: implications for treatment and postexposure prophylaxis." *Antivir Ther* 9(1): 57-65.
- Wolinsky, S. M., C. M. Wike, et al. (1992). "Selective transmission of human immunodeficiency virus type-1 variants from mothers to infants." *Science* 255(5048): 1134-7.
- Wright, J. G. and A. McGeer (1993). "Human immunodeficiency virus transmission between surgeons and patients in orthopaedic surgery." *Clin Orthop Relat Res*(297): 272-81.
- Yahi, N., C. Tamalet, et al. (1999). "Mutation patterns of the reverse transcriptase and protease genes in human immunodeficiency virus type 1-infected patients undergoing combination therapy: survey of 787 sequences." *J Clin Microbiol* 37(12): 4099-106.
- Yamaguchi, J., P. Bodelle, et al. (2003). "Near full-length genomes of 15 HIV type 1 group O isolates." *AIDS Res Hum Retroviruses* 19(11): 979-88.
- Yang, C., M. Li, et al. (2003). "Genetic diversity of HIV-1 in western Kenya: subtype-specific differences in mother-to-child transmission." *AIDS* 17(11): 1667-74.
- Yap, S. H., C. W. Sheen, et al. (2007). "N348I in the connection domain of HIV-1 reverse transcriptase confers zidovudine and nevirapine resistance." *PLoS Med* 4(12): e335.
- Yeni, P., D. A. Cooper, et al. (2006). "Virological and immunological outcomes at 3 years after starting antiretroviral therapy with regimens containing non-nucleoside reverse

transcriptase inhibitor, protease inhibitor, or both in INITIO: open-label randomised trial." *Lancet* 368(9532): 287-98.

Yerly, S., M. Rickenbach, et al. (2001). "Drug resistance mutations in HIV-1-infected subjects during protease inhibitor-containing highly active antiretroviral therapy with nelfinavir or indinavir." *Antivir Ther* 6(3): 185-9.

Young, C. L., D. J. Hu, et al. (2003). "Evaluation of a sensitive/less sensitive testing algorithm using the bioMerieux Vironostika-LS assay for detecting recent HIV-1 subtype B' or E infection in Thailand." *AIDS Res Hum Retroviruses* 19(6): 481-6.

Zaccarelli, M., V. Tozzi, et al. (2007). "The V118I mutation as a marker of advanced HIV infection and disease progression." *Antivir Ther* 12(2): 163-8.

Zhang, L., C. D. Carruthers, et al. (1997). "HIV type 1 subtypes, coreceptor usage, and CCR5 polymorphism." *AIDS Res Hum Retroviruses* 13(16): 1357-66.

Ziermann, R., K. Limoli, et al. (2000). "A mutation in human immunodeficiency virus type 1 protease, N88S, that causes in vitro hypersensitivity to amprenavir." *J Virol* 74(9): 4414-9.

## **ANEXOS**



**ANEXO B** - Formulário pré-estruturado onde foram capturadas informações sócio-demográficas, clínicas e laboratoriais.

**PERFIL DE RESISTÊNCIA GENOTÍPICA DO HIV-1 AOS ANTI-RETROVIRAIS EM UMA POPULAÇÃO DE MULHERES INFECTADAS PELO HIV EXPOSTAS A QUIMIOPROFILAXIA COM ANTI-RETROVIRAIS PARA PREVENÇÃO DA TRANSMISSÃO VERTICAL DO HIV DURANTE A GESTAÇÃO.**

Número na Coorte: \_\_\_\_\_

**1-Identificação, dados demográficos e sócio econômicos:**

1.1-Nome: \_\_\_\_\_

1.2-Prontuário: \_\_\_\_\_

1.3-Local de acompanhamento:  1- HGNI  2- Outro \_\_\_\_\_

1.4-Município de residência: \_\_\_\_\_

1.5- DN: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_; 1.5.1- Data da primeira consulta desta gestação no HGNI: : \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

1.6- Etnia/cor:

1  branca

2  negra

3  parda/mulata

4  indígena

5  ignorada

1.7-Situação conjugal:  1- Unida  2- Não unida  3- Ignorado

1.8-Escolaridade:

1  Analfabeta

2  1º grau incompleto até 4ª série

3  1º grau incompleto até 7ª série

4  1º grau completo

5  2º grau incompleto

6  2º grau completo

7  > 2º grau

1.9-Renda familiar mensal (em salários mínimos) - inclui auxílio doença, pensão alimentícia, renda decorrente de trabalho informal etc:

1  Sem renda (vive de ajuda de parentes e/ou amigos)

2  Até 1 salário

3  Até 2 salários

4  Até 3 salários

5  Até 4 salários

6  Até 5 salários

7  > 5 salários

1.10-Ocupação: \_\_\_\_\_

**2-Historia epidemiológica, Obstertrica e HPP**

2.1-Gesta:  (contar a gestação atual);

2.2.1-Para:  (não contar o parto atual);

2.2.2-Abortos:

2.2.2.1-espontâneos;  provocados;

2.2.2.2-Último aborto: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

2.2.3-Prenhez Tubária:

2.3-Diagnóstico de IST antes da atual gestação?

1- Sim; 2- Não

2.2.1- Se SIM, especificar: 1- Sífilis; 2- Gonorréia; 3- Clamídia; 4- Tricomoníase;  
5- HPV; 6- Linfocitoma venéreo; 7- Doença inflamatória pélvica;

Outra(s); Descreva: \_\_\_\_\_

2.2.1.1-Recebeu tratamento para IST antes da atual gestação?

1- Sim 2- Não

2.4-Diagnóstico de TB antes da atual gestação?

1- Sim; 2- Não

2.4.1- Se SIM, recebeu tratamento?: 1- Sim 2- Não

2.4.2-Recebeu profilaxia para TB antes da atual gestação? (INH)

1- Sim; 2- Não; 3- Não sabe informar

2.5-Passado de Tabagismo: 1- Sim; 2- Não; 3- Informação não disponível.

2.5.1-Tabagismo na gestação atual: 1- Sim; 2- Não; 3- Informação não disponível.

2.6-Passado de Etilismo: 1- Sim; 2- Não; 3- Informação não disponível.

2.6.1-Etilismo na gestação atual: 1- Sim; 2- Não; 3- Informação não disponível.

2.7-Passado de uso de Drogas ilícitas: 1- Sim; 2- Não; 3- Informação não disponível.

2.7-Uso de Drogas ilícitas na gestação atual: 1- Sim; 2- Não; 3- Informação não disponível.

2.7.1.1 **Se respondeu sim**, Qual(ais):

Maconha; Cola;  Crack;  Droga Injetável; Outras: \_\_\_\_\_

**3-Diagnóstico da Infecção pelo HIV (Paciente):**

3.1-Data da 1ª sorologia Anti-HIV(+): \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

3.2- Idade gestacional no início do pré-natal no HGNI: ||

3.2.1-Data da primeira US nesta gestação: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Idade Gestacional: ||

3.3-O diagnóstico da infecção pelo HIV foi feito durante a gestação atual? 1-Sim; 2-Não

3.3.1- **Se não**, Sabia ser HIV + quando engravidou? 1-Sim; 2-Não

2.1-Gesta:  (contar a gestação atual);

2.2.1-Para:  (não contar o parto atual);

2.2.2-Abortos:

2.2.2.1-espontâneos;  provocados;

2.2.2.2-Último aborto: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

2.2.3-Prenhez Tubária:

2.3-Diagnóstico de IST antes da atual gestação?

1- Sim; 2- Não

2.2.1-Se SIM, especificar: 1- Sífilis; 2- Gonorréia; 3- Clamídia; 4- Tricomoníase;

5- HPV; 6- Linfogranuloma venéreo; 7- Doença inflamatória pélvica;

Outra(s); Descreva: \_\_\_\_\_

2.2.1.1-Recebeu tratamento para IST antes da atual gestação?

1- Sim 2- Não

2.4-Diagnóstico de TB antes da atual gestação?

1- Sim; 2- Não

2.4.1-Se SIM, recebeu tratamento?: 1- Sim 2- Não

2.4.2-Recebeu profilaxia para TB antes da atual gestação? (INH)

1- Sim; 2- Não; 3-Não sabe informar

2.5-Passado de Tabagismo: 1- Sim; 2- Não; 3- Informação não disponível.

2.5.1-Tabagismo na gestação atual: 1- Sim; 2- Não; 3- Informação não disponível.

2.6-Passado de Etilismo: 1- Sim; 2- Não; 3- Informação não disponível.

2.6.1-Etilismo na gestação atual: 1- Sim; 2- Não; 3- Informação não disponível.

2.7-Passado de uso de Drogas ilícitas: 1- Sim; 2- Não; 3- Informação não disponível.

2.7-Uso de Drogas ilícitas na gestação atual: 1- Sim; 2- Não; 3- Informação não disponível.

2.7.1.1 **Se respondeu sim**, Qual(ais):

Maconha; Cola; Crack; Droga Injetável; Outras: \_\_\_\_\_

**3-Diagnóstico da Infecção pelo HIV (Paciente):**

3.1-Data da 1ª sorologia Anti-HIV(+): \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

3.2- Idade gestacional no início do pré-natal no HGNI:

3.2.1-Data da primeira US nesta gestação: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Idade Gestacional:

3.3-O diagnóstico da infecção pelo HIV foi feito durante a gestação atual? 1-Sim; 2-Não

3.3.1-**Se não**, Sabia ser HIV + quando engravidou? 1-Sim; 2-Não

3.3.1.1-**Se sim**, fazia acompanhamento específico?

1-Sim (especificar local: \_\_\_\_\_);

2-Não

3.3.1.2-Quantas gestações após o diagnóstico da infecção pelo HIV?  (contar com a gestação que está sendo motivo deste levantamento)

3.4-Classificação da infecção pelo HIV no início do pré-natal:

A 1                      B 1                      C 1

A 2                      B 2                      C 2

A 3                      B 3                      C 3

3.5-Diagnóstico de IO antes da atual gestação?

1-Sim;      2-Não;      3-Informação não disponível.

3.5.1-**Se sim**, quais? 1- PCP;    2- Neurotoxoplasmose;    3-Candidíase invasiva;

4- outras: (especificar): \_\_\_\_\_

5-Não sabe informar

3.5.1.1-**Se teve**, recebeu tratamento?: 1- Sim;    2- Não;    5-Não sabe informar

3.5.2-Recebeu profilaxia primária para IO antes da atual gestação?

1- Sim;    2- Não;    3- Informação não disponível

3.6-Idade Gestacional no início da Quimioprofilaxia Antiretroviral nesta Gestação: Semanas.

3.7-Tem filhos vivos? (não incluir o que é motivo deste levantamento): 1-Sim;                      2-Não;

3-Não se Aplica

3.7.1- **Se sim**, quantos?:

3.7.1.1-Alguns desses filhos são HIV+? 1-Sim;    2-Não;    3-Não testados;    4- Testados, mas sem resultado

3.8-Tem filhos mortos? (não incluir o que é motivo deste levantamento): 1-Sim;    2-Não

3-Não se Aplica

3.8.1- **Se sim**, quantos?:

3.8.1.1-Alguns desses filhos eram HIV+? 1-Sim;    2-Não;    3-Não testados;

4-Testados, mas sem resultado

3.8.1.1.1**Se respondeu Sim**, filhos mortos por AIDS?: 1-Sim;    2-Não;    3-Não sabe;

#### 4-Categoria de Exposição:

4.1-Gestante:

1-UDI;    2-Transfusão Hemoderivados;    3-Heterossexual;    4- Ignorado

4.1.1-Parceria sexual:

1-Parceiro UDI;    2-Parceiro bissexual;    3-Parceiro c/Múltiplas parceiras;

4-Parceiro Hemotransfundido;    5- Hemofílico;    6-Nenhuma das anteriores    7-Ignorado

4.1.2-Teve parceiro no passado sabidamente HIV+: 1- Sim; 2-Não; 3- Não sabe informar

4.1.3-Já Teve parceiro de outro Estado? 1-Sim; 2-Não; 3-Não Sabe; 9-Ignorado

4.1.2.1-Se sim, quais Estados: \_\_\_\_\_

4.1.4-Já Teve parceiro de outros Países? 1-Sim; 2-Não; 3-Não Sabe; 9-Ignorado

4.1.3.1-Se sim, quais Países: \_\_\_\_\_

#### 4.2-Parceiro:

4.2.1-Situação sorológica do parceiro atual:

1-HIV+; 2- HIV -; 3-Parceiro ainda não foi testado; 4- Parceira não informa o seu "STATUS SOROLÓGICO" para o parceiro; 5-Parceiro não quer realizar o teste; 6-Informação não disponível

4.2.1.1-**Se o parceiro já foi testado:** Momento de realização do teste do parceiro atual:

1-Depois do diagnóstico da parceira;

2-Já havia sido testado antes da parceira; 9-Ignorado

#### 5-Informações sobre uso de ARVs.

5.1-Fez uso de qualquer medicamento ARV antes desta gestação? 1- Sim; 2- Não;

5.1.2.1-**Se sim** registre as drogas anti-retrovirais prescritas antes do diagnóstico dessa gestação

ARV*	Data de início	Data de fim OU CONTINUA	Motivo de início			Motivo de suspensão**
			Gestação	Queda de CD4 ou indicação clínica	Outra (qual?)	

\*1-ZIDOVUINA+ LAMIVUDINA; 2- NELFINAVIR; 3- NEVIRAPINA; 4-ZIDOVUDINA; 5-LAMIVUDINA;

6-ESTAVUDINA; 7- LOPINAVIR/RITONAVIR; 8- EFAVIRENZ; 9-INDINAVIR; 10-DIDANOSINA;

11-ABACAVIR 12-SAQUINAVIR 13- RITONAVIR 14-OUTRO, ESPECIFICAR: \_\_\_\_\_)

\*\* 1. Toxicidade (especificar qual), 2- Intolerância (especificar tipo), 3 – Falha virológica, 4 – Falha imunológica, 5- Falha clínica, 6- Interação com outros medicamentos (especificar qual medicamento), 7 – Intensificação, 8 – Comodidade posológica, 9 – Abandono de tratamento, 10 – Óbito, 11 – Contaminação de NFV, 12 – Final de gestação, 13 - Outro – Qual? \_\_\_\_\_

5.2-Drogas anti-retrovirais prescritas após o diagnóstico dessa gestação (registrar o número correspondente a cada droga) – REPETIR OS DADOS DA TABELA ACIMA SE NECESSÁRIO:

ARV*	Data de início	Data de fim OU CONTINUA	Motivo de início			Motivo de suspensão**
			Gestação	Queda de CD4 ou indicação clínica	Outra (qual?)	

\*1-ZIDOVUINA+ LAMIVUDINA; 2- NELFINAVIR; 3- NEVIRAPINA; 4-ZIDOVUDINA; 5-LAMIVUDINA; 6- ESTAVUDINA; 7- LOPINAVIR/RITONAVIR; 8- EFAVIRENZ; 9-INDINAVIR; 10-DIDANOSINA;

11-ABACAVIR 12-SAQUINAVIR 13- RITONAVIR 14-OUTRO, ESPECIFICAR: \_\_\_\_\_)

\*\* 1. Toxicidade (especificar qual), 2- Intolerância (especificar tipo), 3 – Falha virológica, 4 – Falha imunológica, 5- Falha clínica, 6- Interação com outros medicamentos (especificar qual medicamento), 7 – Intensificação, 8 – Comodidade posológica, 9 – Abandono de tratamento, 10 – Óbito, 11 – Contaminação de NFV, 12 – Final de gestação, 13-Outro – Qual? \_\_\_\_\_

5.2.1Desenvolveu algum evento adverso relacionado à terapia antiretroviral nesta gestação?

1-Sim; 2-Não; 3-Informação não disponível;

5.2.1.1 **Se sim**, Qual?

1-Anemia; 2- Leucopenia; 3- Trombocitopenia; 4- Elevação de TGO/TGP (>3x)

5- Elevação de Amilase/Lípase; 6- Farmacodermia; 7- Diarréia; 8-

Hipertrigliceridemia

9- Hipercolesterolemia; 10 – Hiperglicemia; 11-

Outro(descreva): \_\_\_\_\_

5.2.2-Foi feita troca de esquema anti-retroviral em decorrência de evento adverso, intolerância?

1-Sim ;(Qual: \_\_\_\_\_);  2-Não

5.3-Interrompeu os Antiretrovirais no dia do Parto:

1-Sim; 2-Não; 3-Informação não disponível

## 6-Exames Complementares:

**6.1-Exames da primeira consulta de Pré-Natal antes (próximo) do início dos anti-retrovirais:**

6.1.1-Hemograma – data: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

1-HB|\_\_\_\_\_|g/dl 2-HT|\_\_\_\_\_|%; 3-LEUCÓCITOS TOTAIS|\_\_\_\_\_|cel/mm<sup>3</sup>;

4-|\_\_\_\_\_|% DE LINFÓCITOS

**6.2-Exames sorológicos:**

1-(1ª-) VDRL: Reagente(Título: 1:|\_\_\_\_|); NÃO Reagente; Data: \_\_/\_\_/\_\_\_\_ 3-Não Realizado

2-RUBÉOLA: IgM : \_\_\_\_; IgG:\_\_\_\_; Data:\_\_/\_\_/\_\_\_\_; 3-Não Realizado

3-TOXOPLASMOSE: IgM : \_\_\_\_; IgG:\_\_\_\_; Data:\_\_/\_\_/\_\_\_\_; 3-Não Realizado

4-CMV: IgM : \_\_\_\_; IgG:\_\_\_\_; Data:\_\_/\_\_/\_\_\_\_; 3-Não Realizado

5-HBSAG : 1-NEGATIVO; 2-POSITIVO; 3-NÃO REALIZADO

6-ANTI-HBC : 1-NEGATIVO; 2-POSITIVO; 3-NÃO REALIZADO

7-ANTI-HBS : 1-NEGATIVO; 2-POSITIVO; 3-NÃO REALIZADO

8-HEPATITE-C: 1-NEGATIVO; 2-POSITIVO; 3-NÃO REALIZADO

9-SOROLOGIA PARA HERPES VIRUS 2: 1-NEGATIVO; 2-POSITIVO; 3-NÃO REALIZADO

**6.3-Colpocitologico:**

Data: \_\_/\_\_/\_\_\_\_; MARQUE TODOS OS NÚMEROS QUE SE APLICAM:

1-NORMAL; 2-LSIL(LESÃO DE BAIXO GRAU); 3-HSIL(L. ALTO GRAU);

4-INFLAMATÓRIO; 5-CANDIDÍASE; 6-GARDNERELLA VAGINALIS;

7- FLORA MISTA; 8-ATIVIDADE NUCLEAR; 9-METAPLASIA ESCAMOSA; 10-ASCUS;

11-Flora lactobacilar; 12-NIC I; 13-NIC II; 14-NIC III; 15-HPV; 16-COLPITE

6.4-PPD: 1- REATOR \_\_\_\_\_mm; 2-NÃO Reator; DATA: \_\_/\_\_/\_\_\_\_; 3-Não Realizado

**6.5- ELISA MENOS SENSIVEL para HIV-1(BED):**

1-INCIDENTE; 2-FALSO INCIDENTE; 3-PREVALENTE; 4-NÃO REALIZADO

6.6-Diagnóstico de IST durante o pré-natal? 1- Sim; 2- Não

6.6.1- Se SIM, especificar:

1-Sífilis; 2- Gonorréia; 3-Clamídia; 4-Tricomoniase; 5- HPV

6-Linfogranuloma venéreo; 7- Doença inflamatória pélvica 8- Herpes simples

Outra: \_\_\_\_\_

6.1.2-Recebeu tratamento para IST durante o pré-natal? 1-Sim; 2- Não

6.7-Colheu Urina para PCR para Clamídia? 1-Sim; 2- Não

6.7.1-Se Sim, resultado: 1-Reagente; 2-Não reagente.

6.8-Colheu Urina para PCR para Gonococo? 1-Sim; 2- Não

6.8.1-Se Sim, resultado: 1-Reagente; 2-Não reagente.

6.9-Colheu Secreção Cervical (ALGUM PONTO) para determinação da Carga viral para o HIV-1?

1-Sim; 2- Não

6.10-Wet Mount realizado? 1-Sim; 2- Não

6.10.1-Ph: \_\_\_\_\_

6.10.2-Fungo: 1- Positivo; 2- Negativo

6.10.3-Clue Cell: 1- Positivo; 2- Negativo

6.10.4-Teste do odor: 1- Positivo; 2- Negativo

6.10.5-Trichomonas: 1- Positivo; 2- Negativo

7-HPV Anal: 1- Presente 2- Não Visualizado no Exame Clínico

8-HPV Vaginal: 1- Presente 2- Não Visualizado no Exame Clínico

9-HPV Cervical: 1- Presente 2- Não Visualizado no Exame Clínico

10-Herpes Genital: 1- Presente 2- Não Visualizado no Exame Clínico

#### 7-VDRL na Maternidade:

Reagente(Título: 1:\_\_\_\_\_); NÃO Reagente; Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ 3-Não Realizado

7.1-Se reagente, Foi tratada? SIM; NÃO

#### 8-USOM

8.1-Primeiro US Obstétrico: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_; Semanas de Gestação: \_\_\_\_\_

8.2-Segundo US Obstétrico: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_; Semanas de Gestação: \_\_\_\_\_

#### 9-Informações do PARTO

9.1-Data do Parto: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

9.2-Idade Gestacional no parto: \_\_\_\_\_Semanas (Capurro)

9.3-Tipo de parto: 2-Cesariana eletiva; 2- Cesariana de Urgência, 3- Vaginal

9.3.1-Se Cesariana, Indicação para a cesárea (marcar todas as que se aplicam):

Eletiva para prevenção da TV; Cesárea prévia; Apresentação anômala; Sofrimento fetal

Distócia cervical; Lesões extensas por HPV; Gestação gemelar; Herpes genital em atividade

Outra. Especificar:

9.3.2-Se parto Vaginal, Episiotomia?

1-Sim; 2- Não; 3- Informação não disponível

9.4-Membranas no momento do parto:

1-Íntegras 2-Rotas; 3- Informação não disponível

9.4.1-Se Rotas, Especificar tempo: \_\_\_\_\_ horas

9.4.2-Fez uso de antibiótico após a ruptura de membranas? 1-Sim; 2- Não;

3- Informação não disponível

9.5-Teve Complicações no Parto?

1-Sim; 2- Não; 3- Informação não disponível

9.5.1-Se SIM, qual(ais)?

1- Placenta Prévia; 2- DPP; 3- Corioamnionite; 4- Insuficiência Placentária

5-Circular de Cordão; 6- Outras: \_\_\_\_\_

## 9.6-Teve complicações no Pos-Parto?

1-Sim; 2- Não; 3- Informação não disponível

## 9.6.1-Se SIM, qual(ais)?

1-Febre (> 38°C > 24 horas); 2-Infecção urinária; 3-Infecção de ferida cirúrgica de ferida cirúrgica; 4-Endometrite; 5-Pneumonia; 6-Derrame pleural; 7-Sepsis; 8-Anemia grave  
9-Tromboembolismo; 10-Outra:-

---

## 9.7-Fez uso de AZT venoso durante o trabalho de parto?

1-Sim; 2- Não; 3- Informação não disponível

## 10-Alta

## 10.1-Recebeu alta hospitalar?

1-Sim; 2- Não;

Se não, Qual o motivo:

1-Óbito; 2-Transferida para outra unidade; 3-Evadiu-se

## 10.2-Tempo de hospitalização?

Dias

## 10.3- A internação foi prolongada devido a complicações do parto?

1-Sim; 2- Não; 3- Não houve complicação do parto.

## 10.4-Foi referendada para Acompanhamento ambulatorial?

1-Sim; 2- Não

## 10.5-Uso de medicamentos ARV no Pós Parto?

1-Sim; (preencha a tabela abaixo) 2- Não; 3- Informação não disponível

10.5.1-Se SIM, Qual o Tratamento ARV usado após o parto? – REPETIR DADOS ANTERIORES SE NECESSÁRIO

ARV*	Data de início	Data de fim	Motivo de início			**Motivo de suspensão
			Nova gestação	Queda de CD4	Outra (qual?)	

\*1-ZIDOVUINA+ LAMIVUDINA; 2- NELFINAVIR; 3- NEVIRAPINA; 4-ZIDOVUDINA; 5-LAMIVUDINA; 6- ESTAVUDINA; 7- LOPINAVIR/RITONAVIR; 8- EFAVIRENZ; 9-INDINAVIR; 10-DIDANOSINA;

11-ABACAVIR 12-SAQUINAVIR 13- RITONAVIR 14-OUTRO, ESPECIFICAR:\_\_\_\_\_)

\*\* 1. Toxicidade (especificar qual), 2- Intolerância (especificar tipo), 3 – Falha virológica, 4 – Falha imunológica, 5- Falha clínica, 6- Interação com outros medicamentos (especificar qual medicamento), 7 – Intensificação, 8 – Comodidade posológica, 9 – Abandono de tratamento, 10 – Óbito, 11 – Nelfinavir contaminado, 12-Final de gestação, 13-Outro (qual?)

**11-Dados do Recém-nato (RN)**

11.1-Peso do RN ao Nascer: \_\_\_\_\_ g

11.2-Estatura: \_\_\_\_\_ cm

11.3-Per. Cefálico: \_\_\_\_\_ cm

11.4-APGAR 1º|\_\_\_\_| 5º|\_\_\_\_|

11.5-Natimorto? 1-Sim; 2- Não;

11.6-Presença de Má Formação Congênita:

1-Sim; 2- Não; 3- Informação não disponível11.6.1-Se SIM, Qual? \_\_\_\_\_

11.7-Apresentou complicações no parto ou pos-parto imediato?

1-Sim; 2- Não; 3- Informação não disponível11.7.1-Se SIM, Ficou na INCUBADORA?1-Sim; 2- Não; 3- Informação não disponível

11.9--Recebeu AZT Xarope?

11.9.1-Se SIM, especificar:11.9.1.1-O Local: 1-Na maternidade; 2-Em casa; 3- Informação não disponível11.9.1.2-O Tempo: Por seis semanas? 1-Sim; 2- Não; 3- Informação não disponível11.9.2.1-Se não por seis semanas, qual o tempo? \_\_\_\_\_ Dias

11.10-Aleitamento materno?

1-Sim; 2- Não; 3- Informação não disponível11.10.1-**Se SIM**, especificar:Ainda na maternidadeEm casa durante uso de AZTEm casa, após término do AZT Xarope.**12-Diagnóstico da criança (RN):**1-Não infectada; 2-Infectada; 3-Ainda indefinido; 4-Perda de acompanhamento antes da definição do diagnóstico**12.1-Resultados da CARGA VIRAL do HIV-1 do RN:**

12.1.1-Exame até 48 h de nascimento: \_\_\_\_\_ cópias/ml; \_\_\_\_\_Log; Data: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_.

12.1.2-Exame 01 mês após o nascimento: \_\_\_\_\_ cópias/ml; \_\_\_\_\_Log; Data: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_.

12.1.3-Exame 04 meses após o nascimento: \_\_\_\_\_ cópias/ml; \_\_\_\_\_Log; Data: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_