



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA EVANDRO CHAGAS
MESTRADO EM PESQUISA CLÍNICA EM DOENÇAS
INFECCIOSAS

ADRIANA RODRIGUES PEDRO

**ANÁLISE DO PERFIL DE CARGA VIRAL E DE
RESISTÊNCIA GENOTÍPICA DO HIV EM SECREÇÕES
GENITAIS DE GESTANTES SUBMETIDAS À
QUIMIOPROFILAXIA PARA PREVENÇÃO DA
TRANSMISSÃO VERTICAL**

Rio de Janeiro

2011

**ANÁLISE DO PERFIL DE CARGA VIRAL E DE RESISTÊNCIA
GENOTÍPICA DO HIV EM SECREÇÕES GENITAIS DE GESTANTES
SUBMETIDAS À QUIMIOPROFILAXIA PARA PREVENÇÃO DA
TRANSMISSÃO VERTICAL**

ADRIANA RODRIGUES PEDRO

Dissertação apresentada ao Curso como
requisito para obtenção do Título de Mestre em
Ciências na Área de Concentração: Pesquisa
Clínica em Doenças Infecciosas.

Orientadora: Dra. Mariza Gonçalves Morgado

Orientadora: Dra. Beatriz Grinsztejn

Rio de Janeiro

2011

**ANÁLISE DO PERFIL DE CARGA VIRAL E DE RESISTÊNCIA
GENOTÍPICA DO HIV EM SECREÇÕES GENITAIS DE GESTANTES
SUBMETIDAS À QUIMIOPROFILAXIA PARA PREVENÇÃO DA
TRANSMISSÃO VERTICAL**

Dissertação apresentada ao Curso como
requisito para obtenção do Título de
Mestre em Ciências na Área de
Concentração: Pesquisa Clínica em
Doenças Infecciosas.

Orientadoras: Dra. Mariza Gonçalves Morgado
Dra. Beatriz Grinsztejn

Aprovada em: 01 de novembro de 2011

Banca Examinadora

Dr. Luíz Roberto Castelo Branco (Presidente)
IOC/FIOCRUZ

Dr. Gonzalo Bello Betancur
IOC/FIOCRUZ

Dra. Elizabete Machado
IPPMG/UFRJ

Dra. Sylvia Lopes Maia Teixeira (Suplente)
IOC/FIOCRUZ

“Quando uma alma aprende a cumprir a vontade
Divina, torna-se senhora do próprio coração de Deus
Por que o Senhor não sabe dizer não àqueles que lhe dizem sim.”

Irmã Jacinta

A Deus,
Doce Hóspede da minha alma,
Pelo Seu grande amor, cuidado e Sua predileção por mim.

Aos meus pais,
Antônio e Zélia
Pela construção de tudo o que sou.

Às minhas irmãs, cunhados e sobrinhas
Porque família é tudo!

Ao meu grande amigo
Francisco Guimarães [*in memoriam*],
Pela imensa alegria de ter os meus dias iluminados pelo sorriso e
Pela presença de uma pessoa tão incrível quanto ele.

AGRADECIMENTOS

Na vida não conquistamos nada sozinhos. Sempre precisamos de outras pessoas para compartilhar nossas lutas e para nos ajudar a alcançar os nossos objetivos. Muitas vezes um simples gesto pode mudar a nossa vida e contribuir para o nosso sucesso.

Agradeço primeiramente a Deus, por me conduzir em Seus caminhos e cumular minha vida de graças e conquistas;

Agradeço a minha orientadora, Dra. Mariza G. Morgado, pela oportunidade, pela orientação, pelo convívio nestes anos de trabalho e principalmente por acreditar em mim;

À Dra. Beatriz Grinsztejn, co-orientadora, por todas as contribuições na elaboração e desenrolar deste estudo;

À Dra. Monick Guimarães, chefe do Laboratório de Aids & Imunologia Molecular, por todo apoio, incentivo e carinho;

Aos meus pais por mais uma vez comprarem uma briga que não era deles;

Às minhas irmãs e cunhados por todo exemplo e incentivo durante esses anos;

Aos amigos Tatiana Pereira, Priscila Guimarães, Carlos Silva, Gonzalo Bello, Thaísse Leite, Ziza Almeida, Caroline Passaes, Gisele Borges, Victor Pimentel, Swellen Azevedo, Edson Oliveira, Carmem Gripp, Isabel Monteiro, Roberta Lorette, Rafael Oliveira enfim, todos do Laboratório de Aids e Imunologia Molecular pelo doce convívio durante todo esse tempo, pelas conversas, brincadeiras, risadas e palavras de incentivo;

Ao Dr. José Pilotto, pela amizade, pelas amostras, idéias, sugestões, incentivos morais e materiais, muito obrigada por tudo, tudo mesmo!!

Às minhas amigas Dra. Sylvia Teixeira, MSc. Joana Moraes, Geane Flores, Haline Barroso, MSc. Izabel Inês e Vanessa Martins, pelas conversas, caronas, risadas, orações, camas emprestadas, pelos conselhos, ouvidos, e ombros amigos. Muito obrigada amigas, amo vocês!

À Fernanda Heloíse Côrtes por todo apoio e pela enorme ajuda com a formatação desta dissertação, sem você eu teria destruído todos os computadores do laboratório.

Aos meus amigos de turma Maria Clara Amorim, Patrícia Santiago, Larissa Costa Dyego Carletty e Roíza Rodrigues, pelos ótimos momentos em que passamos e estudamos juntos, são aprendizados que ficarão para a vida inteira.

Aos meus amigos Terezinha Jane, Eloísa Gomes, Francisco Guimarães, Flávia e Eduardo Ribeiro, Flauviano Neto, Francianne Assis, Pe. Willian César, e a minha comunidade por todo o incentivo e compreensão pela ausência durante este trabalho, e por entenderem que “quem dentro está junto está”.

À Dra. Ruth Khalili e Cynthia Cunha por toda a ajuda e suporte com as análises estatísticas, o meu muito obrigada!

À empresa Biomèrrieux, nas pessoas da Doutora Catheryne Azaritti, Mariana Vitule, e Eriberto Almeida pela atenção, disponibilidade, carinho e amizade que tiveram por mim durante todo o tempo em que trabalhamos juntos e por ceder o espaço, os aparelhos e reagentes para a quantificação da carga viral genital.

Ao Dr. Armando Schubach diretor da pós-graduação do IPEC por sua acessibilidade e compreensão em todos os momentos em que foi solicitado.

À Priscila, secretária do departamento de ensino do IPEC, por sua simpatia, agilidade e prontidão em todos os momentos que precisei da sua ajuda.

À Fiocruz pela bolsa de estudo concedida.

Pedro, A R. **Análise do perfil de carga viral e de resistência genotípica do HIV em secreções genitais de gestantes submetidas à quimioprofilaxia para prevenção da transmissão vertical.** Rio de Janeiro, 2011. 108 f. Dissertação [Mestrado em Pesquisa Clínica em doenças Infecciosas] – Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas.

RESUMO

Introdução: A presença do HIV no trato genital feminino tem um papel importante no estudo da transmissão vertical, bem como na transmissão heterossexual do vírus. A quantificação, viral nas secreções genitais é essencial para estudar a compartimentalização viral e desenvolver estratégias de intervenção para evitar a transmissão do HIV e a disseminação de variantes resistentes aos antirretrovirais.

Objetivo: O objetivo deste estudo foi analisar o perfil de carga viral em secreções genitais de gestantes submetidas à quimioprofilaxia para prevenção da transmissão vertical do HIV antes da introdução da terapia antirretroviral (TARV), e após sua descontinuidade no parto, avaliando uma possível correlação com a carga viral plasmática. Além disso, foi feito o seqüenciamento de nucleotídeos das variantes virais presentes nas secreções no intuito de avaliar o polimorfismo viral e a presença de mutações de resistência.

Material e Métodos: Uma coorte de 274 gestantes portadoras infectadas pelo HIV, virgens de tratamento, foi acompanhada no Hospital Geral de Nova Iguaçu, Rio de Janeiro, de 2005 a 2008. Desse grupo, um total de 117 gestantes aceitou participar deste subestudo e todas assinaram um termo de consentimento livre esclarecido. A coleta de amostras de plasma e secreção na visita de inclusão no estudo (pré-TARV) foi possível para 92 gestantes. As amostras cervicovaginais foram coletadas em tiras Tear Flow®, estocadas em 500µL de tampão NASBA® e armazenadas a -70°C. Essas amostras foram submetidas à quantificação do RNA-HIV-1 através do NASBA Nuclisens EasyQ® (bioMérieux). O bDNA® (Siemens) foi utilizado para determinar a carga viral no plasma. O RNA do HIV-1 no plasma foi comparado ao da secreção genital. Para a genotipagem as amostras foram analisadas utilizando o Kit ViroSeq®. As amostras que não amplificaram por esta metodologia foram resgatadas utilizando-se um método *in house*. As seqüências foram editadas e analisadas através de ferramentas de bioinformática para a determinação do subtipo viral, polimorfismos e mutações de resistência.

Resultados: O RNA do HIV-1 foi detectado em 40 (43,5%) das 92 amostras de secreção genital e em 83 (91,3%) das amostras plasma no momento pré-TARV. A análise comparativa das cargas virais entre o plasma e a secreção genital foi realizada para 74 amostras. Foi evidenciado que cerca de 50% (36/74) das amostras de plasma e secreção genital encontra-se na mesma faixa de carga viral. Destas, 13 (36%) na faixa de detecção abaixo de 1000 cópias/ml, 9 (25%) para a faixa intermediária de 1.000 – 10.000 cp/ml e 14 (39%) para a faixa acima de 10.000 cp/ml. Trinta e oito amostras (51%) tiveram perfil discordante na comparação entre as diferentes faixas de CV, com maior discrepância na faixa intermediária (1.000 – 10.000 cópias/ml), confirmando as diferenças entre níveis analisados de carga viral plasmática e na secreção genital antes da introdução de TARV ($p=0,013$). No momento pós-TARV, 43 mulheres possuíam amostra genital e plasmática posterior à interrupção do tratamento. Estas amostras foram obtidas nas visitas realizadas entre dois e seis meses após o parto, com uma mediana de 3,5 meses (DP= 1,7, IQI= 2-6). Das 43 amostras genitais coletadas, 36 geraram resultados mensuráveis de carga viral e sete foram inválidas para o teste. Na distribuição da CV nos dois compartimentos observamos que 55,8% das mulheres tinham CV detectável na secreção genital e uma proporção mais elevada de CVs indetectáveis na secreção quando comparada ao plasma. A amplificação e a genotipagem foram obtidas para 24 (60%) amostras no momento pré-TARV e 13 (40%) das 34 amostras no momento pós-TARV. A análise das seqüências obtidas não revelou nenhuma mutação de resistência primária aos antirretrovirais, embora a presença de alguns polimorfismos e mutações acessórias tenha sido verificada.

Conclusão: Estes resultados sugerem que a CV do HIV no plasma é um importante preditor da CV nas secreções genitais. Entretanto, pode haver excreção do HIV nas secreções genitais, ainda que a ausência de viremia. Algumas mulheres apresentaram um perfil de carga viral e de polimorfismos distintos no plasma e na secreção genital, sugerindo que o compartimento genital pode funcionar como um reservatório para a replicação e diferenciação do HIV.

Palavras-chaves: 1 . HIV. 2 . Carga viral. 3 . Gestante. 4 . TARV. 5 . Secreção genital. 6 . Resistência à terapia antirretroviral.

Pedro, A R. **Analysis of HIV viral load and genotypic resistance profile in vaginal secretion of pregnant woman submitted to chemoprophylaxis for mother to children vertical transmission.** Rio de Janeiro, 2011. 108 f. Master [Science dissertation in Clinic research in Infectious Disease] – Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas.

Abstract

Introduction: The presence of HIV-1 in the female genital tract has an important role in mother-to-child transmission (MTCT) of HIV, as well as heterosexual transmission. Quantitation of HIV-1 levels in mucosal secretions is essential to study compartmentalization of HIV-1 and to develop intervention strategies to prevent HIV transmission, as well as the dissemination of viral variants resistant to antiretroviral drugs.

Aim: The aim of this study was to analyze the profile of HIV-1 viral load in genital secretions in HIV-infected pregnant women submitted to chemoprophylaxis for the prevention of MTCT before treatment and after its discontinuation at delivery. The quantification of HIV-1 viral load was undertaken in the women's genital tract to evaluate a possible correlation with plasma HIV viral load. Moreover, genotyping of HIV samples in the genital secretions was performed to assess viral polymorphisms and antiretroviral drug resistance profiles.

Methods: A cohort of 274 HIV-1 infected pregnant women, antiretroviral-naïve, was followed up at the Hospital Geral de Nova Iguaçu, Rio de Janeiro, from 2005 to 2008. Of that group, a total of 117 pregnant women agreed to participate in this sub study and all women signed an informed consent form. The study has been approved by the IPEC IRB. Collection of plasma samples and genital secretions was possible for 92 pregnant women at the inclusion in the study, before starting antiretrovirals. HIV-1 RNA has been quantified in the plasma and in the genital secretion. The cervicovaginal samples were collected in Flow Tear®, stored in 500µL of NASBA buffer and stored at -70 ° C. The methodology bDNA ® (Siemens) was used to determine viral load in plasma and EasyQ NucliSens NASBA ® (bioMérieux) was used for the quantification of genital samples. The HIV-1 RNA in plasma was compared to that of vaginal secretions. For genotyping analysis the samples were analyzed using the ViroSeq® Kit. The samples that could not be amplified by this method were tested using an in-house method. The sequences were edited and further analyzed using bioinformatics tools for HIV subtype determination and assessment of viral polymorphisms and drug resistance mutations.

Results: The HIV-1 RNA was detected in 40 (43.5%) of 92 genital secretion samples and in 83 (91.3%) of 92 plasma samples. The comparative analysis of HIV-1 viral loads between plasma and genital secretions was performed for 74 samples. It was shown that the viral load in about 50% (36/74) of the plasma and genital secretion samples were found to be in the same range. Of these, 13 (36%) were in the detection range below 1.000 copies/ml, 9 (25%) in the intermediate range (1.000 to 10.000 copies/ml) and 14 (39%) were above 10.000 copies/ml. Thirty-eight samples (51%) were discordant in viral load analysis in both compartments, with a greater discrepancy observed in the intermediate range (1.000 to 10.000 copies/ml), confirming the differences of plasma and genital secretions viral loads before the introduction highly active antiretroviral therapy (HAART) ($p=0.013$). In the postpartum period, after HAART discontinuation, 43 women had samples of plasma and genital secretion available for HIV-1 viral load analyses. These samples were obtained between the two weeks and the six month visit ($SD= 1.7$, $IQI = 2-6$). Of the 43 genital samples collected, 36 had measurable viral loads and seven were invalid for the test. In the distribution of viral load in the two compartments, 55.8% of women had detectable viral load in the genital secretions. Undetectable HIV-1 viral load was seen more frequently in the genital secretions, when compared to plasma samples. Genotyping was obtained for 24 (60%) samples collected before HAART and for 13 (40%) samples after HAART. Sequence analyses did not show any drug resistance mutation, although the presence of some polymorphisms and accessory mutations has been verified.

Conclusions: These results suggest that HIV-1 viral load detection in plasma is an important predictor of HIV-1 viral load in the genital secretions. However, there may be excretion of HIV-1 in genital secretions, even in the absence of detectable HIV-1 viral load in plasma. Some women had distinct viral load profiles and HIV polymorphisms in plasma and genital secretions, suggesting that the genital compartment may act as a reservoir for HIV-1 replication and differentiation.

Keywords: 1 . HIV. 2 . Viral Load. 3 . Pregnant. 4 . HAART. 5 . Vaginal Secretion. 6 . Antiretroviral resistance.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Estimativa do número de adultos e crianças vivendo com HIV/AIDS, 2009;	17
Figura 2	Municípios brasileiros com pelo menos um caso de AIDS identificado entre 1980 a 2009;	18
Figura 3	Razão de sexo (M: F) dos casos de AIDS segundo o ano de diagnóstico;	20
Figura 4	Porcentagem de mulheres grávidas vivendo com HIV no mundo e recém-nascidos expostos que receberam a terapia antirretroviral para prevenção da transmissão vertical, 2004-2009;	23
Figura 5	Fluxograma de seleção das gestantes para o estudo, com os motivos de exclusão de casos;	40
Figura 6	Representação dos resultados detectados no Nuclisens EasyQ Analyzer;	44
Figura 7	Foto do gel de agarose 1% com amostras de secreção amplificadas e purificadas;	47
Figura 8	Correlação da CV plasmática e genital das gestantes estudadas no momento pré- TARV (Log 10). Teste de <i>Spearman</i>	69
Figura 9	Correlação da CV plasmática e genital das gestantes estudadas no momento pós-TARV (Log 10). Teste de <i>Spearman</i>	70
Figura 10	Comparação da CV genital das gestantes antes e após a introdução da TARV. Os valores de carga viral estão expressos em logaritmo na base 10. Sem significância estatística no teste de Wilcoxon; $p= 0,42$;	71
Figura 11	Fluxograma de amplificação e genotipagem das amostras no momento pré-TARV. HGNI 2005-2008;	72
Figura 12	Análise das seqüências de nucleotídeos da região da polimerase do HIV representativas dos genomas dos subtipos B, F e do recombinante B/F , respectivamente. Avaliação por bootscanning através do site REGA HIV Subtyping Tool versão 2.0, com janelas de 400pb, movendo em passos de 50pb;	76
Figura 13	Análise filogenética do gene pol das amostras plasmáticas e genitais de HIV, no momento pré-TARV, demonstrando a concordância entre elas. O alinhamento foi realizado com amostras de referência do grupo M do HIV subtipo B e C e F1. As amostras genitais estão representadas com círculos em negrito, enquanto as plasmáticas estão com círculos vermelhos. A análise filogenética foi realizada através do método de <i>Neighbor joining</i> incluídas no pacote Mega 4.0;	77

- Figura 14 Análise filogenética do gene pol das amostras plasmáticas e genitais de HIV, no momento pós-TARV, demonstrando a concordância entre elas. O alinhamento foi realizado com amostras de referência do grupo M do HIV subtipo B e C e F1. As amostras genitais estão representadas com círculos em negrito, enquanto as plasmáticas estão com círculos vermelhos. A análise filogenética foi realizada através do método de Neighbor joining incluídas no pacote Mega 4.0; 78
- Figura 15 Alinhamento dos aminoácidos, correspondente à região da protease e transcriptase reversa do gene pol da amostra 57 nos compartimentos genital (PGS) e plasmático (PG) no momento de inclusão do estudo, onde se observa a possibilidade de compartimentalização, frente às diferenças de aminoácidos nas mesmas posições; 82
- Figura 16 Análise filogenética do fragmento de 1200pb, correspondente a região da polimerase de amostras plasmáticas e genitais de cinco gestantes HIV positivas, indicando os agrupamentos nos dois compartimentos. As seqüências foram alinhadas com seqüências de referencia obtidas do Banco de dados de Los Alamos, representando os subtipos do grupo M. Valores de bootstrap estão representados na figura 84
- Figura 17 Alinhamento dos aminoácidos, correspondente à região da transcriptase reversa do gene pol nos compartimentos genital (PGS) e plasmático (PG) em ambos os momentos do estudo, onde se observa a possibilidade de compartimentalização, frente às diferenças de aminoácidos nas mesmas posições; 86
- Figura 18 Prevalência de mutações acessórias e polimorfismos encontrados na região da protease do HIV para a população de mulheres analisadas; 89
- Figura 19 Prevalência de polimorfismos e mutações acessórias aos Inibidores da Transcriptase Reversa Nucleosídeos e Não – Nucleosídeos na população de mulheres analisadas. 90

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Quadro 1	Recomendações para início de terapia antirretroviral em gestantes;	31
Quadro 2	Esquemas preferenciais para terapia inicial;	32
Quadro 3	Drogas e combinações preferenciais e alternativas;	33
Quadro 4	Comparação das metodologias Utilizadas para Quantificação do RNA-HIV;	45
Quadro 5	Primers internos utilizados na reação de nested PCR para o fragmento do gene <i>pol</i> (fragmentos 1 e 2) correspondente às regiões da protease e da transcriptase reversa viral.	50
Tabela 1	Características sócio-demográficas das gestantes com HIV/AIDS no momento da inclusão no estudo (n=92);	57
Tabela 2	Características laboratoriais das gestantes estudadas na inclusão no estudo (N= 92) e após a interrupção de TARV (N=54) HGNI, 2005-2008	58
Tabela 3	Características gestacionais das mulheres estudadas. HGNI, 2005-2008;	60
Tabela 4	Distribuição das cargas virais detectáveis e indetectáveis no plasma e na secreção genital antes da introdução de TARV. HGNI, 2005-2008;	63
Tabela 5	Distribuição da CV plasmática e genital entre as faixas selecionadas;	63
Tabela 6	Distribuição da carga viral na secreção genital, de acordo com a carga viral plasmática, antes da introdução de TARV (N=74). HGNI, 2005 – 2008;	65
Tabela 7	Distribuição das cargas virais detectáveis e indetectáveis nos compartimentos plasmático e genital no momento pós-TARV;	66
Tabela 8	Freqüência da distribuição da carga viral plasmática genital entre as faixas selecionadas no momento pós-TARV;	67

Tabela 9	Distribuição da carga viral na secreção genital, de acordo com a carga viral plasmática, após a interrupção de TARV (N=36). HGNI, 2005-2008;	68
Tabela 10	Amplificação de cDNA HIV obtido para o fragmento do gene <i>pol</i> a partir de amostras de secreção genital de mulheres soropositivas para o HIV nos momentos pré-TARV (n=40) e pós-TARV (n= 34). HGNI, 2005-2008.	74

LISTA DE ABREVIATURAS

AIDS - Síndrome de imunodeficiência adquirida

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ARV - Antirretroviral

AZT - Zidovudina

bDNA - Branched-chain ácido desoxirribonucléico

CEP-IPEc – Comitê de ética em Pesquisa do Instituto de Pesquisa Evandro Chagas

CV – Carga Viral

DNA - Ácido desoxirribonucléico

DST - Doenças sexualmente transmissíveis

ELISA – Ensaio Imuno-enzimático

HGNI –Hospital Geral de Nova Iguaçu

HIV - Vírus da Imunodeficiência Humana

HXB2 - Isolado viral do HIV

INNTR - Inibidor não-nucleosídico da transcriptase reversa

INTR - Inibidor nucleosídico da transcriptase reversa

IP - Inibidor da protease

KCl – Cloreto de Potássio

NASBA - Nucleic acid sequenced based amplification

µg – Micrograma

µl- Microlitro

ml – Mililitros

M - Molar

OMS - Organização Mundial de Saúde

PACTG - Pediatric Aids Clinical Trials Group

PB - Pares de bases

PCR - Polymerase Chain Reaction

Pmol - Picomol

Pol - Gene que codifica as enzimas que participam na replicação viral

Pós-TARV – Momento pós-Terapia antirretroviral

PR – Protease

Pré – TARV – Memento pré Terapia antirretroviral

RNA - Ácido ribonucléico

RPM - Rotação por minuto

RT - Transcrição reversa

TARV - Terapia antirretroviral

TBE - Tampão Tris – Borato - EDTA

TCLE – Termo de Consentimento Livre Esclarecido

TR - Transcriptase Reversa ou Reverse Transcriptase

SUMÁRIO

1	REVISÃO DA LITERATURA	17
1.1	GESTAÇÃO E TRANSMISSÃO VERTICAL DO HIV	21
1.2	FATORES RESPONSÁVEIS PELA TRANSMISSÃO VERTICAL DO HIV	24
1.3	INFECÇÕES SEXUALMENTE TRANSMISSÍVEIS E OS NÍVEIS DE HIV NO TRATO GENITAL	25
1.4	TERAPIA ANTIRRETROVIRAL	26
1.5	RESISTÊNCIA PRIMÁRIA AOS ANTIRRETROVIRAIS	27
1.6	TERAPIA EM GESTANTES NO BRASIL	30
1.7	COMPARTIMENTALIZAÇÃO DO HIV	34
2	OBJETIVOS	36
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
3	METODOLOGIA	37
3.1	CASUÍSTICA	37
3.2	COLETA E PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS	41
3.3	DETERMINAÇÃO DO NÚMERO DE CÓPIAS DE RNA DO HIV NAS AMOSTRAS DE SECREÇÕES GENITAIS	41
3.3.1	Extração do RNA Viral	42
3.3.2	Amplificação e Detecção	43
3.4	GENOTIPAGEM DO HIV	46
3.4.1	Purificação e Quantificação do Produto de PCR	47
3.4.2	Reação de Seqüenciamento	47
3.4.3	Precipitação da reação de Seqüenciamento	48
3.4.4	Análise Molecular	48
3.5	RESGATE DAS AMOSTRAS QUE NÃO AMPLIFICARAM PELO KIT VIROSEQ	49
3.5.1	Purificação e Quantificação do Produto de PCR	50
3.5.2	Reação de Seqüenciamento	51
3.5.3	Precipitação da Reação de Seqüenciamento	51
3.5.4	Análise Molecular	52
3.6	DETERMINAÇÃO DO SUBTIPO VIRAL	52
3.7	DETERMINAÇÃO DAS MUTAÇÕES DE RESISTÊNCIA	53

3.8	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	53
3.8.1	Base de Dados	53
3.8.2	Análise Descritiva	54
3.8.3	Análise Comparativa do RNA do HIV no Plasma e na Secreção Genital	54
3.8.4	Análise Comparativa do RNA do HIV no plasma e na secreção Genital Entre as Amostras Obtidas Antes do Início de TARV e Após a Interrupção de TARV	55
4	RESULTADOS	56
4.1	CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO ESTUDADA	56
4.1.1	Características Sócio-demográficas	56
4.1.2	Análise dos Parâmetros Laboratoriais	58
4.2	COMPARAÇÃO ENTRE A CV NA SECREÇÃO GENITAL E NO PLASMA DAS GESTANTES ESTUDADAS NO MOMENTO PRÉ-TARV	62
4.3	COMPARAÇÃO ENTRE A CV NA SECREÇÃO GENITAL E NO PLASMA DAS GESTANTES ESTUDADAS NO MOMENTO PÓS-TARV	66
4.4	CORRELAÇÃO ENTRE AS CVs PLASMÁTICA E GENITAL ANTES DA INTRODUÇÃO DA TARV E APÓS A INTERRUPTÃO	69
4.5	COMPARAÇÃO DA CV NO COMPARTIMENTO GENITAL NOS MOMENTOS PRÉ E PÓS-TARV	70
4.6	VERIFICAÇÃO DA PRESENÇA DE MUTAÇÕES DE RESISTÊNCIA DO HIV AOS ANTIRRETROVIRAIS NA SECREÇÃO GENITAL	71
4.6.1	Determinação do Subtipo Viral	74
4.6.2	Análise de resistência primária	79
4.6.3	Genotipagem da Região da Protease e Transcriptase Reversa nas Secreções Genitais	87
5	DISCUSSÃO	91
6	CONCLUSÃO	101
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	103

1 REVISÃO DA LITERATURA

A epidemia do HIV, quase três décadas após a identificação do vírus, se mantém como um dos maiores problemas de saúde pública global. Segundo a UNAIDS, a epidemia da Aids parou de avançar em pelo menos 56 países e a taxa de novas infecções pelo HIV parece ter se estabilizado. Há um declínio de quase 20% no número de novas infecções nos últimos 10 anos, os óbitos relacionados à AIDS diminuíram em quase 20% nos últimos cinco anos e o número total de pessoas vivendo com HIV tende a uma estabilização. Entretanto, o número de pessoas infectadas pelo HIV é ainda muito alto, chegando a aproximadamente 2,6 milhões [2,3–2,8 milhões] somente em 2009 e 1,8 milhões [1,6–2,1 milhões] de pessoas morreram de doenças relacionadas à Aids. Até o final de 2009 havia 33,3 milhões [31,4–35,3 milhões] de pessoas vivendo com o vírus em todo o mundo. A Figura 1 apresenta a estimativa da UNAIDS do número de pessoas vivendo com HIV/AIDS no mundo, atualizada até o ano de 2009.

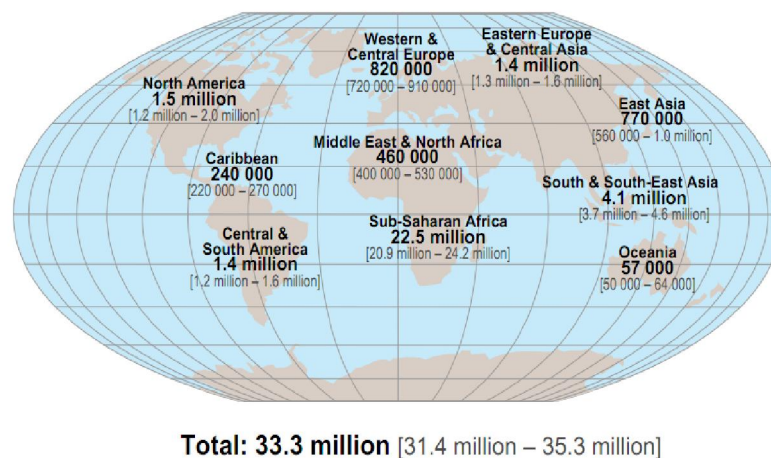


Figura 1: Estimativa do número de adultos e crianças vivendo com HIV/Aids, 2009. Fonte: UNAIDS

Segundo dados do Programa de IST/Aids do Ministério da Saúde, no Brasil, estima-se que cerca de 630 mil pessoas estejam infectadas pelo HIV. Apenas no ano de 2009, 38.538 novos casos foram notificados. Entre os anos de 1980 e 2009, 592.914 casos de Aids foram registrados e houve 229.222 mortes decorrentes da doença e suas co-infecções. A Figura 2 mostra a evolução da doença no território nacional ao longo do tempo (1980 a 2009), com base na análise dos municípios com pelo menos um caso notificado de Aids, evidenciando uma nítida distribuição inicial nas cidades de maior população localizadas na costa e migrando para o interior do país ao longo do tempo, cobrindo, hoje, praticamente todo o território nacional, evidenciando uma interiorização da epidemia (Ministério da Saúde, Boletim Epidemiológico, 2010).

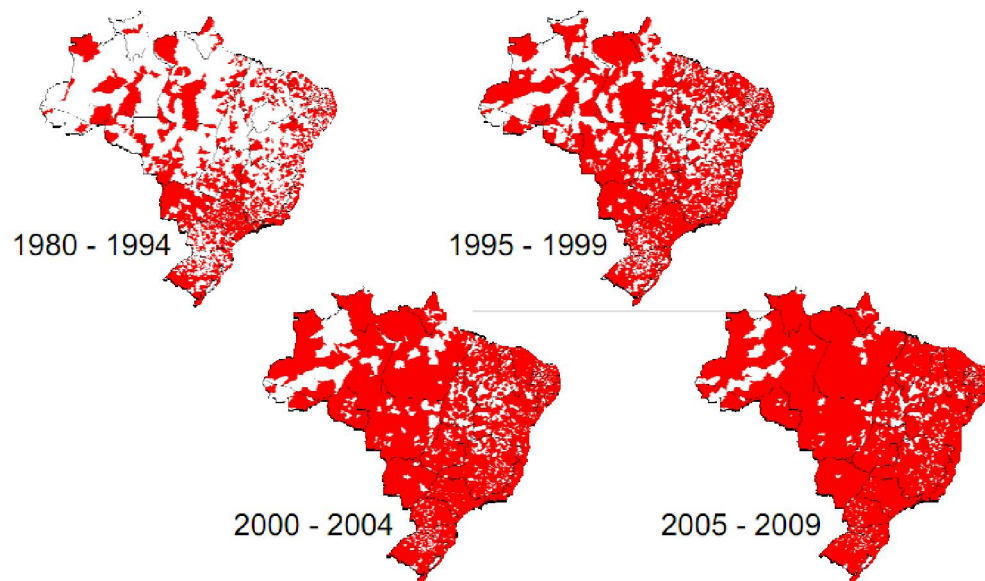


Figura 2: Municípios brasileiros com pelo menos um caso de AIDS identificado entre 1980 a 2009.

Fonte: MS/SVS/Departamento de IST, Aids e Hepatites Virais.

O HIV se divide em dois tipos: HIV-1 e HIV-2. O HIV-1 é classificado em três grupos M, O e N, e mais recentemente foi identificado o grupo P (Plantier *et al.*, 2009). O grupo M, responsável pela maioria dos casos, é dividido em diferentes subtipos: A-D, F-H, J e K e quatro sub-subtipos: F1 e F2; A1 e A2. A recombinação entre os subtipos do grupo M gerou múltiplas formas recombinantes circulantes (CRFs) (Perrin L; Kaiser L; Yerly S, 2003) e também as formas recombinantes únicas (URFs) (Lal *et al.*, 2005).

A epidemia de AIDS no Brasil é causada por vários subtipos do grupo M, os mais prevalentes são o B, C, F, além de casos isolados de infecções com os subtipos D e A, e também uma crescente proporção de formas recombinantes circulantes (CRF) CRF02_AG, CRF28_BF, CRF29_BF, CRF31_BC, CRF39_BF e CRF40_BF, além de formas circulantes únicas B/F, B/C (Morgado *et al.*, 1994; Bello *et al.*, 2007; Guimarães *et al.*, 2008; Morgado *et al.*, 2008).

Após a introdução da política de acesso universal ao tratamento antirretroviral (ARV), que combina drogas com diferentes alvos no genoma viral e modo de ação, foi observado uma importante queda na mortalidade e na morbidade associadas ao HIV/Aids (Ministério da Saúde, Boletim Epidemiológico, 2010).

A relação heterossexual é, atualmente, uma das formas mais importantes da transmissão do HIV/Aids. O número de mulheres em idade fértil infectadas pelo HIV no Brasil representou 86% dos casos de Aids na população feminina no período de 1980 a 2009. Dessa forma, a incidência de gestantes soropositivas vem aumentando significativamente (Ministério da Saúde, Boletim Epidemiológico, 2010).

Foram notificados no Brasil, entre os anos de 2000 e 2009, 54.218 casos de infecção pelo HIV em gestantes, dos quais 40.999 (75,6%) se concentram nas Regiões Sul e Sudeste. Em 2009, o número de casos de gestantes infectadas no país foi de 6.104 e a taxa de detecção correspondeu a 2,1 casos por 1.000 bebês

nascidos vivos. O maior número de gestantes infectadas pelo HIV está concentrado na faixa etária de 20 a 29 anos, entre 4 e 11 anos de estudo e de raça/cor branca e parda. Embora, no geral, o número de casos no sexo masculino seja um pouco mais elevado do que no sexo feminino, a tendência de crescimento dos casos nas mulheres vem sendo mais rápida. Na faixa etária de 13 a 19 anos o número de casos de AIDS é maior entre as meninas e essa inversão é observada desde 1998, quando a proporção era de 8:1 (Figura 3) (Ministério da Saúde, Boletim Epidemiológico, 2010). Esse fenômeno, denominado de "feminização" da epidemia, é acompanhado por um número cada vez maior de crianças expostas ao vírus durante a gravidez, o parto e amamentação (Szwarcwald *et al.*, 2000).

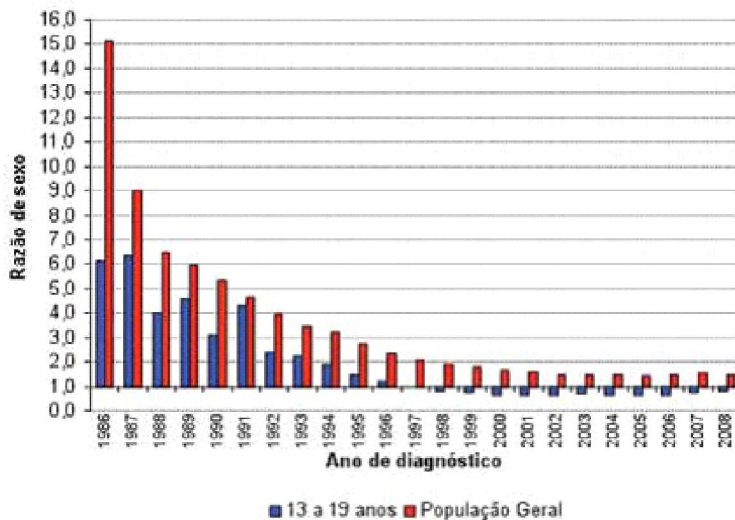


Figura 3: Razão de sexo (M: F) dos casos de Aids (1) segundo o ano de diagnóstico. Brasil, 1986 a 2008. FONTE: MS/SVS/Departamento de IST/Aids e Hepatites Virais. **NOTA:** (1) Casos notificados no SINAN e registrados no SISCEL/SICLOM até 30/06/2009 e SIM de 2000 a 2008. Dados preliminares para os últimos cinco anos.

São vários os fatores que influenciam a probabilidade de transmissão sexual do HIV, um deles é o tamanho do inóculo, ou seja, a concentração do HIV nas secreções genitais (Vergara *et al.*, 2006). No trato genital masculino, o HIV pode ser

detectado no sêmen e no líquido pré-ejaculatório de pacientes em todos os estágios da infecção e a CV neste compartimento parece elevar-se com a progressão da doença (Pudney *et al.*, 1992). No trato genital feminino o HIV pode ser detectado no fluido endocervical e no lavado cérvico-vaginal (Coombs *et al.*, 2001). A gravidez é outro fator associado ao aumento da concentração de HIV no trato genital feminino (Vergara *et al.*, 2006). Um fator que também se relaciona com a probabilidade da transmissão sexual é o nível da CV plasmática do HIV (Attia *et al.*, 2009). A CV elevada e a ruptura prolongada das membranas amnióticas são reconhecidas como os principais fatores associados à transmissão vertical do HIV (Thea *et al.*, 1997). A CV nas secreções cérvico-vaginais e no leite materno tem-se mostrado um fator determinante no risco de transmissão intra-parto e pela amamentação (Chuachoowong *et al.*, 2000), assim como o estado imunológico da gestante, o fitness viral, e a via de parto (Bongertz, 2001).

1.1 GESTAÇÃO E TRANSMISSÃO VERTICAL DO HIV

Dados da UNICEF (2010) mostram que em 2007, cerca de 2,1 milhões de crianças com idade inferior a 15 anos viviam com HIV no mundo. Estas foram infectadas por transmissão vertical, durante a gestação, no parto ou enquanto eram amamentadas. Neste mesmo ano, cerca de 40% das novas infecções pelo HIV em pessoas acima de 15 anos, encontrava-se entre jovens de 15 a 24 anos.

Em uma metanálise que reuniu 15 estudos prospectivos de coortes conduzido na Europa e EUA, observou-se que o risco de transmissão vertical foi

significativamente menor nas gestantes soropositivas que realizaram cesarianas antes do início do trabalho de parto ou da ruptura prematura das membranas amnióticas, e esta associação permaneceu mesmo após ajuste de co-variáveis como o uso de TARV (Read *et al.*, 1999).

Alguns estudos evidenciaram que a administração da monoterapia com Zidovudina (AZT) foi capaz de reduzir a transmissão vertical, pois diminuiu os níveis de CV apresentados pelas mães (Sperling *et al.*, 1996; Newell *et al.*, 1997). Por sua vez, Murthy & Krishnamurthy em 2011 sugeriram que a Nevirapina em dose única é eficaz como profilaxia para a transmissão vertical. Contudo, a prescrição da TARV associada promove uma maior redução na CV materna e, por isso, é mais eficaz na prevenção da transmissão do HIV de mãe para o filho (Bulterys & Lepage, 1998; Chasela *et al.*, 2010). A Figura 4 mostra dados mundiais revelando que o incremento do uso de TARV ao longo do tempo tem como consequência o impacto na redução da transmissão vertical.

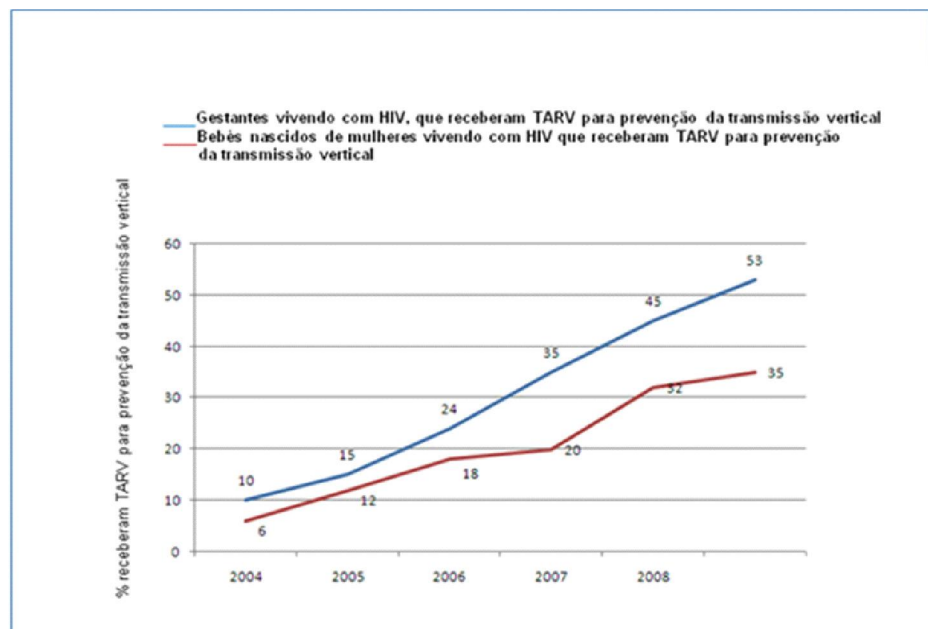


Figura 4: Porcentagem de mulheres grávidas vivendo com HIV no mundo e recém-nascidos expostos que receberam a terapia antirretroviral para prevenção da transmissão vertical, 2004-2009. **Adaptado de:** OMS, ONUSIDA e UNICEF, Rumo ao acesso universal: Expansão das intervenções prioritárias HIV / AIDS no setor da saúde, Genebra, 2010.

Segundo o Ministério da Saúde, a transmissão vertical é a principal causa de infecção pelo HIV em crianças abaixo de 15 anos no Brasil (Ministério da Saúde, Boletim Epidemiológico, 2008). Até 1994, quando nenhuma medida profilática era tomada, transmissão vertical do HIV alcançava níveis de 12% a 42%. No entanto, após a introdução dos esquemas terapêuticos para a quimioprofilaxia, esses níveis recuaram para 1% (Read *et al.*, 1999).

O aconselhamento e a realização do teste anti-HIV no pré-natal são fundamentais, pois asseguram à mulher o direito à informação e a receber profilaxia antirretroviral, evitando a transmissão do vírus para o bebê na maioria dos casos (Câmara & Oliveira, 2004; Nigatu & Woldegebriel, 2011).

1.2 FATORES RESPONSÁVEIS PELA TRANSMISSÃO VERTICAL DO HIV

Em grande parte dos casos (65%) a transmissão vertical do HIV ocorre durante o trabalho de parto ou no parto em si. Os outros 35% ocorre intra-útero, principalmente nas últimas semanas de gestação (Ministério da Saúde, Boletim Epidemiológico, 2010).

Duarte e cols, em uma revisão publicada em 2005, listaram os principais fatores associados ao aumento do risco da transmissão do HIV de mãe para filho, entre eles estão os fatores maternos: quantidade elevada de vírus no sangue durante a gestação e no momento do parto, seja por estar na fase aguda da doença, não adesão ao tratamento, falta de acesso a TARV e ao pré-natal, desconhecimento

da infecção por falta de testagem tanto no pré-natal quanto no momento do parto, CV vaginal elevada no momento do parto, presença de alguma doença correlacionada que diminua a imunidade materna ou co-infecções; fatores virais: genótipo, fenotipo viral e diversidade viral circulante, resistência viral; via de parto: condições das membranas amnióticas e tempo de ruptura, hemorragia intraparto, uso de procedimentos invasivos; fatores comportamentais: prática sexual desprotegida uso de drogas; fatores fetais: susceptibilidade genética, expressão dos receptores secundários para o HIV, função reduzida dos linfócitos T-citotóxicos, prematuridade; e os fatores pós-natais : amamentação, CV elevada no leite materno, baixa concentração de anticorpos no leite materno, mastite clinica e lesões mamilares. No seu conjunto, estes dados apontam que a transmissão vertical do HIV é multifatorial.

1.3 IMUNIDADE DA MUCOSA GENITAL FEMININA E INFECÇÕES SEXUALMENTE TRANSMISSÍVEIS

As mulheres possuem um risco maior de contrair o HIV pela relação sexual do que os homens isso é devido à mucosa do trato genital feminino que é o local de entrada dos principais microrganismos patogênicos de transmissão sexual. A mucosa genital feminina é considerada parte do sistema imunológico da mucosa comum, que inclui as vias respiratórias e intestinais (Johansson *et al.*, 1999). Porém, o sistema imune da mucosa genital se diferencia dos outros tipos de sistema imune de mucosa devido à presença de células especializadas neste epitélio aos folículos linfóides e ao padrão diferenciado de células e imunoglobulinas além do

fato dos hormônios sexuais intervirem nas suas características imunológicas, o que ajuda na sua diferenciação em relação aos demais (Pudney *et al.*, 2005).

Além das células epiteliais, outras células do sistema imune, que também estão presentes no trato genital, como as células dendríticas, os linfócitos, os neutrófilos e macrófagos, em resposta ao estímulo antigênico, aumentam a secreção de citocinas e quimiocinas (Prakash *et al.*, 2001). Além disso, Jaspán e colaboradores (2011) relatam que a alta frequência de células T ativadas na mucosa genital feminina durante a infecção pelo HIV facilita tanto a excreção de HIV local quanto a diminuição das células CD4.

A resposta imune exercida pelas células especializadas deste epitélio talvez seja um dos principais meios de proteção da mucosa genital frente ao desenvolvimento da resposta imune local. Estas células exercem um papel importante na indução de resposta imune no trato genital feminino (Quayle, 2002). Elas recobrem as superfícies mucosas e não atuam apenas como barreira física, mas também participam ativamente da secreção de substâncias antimicrobianas.

A imunidade sistêmica, segundo Johansson & Lycke (2003), possui papel fundamental no sistema imune da mucosa vaginal, pois uma quantidade considerável da IgG e IgA presentes não é produzida nesse local.

Nonhlanhla e colaboradores em 2010 concluíram que a infecção pelo HIV também está associada com maiores concentrações de IL-6, IL-1 β e IL-8 no trato genital feminino.

Alguns estudos demonstram que as infecções sexualmente transmissíveis (IST) atuam como cofatores na transmissão sexual do HIV e que indivíduos com IST são mais susceptíveis à infecção pelo HIV do que indivíduos que não apresentam estas doenças (Wasserheit *et al.*, 1992, Fleming *et al.*, 1999, Rothenberg *et al.*,

2000). Além disso, indivíduos coinfectados pelo HIV e por outras IST oferecem maior risco de transmitir o HIV sexualmente do que pacientes não coinfectados (Deschamps *et al.*, 1996).

A ativação imune, desencadeada pela presença de possíveis ISTs, pode estimular a excreção do HIV na secreção vaginal e, possivelmente, influenciar a fisiologia local (Zara *et al.*, 2004). A introdução de TARV causa uma redução na replicação do HIV.

1.4 TERAPIA ANTIRRETROVIRAL

A TARV tem fundamental importância na mudança do panorama da infecção pelo HIV, pois, a partir de sua introdução houve uma considerável redução na mortalidade e morbidade na transmissão vertical, além de grande aumento na qualidade de vida aos portadores do vírus.

Os antirretrovirais têm como principal finalidade adiar a progressão para a Aids, suprimindo a replicação viral e restabelecendo a atividade imune, prolongando, assim, a vida das pessoas soropositivas (Ministério da Saúde, Boletim Epidemiológico, 2008).

O tratamento da infecção pelo HIV utiliza a combinação de pelo menos três drogas de duas diferentes classes de antirretrovirais (Consenso Brasileiro para Terapia Antiretroviral, 2008). Esses medicamentos impedem a replicação do vírus, revertendo quadros clínicos sintomáticos e o estado de imunossupressão observados em pacientes com Aids, ou sintomáticos (Marins *et al.*, 2003). Os indivíduos sintomáticos são aqueles que apresentam sinais clínicos e laboratoriais indicativos para o diagnóstico de Aids especificados nas Recomendações para TARV em Adultos e Adolescentes Infectados pelo HIV (Ministério da Saúde, 2008).

O Ministério da Saúde indica ainda o início de TARV para os pacientes que não apresentam sintomas (ou assintomáticos), mas com contagem de TCD4+ entre 200 e 350 células/mm³ (Ministério da Saúde, 2010). Nos indivíduos assintomáticos, a TARV atua impedindo a progressão para a Aids, aumentando a longevidade e qualidade de vida destes indivíduos (Marins *et al.*, 2003).

Estudos recentes têm mostrado que a absorção dos antirretrovirais no trato genital varia de acordo com a classe e que a TARV diminui significativamente os níveis de HIV neste compartimento (Anderson e Uvin, 2009; Weinberg *et al.*, 2011).

1.5 RESISTÊNCIA PRIMÁRIA AOS ANTIRRETROVIRAIS

As análises genotípicas do HIV mostram mudanças de nucleotídeos, chamadas mutações, que podem ser silenciosas ou levar à mudança de aminoácidos, gerando polimorfismos que podem ou não estar associados à resistência às drogas antirretrovirais. As mutações nas regiões da Transcriptase Reversa e da Protease podem implicar na emergência de resistência, respectivamente, aos inibidores da Transcriptase Reversa nucleosídicos (ITRN), inibidores da Transcriptase Reversa não-nucleosídicos (ITRNN) e inibidores da Protease (IP). A diversidade genética é a grande chave do mecanismo de escape viral, propiciando resistência aos antirretrovirais (Diaz *et al.*, 2004).

A resistência viral aos ARV subdivide-se em primária ou secundária. A resistência primária aos ARV, ou resistência transmitida, apresenta-se em pacientes virgens de tratamento e acredita-se que haja um possível impacto na resposta ao primeiro esquema antirretroviral, e por isso é objeto de estudo em vários países (Deeks *et al.*, 2008).

A resistência secundária é definida como a mutação de resistência aos antirretrovirais que é desenvolvida em decorrência da pressão seletiva exercida pelos antirretrovirais sobre o vírus. O desenvolvimento de estirpes resistentes aos anti-retrovirais é devido a não supressão viral pela droga (Shafer *et al.*, 2002). O uso expandido de antirretrovirais na terapia anti-HIV/Aids tem levado a uma tendência de aumento dos níveis de resistência primária ao longo do tempo. A resistência primária, ou transmitida, é a resistência às drogas detectadas em pacientes virgens de tratamento antirretroviral. Normalmente, a resistência primária está associada à transmissão de cepas de HIV com mutações de resistência e implica a possibilidade de uma menor eficácia por ocasião do tratamento. A resistência secundária é a resistência aos antirretrovirais decorrentes da pressão seletiva exercida pelas drogas, são todas aquelas mutações que emergem decorrente da falha ao tratamento em suprimir a replicação do HIV (HIV Medicine, 2005).

No Brasil, diversos estudos têm apontado para um aumento da resistência primária do HIV em diferentes cenários. Assim, 6,5% de resistência primária foi verificado entre doadores de sangue atendidos no Hemocentro de São Paulo entre 1998 e 2002 (Barreto *et al.*, 2006). Resultados similares (6,5%) foram verificados por Gonzalez e cols (2007) entre doadores de sangue e indivíduos com diagnóstico recente de infecção pelo HIV na cidade de São Paulo. Já Brindeiro e cols (2003), em um estudo nacional com amostras coletadas entre 2001 e 2002 em diferentes Centros de Testagem e Aconselhamento (CTAs), localizados em diversas capitais brasileiras, observaram uma prevalência de resistência primária de 2,36% e 2,06% para os ITRN e ITRNN e de 2,24% para os IP. Ainda com base na análise de amostras coletadas nos CTAs, Velasco-de-Castro (2006) verificou 5.2% para IP, 15.5% para ITRN e 6.9% para ITRNN em soroconvertores recentes no Rio de Janeiro.

Níveis elevados de resistência primária foram também verificados por Sucupira e cols (2006) entre soroconvertores recentes (36,8%) e soroconvertores de longo termo (25%) na cidade de Santos, SP, que apresenta uma alta prevalência de usuários de drogas, o que poderia explicar estes valores tão elevados. Já Inocêncio e colaboradores descreveram níveis intermediários de resistência (5 a 15%) na rede de vigilância de resistência ao HIV, em quatro grandes cidades brasileiras, Rio de Janeiro, São Paulo, Belém e Brasília. Faz-se importante salientar que a resistência primária está intimamente associada à localidade pesquisada e às peculiaridades relacionadas ao uso de terapia antirretroviral, sendo difícil fazer generalizações muito amplas. Além disso, o uso de algoritmos de análise distintos limita, em certa medida, a comparação dos resultados descritos para o país e o exterior.

Em um estudo realizado por nosso grupo (Pilotto e cols., 2011 *submetido à publicação*), foi verificada uma prevalência global de 11,3% (14/123) de resistência primária em gestantes soropositivas para o HIV, virgens de tratamento antirretroviral, que iniciaram a TARV como quimioprofilaxia para prevenção da transmissão vertical no período de 2005 a 2008; população objeto do nosso estudo.

É importante ressaltar que existem poucos dados nacionais sobre a identificação e comparação do perfil de resistência aos antirretrovirais na secreção genital e plasmática de mulheres submetidas a quimioprofilaxia com antirretrovirais para prevenção da transmissão vertical do HIV.

1.6 TERAPIA EM GESTANTES NO BRASIL

De acordo com as recomendações para profilaxia da transmissão vertical do HIV do Ministério da Saúde de 2010, têm indicação de tratamento antirretroviral

todas as gestantes que apresentam contagens de células TCD4+ entre 200 e 350 células/mm³ independentemente da idade gestacional.

A indicação de TARV na gestação pode ter dois objetivos: profilaxia da transmissão vertical ou tratamento da infecção pelo HIV (Ministério da Saúde, 2010).

A quimioprofilaxia da transmissão vertical do HIV visa à prevenção da transmissão vertical e é recomendada para gestantes que não possuem indicação de tratamento da infecção pelo HIV. Por isso, o tratamento deve ser iniciado após o primeiro trimestre, devido à teratogênese de alguns medicamentos e deve ser suspenso após o parto (Chersich, *et al.*, 2008).

O Quadro 1 demonstra as recomendações para o início da terapia antirretroviral em gestantes.

Quadro 1: Recomendações para início de terapia antirretroviral em gestantes

Idade gestacional	Status clínico laboratorial da gestante	Conduta
Após a 28ª semana de gestação	Assintomática, sem contagem de Linfócitos TCD4+ disponível	Coletar sangue para contagem de Linfócitos T-TCD4+ e CV, iniciar imediatamente a profilaxia com TARV combinada (associação de três ARV) independentemente do resultado de LTCD4+ e CV
Entre a 14ª e a 28ª semana de gestação	Assintomática, com contagem de LT-TCD4+ ≥ 350 céls./mm ³	Profilaxia com TARV combinada (associação de três ARV)
< 14 semanas e contagem de LTCD4+ próxima a 350 céls./mm³	Assintomática, com contagem de LTCD4+ entre 200 e 350 céls./mm ³	Recomendar tratamento* após a 14ª semana de gestação
< 14 semanas e contagem de LTCD4+ próximo a 200 céls./mm³	Assintomática, com contagem de LTCD4+ entre 200 e 350 céls./mm ³	Tratar
Independentemente da IG	Assintomática, com	Tratar + quimioprofilaxia para IO

	LTCD4+ <200 céls./mm ³	
Independentemente da IG	Sintomática**	Tratar + quimioprofilaxia primária para para IO

Legenda: CV = Carga Viral; LT = linfócitos T; IG = idade gestacional

* Considerar os sintomas associados à infecção pelo HIV, mesmo não definidores de AIDS. Fonte: Recomendações para profilaxia da transmissão vertical do HIV e terapia antirretroviral em gestantes, 2010

Quadro 2: Esquemas preferenciais para terapia inicial

Preferencial	2 ITRN + IP/r
Alternativo	2 ITRN + ITRNN

Fonte: Recomendações para profilaxia da transmissão vertical do HIV e terapia antirretroviral em gestantes; MS, 2010.

Alguns autores sugerem o parto vaginal ou normal como mais seguro para gestantes, o que diminuiria a morbidade relatada em cesarianas eletivas. Estudos demonstram uma forte correlação entre a CV plasmática e a CV genital, sendo a CV plasmática o principal indicador para a escolha da via de parto (Islam *et al.*, 2010; Boer *et al.*, 2007). Entretanto, o HIV pode ser detectado no trato genital de mulheres com CV plasmática abaixo de 500 cópias / ml (Dornadula *et al.*, 1999), assim como tem-se detectado viremia residual no trato genital entre os pacientes em TARV (Neely *et al.*, 2007; Pasquier *et al.*, 2008), sugerindo que a replicação viral no trato genital e no sangue podem ser divergentes (Fiore *et al.*, 2003; Craigo *et al.*, 2004; Sullivan *et al.*, 2005;).

Um estudo longitudinal, conduzido por Cu-Uvin e colaboradores (2006), concluiu que o HIV pode ser detectado no trato genital de mulheres que recebem TARV mesmo quando a CV plasmática é indetectável (Cu-Uvin *et al.*, 2006). Em um estudo transversal anterior a este, Kovacs e colaboradores em 2001, também

encontraram HIV no trato genital em mais da metade das mulheres recrutadas para o estudo. Outro grupo (Neely *et al.*, 2007) encontrou CV detectável no trato genital em 15% das mulheres estudadas. Estes resultados apontam para o baixo, porém, não inexistente risco de transmissão sexual e vertical (pelo parto normal) do HIV em mulheres com uma CV plasmática bem controlada (Strumer *et al.*, 2008; Cu-Uvin *et al.*, 2010). Essas observações demonstram a compartimentalização viral no trato genital e no sangue (Kovacs *et al.*, 2001; Neely *et al.*, 2007; Andreoletti *et al.*, 2007).

Quadro 3: Drogas e combinações preferenciais e alternativas

Grupo farmacológico	1ª Escolha	2ª Escolha
2 ITRN	AZT+3TC	ddI EC +3TC ou d4T + 3TC
ITRNN	NVP ⁽²⁾	
IP	LPV/r	SQV/r ⁽¹⁾
<p>Abreviaturas:</p> <p>ITRN = inibidor da transcriptase reversa análogo de nucleosídeo ou nucleotídeo AZT = zidovudina; ddI EC = didanosina entérica; 3TC = lamivudina; d4T = estavudina ITRNN = inibidor da transcriptase reversa não-análogo de nucleosídeo NVP = nevirapina IP = inibidor da protease; r = ritonavir como adjuvante farmacológico; LPV = lopinavir; SQV = saquinavir</p> <p>⁽¹⁾ A adesão pode ser comprometida em razão da maior possibilidade de ocorrerem efeitos colaterais.</p> <p>⁽²⁾ A NVP deve ser usada com cautela em mulheres com LTCD4+ ≥ 250 céls./mm³ devido ao risco elevado de hepatotoxicidade.</p>		

Fonte: Recomendações para profilaxia da transmissão vertical do HIV e terapia antirretroviral em gestantes; MS, 2010.

1.7 COMPARTIMENTALIZAÇÃO DO HIV

A compartimentalização do HIV é entendida como sendo a não uniformidade do vírus em diferentes sítios do organismo (Delwart *et al.*, 1998) e é baseada em níveis diferenciados de CV, ocorrência de variantes resistentes distintas, a diversidade viral (Anderson e Uvin, 2008). A população viral pode ser significativamente distinta nos diversos compartimentos (Ellerbroc *et al.*, 2001) e cada local pode abrigar subpopulações virais com características genéticas diferentes em um mesmo indivíduo (Kemal *et al.*, 2003). Vários mecanismos e fatores podem contribuir para esse fenômeno.

Philpott e colaboradores (2005) sugeriram que o sistema imune perde o controle da replicação do HIV e a capacidade de influenciar o desenvolvimento de estirpes virais em diferentes compartimentos após a infecção aguda, o que permitiria a combinação das quasispecies virais.

Fatores imunológicos podem interferir diretamente na replicação do HIV nos seus distintos sítios anatômicos, o que pode desencadear cargas virais diferentes nos diferentes compartimentos (Fiore *et al.*, 2002).

Além disso, a administração dos esquemas antirretrovirais pode contribuir para a ocorrência do fenômeno da compartimentalização, ao exercer grande supressão na replicação viral de forma diferenciada nos diversos compartimentos, isto se deve à diferença na dinâmica de absorção e armazenamento da droga nesses locais (Fiore *et al.*, 2003).

Vários estudos confirmam a ocorrência do fenômeno de compartimentalização no trato genital masculino e feminino. Neste último, além de aumentar a possibilidade de transmissão heterossexual, contribui para o aumento da

probabilidade de transmissão vertical (Cu-Uvin *et al.*, 2010). Em 2008, Campos e colaboradores demonstraram que a TARV diminui a excreção genital do HIV, porém demonstra que houve a compartimentalização em um único caso. Assim como Campos, Kovacs em 2001 sugeriu que na presença de TARV há uma redução considerável na CV plasmática e genital, porém, em algumas mulheres o compartimento genital se apresenta como reservatório para o vírus, pois nestas, continua havendo excreção genital do HIV, ainda que a quantificação viral no plasma esteja indetectável. Corroborando com estes dados, Cu-Uvin e colaboradores em 2010 evidenciaram uma prevalência de 37% de mulheres com CV detectável na secreção genital e indetectável no plasma na sua população de estudo. Este mesmo grupo em 2006, já havia comprovado discordância na CV vaginal e plasmática, assim como Fiore em 2003 que identificou uma prevalência de 25% de mulheres que excretavam HIV nas secreções genitais sendo estas, virgens de tratamento. Em 2004, Tirado e colaboradores descreveram a compartimentalização do HIV ao evidenciarem a presença de variantes virais com mutações de resistência aos antiretrovirais no sítio genital feminino, diferentemente do plasma.

Embora os estudos evidenciem que a CV no trato genital geralmente é correspondente a CV plasmática (Fiore *et al.*, 2003; Vettore *et al.*, 2005; Kelley *et al.*, 2010), há evidências de compartimentalização entre o plasma e o trato genital (Kelley *et al.*, 2010). Conseqüentemente, a terapia antirretroviral pode nem sempre diminuir a níveis indetectáveis a CV no trato genital feminino, mesmo na ausência de uma co-infecção, como uma infecção sexualmente transmissível (IST).

2 OBJETIVO GERAL

Realizar a análise do perfil de carga viral e de resistência genotípica do HIV-1 em secreções genitais de gestantes submetidas à quimioprofilaxia para prevenção da transmissão vertical

2.1 Objetivos Específicos:

- Comparar os níveis de CV plasmática e vaginal no momento de entrada da gestante (pré-TARV) na coorte e após o parto e interrupção de TARV (pós-TARV);
- Analisar a possibilidade de compartimentalização do HIV no plasma e nas secreções genitais, entre as amostras obtidas de gestantes antes do início de TARV e após a sua interrupção (no momento do parto);
- Avaliar o perfil de resistência primária aos antirretrovirais na população de gestantes positivas para a infecção pelo HIV no compartimento genital em comparação com o plasma;
- Avaliar o perfil de polimorfismos e de mutações de resistência desenvolvidas aos inibidores da transcriptase reversa e protease detectadas após o início da terapia antirretroviral no compartimento genital em comparação com o plasma, na visita pré e pós-TARV.

3.0 METODOLOGIA

3.1 CASUÍSTICA

O presente trabalho é uma parte do projeto intitulado “Perfil de resistência genotípica do HIV aos antirretrovirais em uma população de mulheres infectadas pelo HIV expostas a quimioprofilaxia com antirretrovirais para a prevenção da transmissão vertical do HIV durante a gestação”, para o qual foram analisadas, quanto à CV e a ocorrência de mutações de resistência à TARV, as secreções genitais de 92 gestantes soropositivas para o HIV, durante a gestação e no pós-parto, conforme detalhado a seguir, após breve descrição do projeto principal, que deu origem a casuística do presente estudo. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, CEP-IPEC, FIOCRUZ, sob o número: 049/2005.

Trata-se de um estudo observacional, de coorte, envolvendo gestantes infectadas pelo HIV em acompanhamento no ambulatório de pré-natal do Hospital Geral de Nova Iguaçu (HGNI/MS). As gestantes foram convidadas a participar do estudo e receberam um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) com informações gerais sobre os objetivos e procedimentos do estudo. Foram recrutadas para participação no projeto todas as gestantes com sorologia anti-HIV positiva, que buscaram acompanhamento pré-natal no Hospital Geral de Nova Iguaçu (HGNI/MS), no período compreendido entre maio de 2005 e dezembro de 2008. Uma vez definido o diagnóstico da infecção pelo HIV a TARV foi iniciada no início do estudo,

seguindo as diretrizes do Consenso Nacional para Tratamento ou Quimioprofilaxia da Transmissão Vertical do HIV, de acordo com o status imunológico da gestante. A terapia foi interrompida no momento do parto para aquelas que não tinham indicação clínico-laboratorial para manutenção do tratamento. As gestantes foram acompanhadas em visitas clínico-laboratoriais durante toda a gestação e nos seguintes momentos: duas semanas, quatro semanas, seis meses e um ano após a interrupção do tratamento.

Os resultados da contagem das células TCD4+/CD8, quantificação da CV plasmática e genotipagem do HIV no plasma já se encontravam disponíveis para as amostras das gestantes obtidas na inclusão do estudo, antes da introdução da terapia antirretroviral, e nas visitas de seguimento após o parto, até 6 meses (Pilotto, 2008 _ Tese de Doutorado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas, IPEC-FIOCRUZ; Pilotto *et al.*, 2011). Estes resultados serviram de base para comparação dos dados de CV e genotipagem do HIV nas secreções genitais das gestantes obtidas na primeira visita do pré-natal e nas amostras colhidas no pós-TARV.

Para a realização do presente estudo tivemos como foco a análise de secreções genitais obtidas a partir das gestantes selecionadas de acordo com os critérios de inclusão abaixo listados:

- Gestantes com idade igual ou maior que 16 anos;
- Gravidez confirmada através do β HCG na urina, e/ou ultra-sonografia;
- Evidência de infecção pelo HIV documentada por testes de anticorpos anti HIV 1/2 (ELISA), confirmada por imunofluorescência e/ou Western Blot;
- Gestantes virgens de terapia antirretroviral;

- Mulheres que desconheciam o seu status imunológico ou não apresentavam indicação clínica e/ou laboratorial de tratamento da infecção pelo HIV e que, portanto, interromperam a profilaxia antirretroviral após o parto;
- Mulheres com o colo do útero íntegro no momento da coleta da secreção genital no pós-parto;
- Ter assinado o TCLE (termo de consentimento livre e esclarecido).
- Ter amostras de secreção coletadas na entrada da coorte e em algum ponto após quatro semanas do pós-parto.

As amostras de sangue total e secreção do canal genital foram colhidas em cada visita. As amostras biológicas foram processadas e estocadas a – 86°C (Pilotto JH, 2008). A figura 5 apresenta um fluxograma do conjunto das coletas de amostras biológicas obtidas no estudo, com ênfase na coleta de secreções genitais para a presente análise.

Entre maio de 2005 e dezembro de 2008 um total de 274 gestantes, virgens de tratamento antirretroviral e que obedeciam aos critérios de inclusão, foram recrutadas para participar do projeto. Destas, apenas 142 possuíam amostras de secreção genital coletadas. Porém, 25 coletaram as amostras de secreção com uma distância maior do que 7 dias após a coleta da amostra de plasma. Sendo assim, 117 gestantes possuíam amostras com datas de coletas próximas, contudo, 25 delas não interromperam o tratamento após o parto, ou seja, possuíam indicações, segundo o consenso do Ministério da Saúde, para continuarem com TARV.

Foram incluídas nesta análise 92 gestantes que possuíam secreção vaginal coletada no momento de entrada no estudo (pré-TARV) e que estavam de acordo com todos os critérios de inclusão estabelecidos. No momento após a interrupção do tratamento (pós-TARV) foi possível a coleta de 43 amostras de secreção genital,

dentre as 92 mulheres, que estavam de acordo com os critérios de inclusão neste momento.

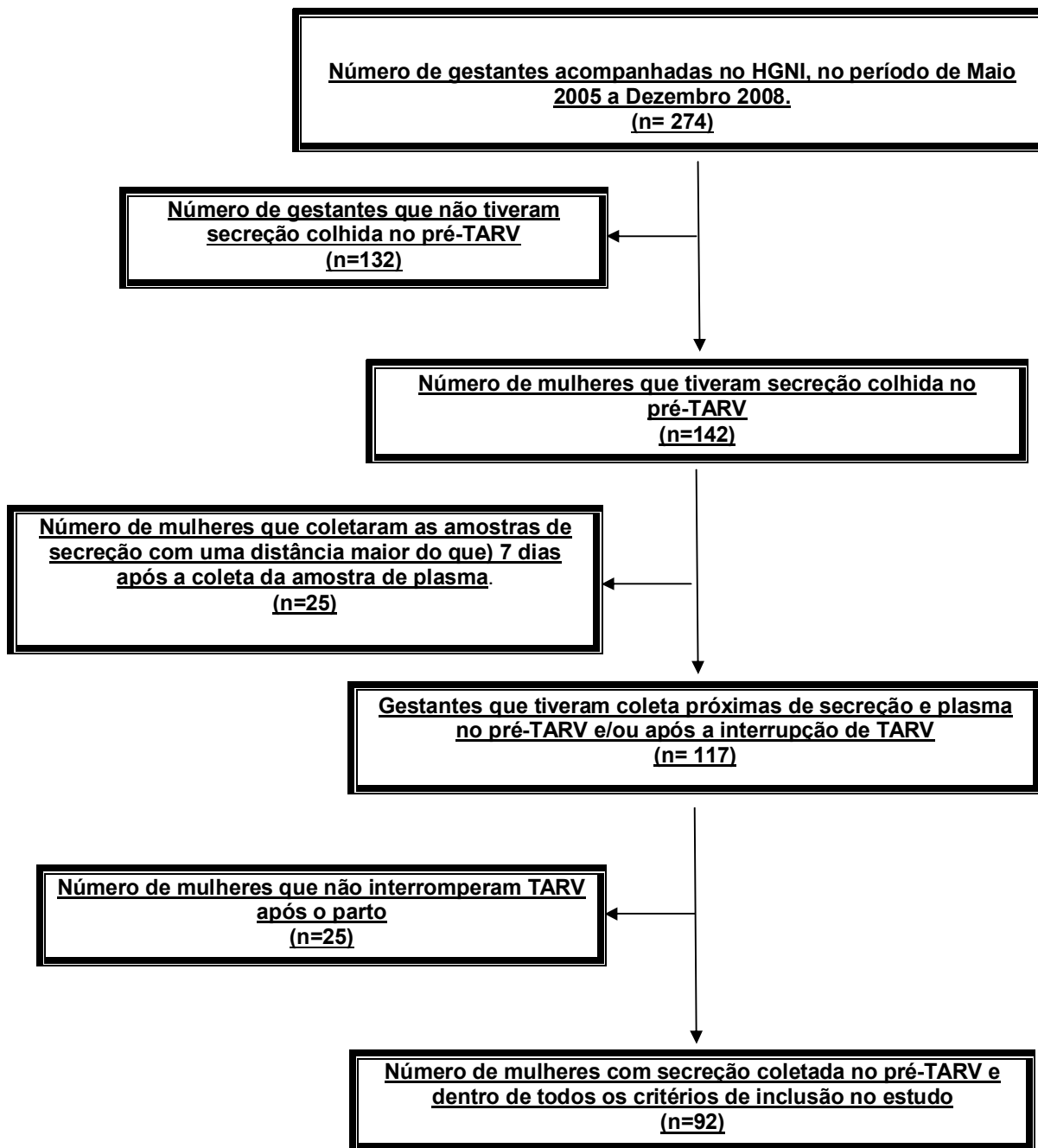


Figura 5: Fluxograma de seleção das gestantes para o estudo, com os motivos de exclusão de casos. Hospital Geral de Nova Iguaçu, HGNI, Rio de Janeiro 2005-2008.

3.2 COLETA DE SECREÇÃO VAGINAIS E PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS

As amostras de secreção genital das gestantes incluídas no estudo foram coletadas utilizando-se pares de fitas Tear-Flo™, gentilmente inseridas com o auxílio de uma pinça no canal vaginal de cada gestante, por aproximadamente um minuto, onde cada fita absorveu em média 15 µl de secreção. Em seguida, as fitas foram introduzidas em um tubo de poliestireno de 1,5ml contendo tampão de lise com tiocianato de guanidina e Triton. Amostras foram então homogeneizadas e armazenadas em freezer à -70°C para posterior análise.

Esta metodologia em comparação a outros métodos, tais como lavagem cervicovaginal, endocervical, swab ou aspiração é a melhor por absorver a secreção não diluída, minimizando a adesão celular ao material, quando o objetivo é coletar somente o RNA na secreção (Cu-Uvin & Caliendo, 2011).

3.3 DETERMINAÇÃO DO NÚMERO DE CÓPIAS DE RNA DO HIV NAS AMOSTRAS DE SECREÇÕES CERVICOVAGINAIS

As amostras de secreção genital tiveram o seu RNA viral isolado utilizando-se o método de extração automatizado NucliSens EasyMag® (Biomérieux). Esta plataforma permite a extração automatizada dos ácidos nucléicos utilizando a propriedade da sílica em fixar os ácidos nucléicos. Esta tecnologia é baseada na metodologia de BOOM, (Boom, 1990) onde a introdução de partículas magnéticas aumenta significativamente a qualidade da extração.

A quantificação da CV foi realizada por meio do kit NucliSens EasyQ® HIV v 1.2 (Biomérieux), que tem como princípio a detecção de moléculas de RNA de fita simples em tempo real. O teste é feito usando sondas do tipo “*beacon molecular*”, que consiste de um oligonucleotídeo de DNA contendo uma seqüência de nucleotídeos específica e complementar à seqüência-alvo, essas sondas são desenhadas baseadas na região mais conservada do genoma do HIV, a região *gag*. A ligação a uma seqüência-alvo complementar abre a estrutura da “*beacon molecular*”, permitindo que esta emita fluorescência, indicando assim a presença do RNA com a seqüência alvo. A sensibilidade do teste é de aproximadamente 25 – 3.000.000 UI/mL.

Esta etapa do estudo foi realizada em colaboração com a empresa Biomérieux, que disponibilizou o espaço laboratorial, situado na filial Rio de Janeiro, os equipamentos e os reagentes necessários.

3.3.1 Extração do RNA viral

As amostras foram retiradas do freezer a -70°C e descongeladas em banho Maria por 2 minutos, à temperatura de 37°C , e depois agitadas em vórtex por cinco minutos a 1.200 rpm. As amostras foram transferidas para os poços contidos no equipamento e registradas no software segundo a sua localização. Após os ciclos de lavagem foram adicionados 100 μl de sílica eluída na proporção de 1:1 de sílica e tampão. Neste momento, os ácidos nucléicos presentes se ligaram às partículas de dióxido de sílica magnéticas. A sílica magnética foi mecanicamente lavada várias vezes, ocorrendo subsequente eluição dos ácidos nucléicos da fase sólida, o que fez com que os ácidos nucléicos ficassem disponíveis para serem utilizados no procedimento de amplificação e detecção.

3.3.2 Amplificação e detecção

Para a etapa de amplificação dos ácidos nucleicos, primeiramente, foi iniciado o NucliSens EasyQ® Analyzer e o NucliSens EasyQ® Director software, conforme descrito nos procedimentos de funcionamento, no Manual do Usuário do NucliSens EasyQ®, e criado uma série de testes segundo o mesmo manual.

Do total de ácidos nucleicos extraído de cada amostra, 5µl foram colocados em uma tira de tubo estéril própria para a amplificação, realizando-se, então, a diluição da enzima e do iniciador.

Foi adicionado ao RNA eluído 10 µl do iniciador, em cada tubo. Estes iniciadores foram previamente diluídos e agitados imediatamente em vórtex até dissolução completa, conforme instruções do fabricante, e posteriormente colocados no Nuclisens EasyQ® incubador por quatro minutos, sendo dois minutos a 65° C e dois a 41° C.

Durante a etapa de incubação as tampas dos tubos foram viradas para baixo em um suporte de tubos e foi adicionado cinco 5µl da enzima, previamente diluída, na parte interna de cada tampa, conforme orientação do fabricante. Após a incubação, os tubos foram fechados e centrifugados dois segundos no mini-strip centrifuge duas vezes. As amostras foram então transferidas para o Nuclisens EasyQ® Analyzer para quantificação do RNA viral, que ocorreu em uma hora.

Após a reação de amplificação o Software gerou um relatório detalhado com as informações de cada corrida e a quantificação da CV de cada amostra.

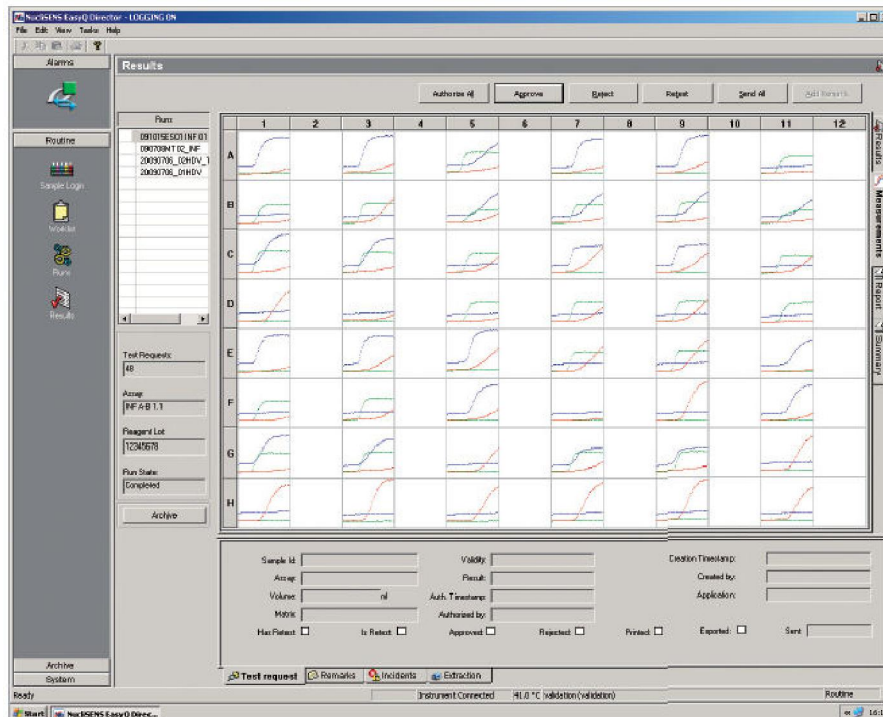


Figura 6: Representação dos resultados detectados no NucliSens EasyQ Analyzer. Fonte: Manual do usuário NucliSens EasyQ® Director software (Biomérieux).

Após a mensuração da CV, aplicou-se ao valor obtido em cada mostra, a conversão pelo fator de diluição, que pelo volume inicial de 30uL, ficou fixado em 33,3. Sendo assim, cada valor de CV obtido foi multiplicado por 33,3, resultando nos valores apresentados. Por conseqüência o limite inferior de sensibilidade do teste foi de 832 cópias por ml.

Como a quantificação das cargas virais no plasma e nas secreções foi realizada utilizando-se metodologias diferentes (Nasba® e b-DNA® para o plasma e EasyQ® para as secreções), foi necessário validar inicialmente o método EasyQ®. Para essa validação 20 amostras de plasma, já previamente quantificadas pela metodologia Nasba® ou b-DNA®, foram submetidas à quantificação pelo método EasyQ®, nas mesmas condições em que se encontravam as amostras de secreção, ou seja, 30 µl de plasma diluídos em tampão de Isotiocianato de Guanidina e Triton e processados da mesma forma. Após isso, foi aplicada a cada resultado a correção pelo fator de diluição, obtendo-se o valor final de mensuração da CV de cada

gestante. No quadro 4 estão explicitados os valores das cargas virais, já com o fator de correção aplicado, em cópias por mililitro (ml) e por logaritmo na base 10 (\log_{10}) por mililitro, e as metodologias as quais foram submetidas para sua mensuração. A fim de comparar a equivalência de ambas as metodologias, os valores de CV, em cópias/ml e em \log_{10} /ml, foram submetidos ao teste estatístico de Wilcoxon. A diferença entre os valores obtidos nessas duas metodologias não foi estatisticamente significativa, tanto nos valores em cópias/ml ($p=0,3437$), como nos valores em \log_{10} ($p=0,7049$), mostrando, assim, que as metodologias são equivalentes.

Quadro 4: Comparação das metodologias Utilizadas para Quantificação do RNA-HIV

Gestante	Metodologia			
	Nasba ou b-DNA (cp/ml)	Nasba ou b-DNA(\log_{10} /ml)	EasyQ (cp/ml)	EasyQ (\log_{10} /ml)
42	<LD	<LD	<LD	<LD
47	18000	4,25	15318	4,18
51	2200	3,34	2164	3,33
53	350000	5,54	230210	5,36
62	870	2,93	832	2,92
65	7600	3,88	6983	3,84
78	1000	3	932	2,96
80	5000	3,69	5661	3,75
84	900	2,95	832	2,92
85	<LD	<LD	<LD	<LD
87	12000	4,07	17649	4,24
92	110000	5,04	98270	4,99
118	26000	4,41	29960	4,47
122	160000	5,20	132500	5,12
135	180000	5,25	173260	5,23
146	26000	4,41	27306	4,43
165	37000	4,56	40620	4,60
170	<LD	<LD	<LD	<LD
239	641	2,80	832	2,92
249	59110	4,77	56620	4,75

3.4 GENOTIPAGEM DO HIV

Para extração do RNA viral e amplificação do fragmento da região da polimerase das amostras genitais, foi utilizado o kit comercial ViroSeq® HIV Genotyping System (Celera Diagnostics, Abbott Laboratories, EUA). O RNA do HIV foi extraído, para seqüenciamento a partir de uma solução de 500 µl de tampão de lise onde foram eluídos 30 µl de secreção genital. A solução foi concentrada por centrifugação a 14.000 rpm por 120 minutos a 4°C com obtenção do pellet, que foi precipitado com isopropanol e hidratado com etanol a 70% e posteriormente diluído com RNA diluente, proveniente do kit, obtendo ao final do procedimento um volume de 30 µl do RNA diluído.

A 10µl de RNA foi adicionado 10 µl do mix para retro transcrição reversa, presente no kit, obtendo 20µl do cDNA, ao final da reação. Em seguida o DNA complementar, de 1.8 Kb correspondente à região *pol* do genoma do vírus, que abrange a protease e transcriptase reversa, foi amplificado através da reação de PCR, onde foi empregado o módulo PCR do Kit ViroSeq® HIV V.2.0 (Abbott).

Para a amplificação da região alvo do estudo foi utilizado como ciclagem de PCR: um ciclo de 50°C por 10 minutos para ativação da UNG, 1 ciclo 93°C 12min, para desnaturação da UNG e ativação da enzima AmpliTaq 40ciclos 93°C por 20 segundos para desnaturação do DNA 1 ciclo de 64°C por 45 segundos para anelamento do iniciador, um ciclo 66°C por 3 minutos para extensão do iniciador, e uma extensão final de 72°C por 10 minutos.

3.4.1 Purificação e quantificação do produto de PCR

O produto de PCR amplificado com o tamanho de 1,8 Kb foi purificado utilizando colunas MicroconYM-100, KCl e água DEPC onde os produtos amplificados menores que 1,8 Kb passaram pela coluna durante o processo de lavagem, sendo obtidos 35 µl de cDNA purificado ao fim do procedimento.

O produto de PCR purificado foi quantificado em gel de agarose 1% em tampão TBE 1X (Tris-HCL 1M, Ácido Bórico 1M e EDTA 20m), corado com Brometo de Etídeo (0,1%). A corrida foi realizada em voltagem de 150 V por 35min e o gel foi fotografado sob luz ultravioleta.

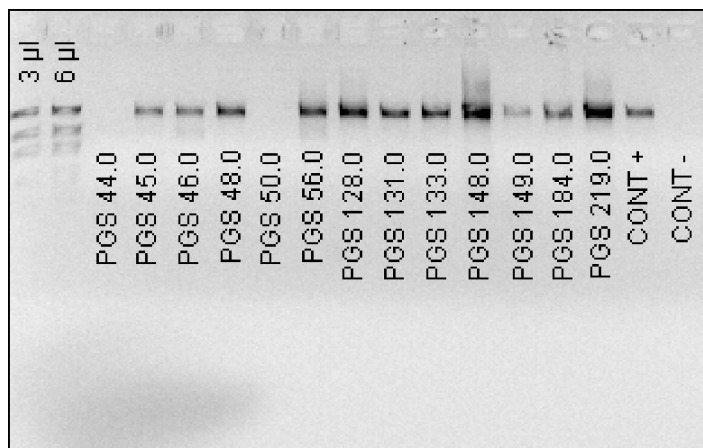


Figura 7: Foto do gel de agarose 1% com amostras de secreção amplificadas e purificadas.

3.4.2 Reação de sequenciamento

Após purificação e quantificação, cada produto amplificado foi diluído de acordo com a concentração encontrada (1:1 entre 20 e 30ng, 1:2 para 40, 1:3 para 60ng, 1:4 entre 80 e 100ng e 1:5 acima de 100ng). Posteriormente as amostras foram submetidas à reação de seqüenciamento, utilizando sete diferentes

iniciadores, de acordo com as instruções do fabricante. Foram, a seguir, utilizadas as seguintes condições de ciclagem: 25 ciclos 96°C 10 segundos para desnaturação do DNA, 1 ciclo 50°C 5 segundos para anelamento do iniciador, 1 ciclo 60°C 4 minutos para extensão do iniciador e 4°C para armazenamento.

3.4.3 Precipitação da reação de sequenciamento

Após a realização da reação de seqüenciamento, procedeu-se uma etapa de purificação na qual 80 µL de isopropanol 75% foram adicionados em cada poço da placa. A placa foi centrifugada a 4.000 rpm por 45 minutos; o isopropanol foi desprezado por inversão da placa e seguiu-se uma etapa de centrifugação da placa invertida a 900 rpm por 1 minuto. O depósito seco foi ressuspensão com 10 µL de formamida *Hi-Di* e as amostras foram seqüenciadas no Seqüenciador Automático ABI 3100 (Applied Biosystems).

3.4.4 Análise molecular

As seqüências geradas foram editadas no programa ViroSeq® v.2.8 gerando um fragmento de 1.2 Kb, em que ao final da análise foi originado um laudo com o perfil de resistência viral de cada amostra.

3.5 RESGATE DAS AMOSTRAS QUE NÃO AMPLIFICARAM PELO KIT VIROSEQ®

Os produtos resultantes da reação de PCR do ViroSeq® que não amplificaram foram posteriormente submetidas a uma reação de *nested* PCR na tentativa de resgatar e amplificar o maior número de amostras possíveis.

Para isso, um segundo "round" foi aplicado ao produto de PCR das amostras que não amplificaram anteriormente, sendo que neste segundo "round" o segmento, correspondente a região *pol*, foi dividido em dois fragmentos menores visando a possibilidade de um aumento no rendimento da amplificação das amostras. Neste segundo "round" foram utilizados os iniciadores DP 16 e RT 4 para o fragmento 1 correspondendo a 998 pb, enquanto que, para o fragmento 2 foram utilizados os iniciadores POL 4 e RT 5 com um tamanho de 563 pb, que acabaram por gerar um segmento de 1300 pb do gene *pol* do HIV. Ao mix dos respectivos fragmentos foi adicionado 5 µL do produto de PCR ViroSeq®. Para amplificação das regiões alvo do estudo foi utilizado como ciclagem de PCR: três ciclos de 97°C durante 1 minuto, 55°C por 1 minuto, 72°C por 2 minutos seguindo-se de 32 ciclos de 95°C por 45 segundos, 55 °C por 1 minuto e 72°C por 2 minutos, seguindo-se de uma extensão final de 72°C por 10 minutos.

Quadro 5: Primers internos utilizados na reação de *nested* PCR para o fragmento do gene *pol* (fragmentos 1 e 2) correspondente às regiões da protease e da transcriptase reversa viral .

Primer	Fragmento	Sequência (HXB2)
DP 16	1	CCTCAGGTCACTCTTTGGCAAC (Pos. 2253)-5'→3'
RT 4	1	AGTTCATAACCCATCCA (Pos. 3250)- 3'→5'
POL 4	2	CAGTACAATGTGCTTCCAC (Pos. 2976) -5'→3'
RT 5	2	TAAATTTGATATGTCCATTG (Pos. 3574)-3'→5'

3.5.1 Purificação e Quantificação do Produto De PCR

Após a amplificação, a detecção do produto de PCR foi realizada por eletroforese em gel de agarose a 1% em Tampão TBE 1X, corado com Brometo de Etídeo (0,1%). Os produtos da amplificação e o padrão de peso molecular fago FiX 174 digerido com a enzima Hae III (1353, 1078, 872, 603, 310pb) foram aplicados em gel de agarose a 1% e submetidos a uma corrente constante de 80 Volts por 90 minutos.

As amostras amplificadas foram purificadas por método cromatográfico, com o uso de colunas de purificação, disponibilizadas no kit comercial GE Healthcare, de acordo com as instruções do fabricante. O material purificado foi quantificado em gel de agarose a 2% em Tampão TBE 1X e corado com 5 µl de Brometo de Etídeo, com padrão de massa molecular *Low DNA Mass Ladder*, este padrão apresenta bandas de 100, 200, 400, 800, 1200 e 2000pb que correspondem a 5, 10, 20, 40, 60 e 100ng de DNA, respectivamente.

3.5.2 Reação de Sequenciamento

Para o sequenciamento, foi utilizada a técnica de seqüenciamento por PCR (*cycle sequencing*), utilizando-se didesoxinucleotídeos (ddNTPs) contendo marcadores fluorescentes do *Kit ABI Prism BigDye™ Terminator* (Applied Biosystems).

Para a reação de seqüenciamento foi utilizado 1 µL do *Big Dye™ v.3.1 (Sequencing Ready Reaction Mix)*, 1,5 µL do tampão de diluição 5X *Big Dye Terminator v1. 1/3.1 Sequencing Buffer*, 1 µL dos iniciadores, DP16, LR49, RT4 e LR51 para o fragmento 1 e POL4, LR54, SeqRT e RT5 para o fragmento 2, em uma concentração de 5 pmol/µL e a essa solução foi adicionado de 60 a 100 ng do produto de PCR purificado, de acordo com a quantificação de cada amostra. Foi adicionada água Milli-Q para um volume final de reação de 10 µl (Eyer Silva & Morgado, 2006).

3.5.3 Precipitação da Reação De Sequenciamento

Após a realização da reação de seqüenciamento, procedeu-se uma etapa de precipitação na qual 80 µL de isopropanol 70% foram adicionados em cada poço da placa. A placa foi centrifugada a 4.000 rpm por 45 minutos; o isopropanol foi desprezado por inversão da placa e seguiu-se uma etapa de centrifugação da placa invertida a 900 rpm por 1 minuto. O depósito seco foi ressuspenso com 10 µL de formamida *Hi-Di* e as amostras foram seqüenciadas em Seqüenciador Automático ABI 3100.

3.5.4 Análise Molecular

Os cromatogramas gerados a partir do sequenciamento foram alinhados e editados manualmente, utilizando o pacote de programas DNASTAR 4.0 (DNASTAR Inc., EUA), com o uso do software SeqMan 4.0 as seqüências foram alinhadas e editadas.

O alinhamento foi realizado a partir do programa MEGA 4.0 – Molecular Evolutionary Genetic Analysis (Tamura *et al.*, 2007).

3.6 DETERMINAÇÃO DO SUBTIPO VIRAL

Os subtipos virais foram determinados através do alinhamento das seqüências obtidas a partir do arquivo fasta gerado pela análise molecular das seqüências de cada mulher incluída 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 & Nei, 1987) com 500 replicatas para a determinação dos valores de *bootstrap*. Foram considerados como grupamentos 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 *et al.*, 2007).

3.7 DETERMINAÇÃO DAS MUTAÇÕES DE RESISTÊNCIA

A região da polimerase do HIV, incluindo protease e transcriptase reversa, foi amplificada e seqüenciada no intuito de detectar a presença de mutações associadas à resistência aos antirretrovirais, em isolados circulantes na população do estudo. Depois da edição e análise das seqüências no programa SeqMan 4.0 foi gerado um arquivo fasta. Este arquivo foi submetido á análise, para a verificação de mutações de resistência, pelo algoritmo de Stanford (<http://hivdb.stanford.edu//index.html>), em que o site gera um laudo descrevendo todas as mutações encontradas e seu impacto respectivo na ação de cada medicamento. Este procedimento foi realizado para cada amostra de cada mulher, nos diferentes momentos de análise do estudo, e os resultados foram comparados aos obtidos anteriormente para as amostras correspondentes de plasma desta mulheres (Pilotto, 2008).

3.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Esta etapa do estudo foi realiza em colaboração com a equipe de estatística do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, que viabilizaram as análises estatísticas e sócio demográficas.

3.8.1 Base de Dados

As informações sócio-demográficas, comportamentais, clínicas, laboratoriais, história obstétrica e do pré-natal foram provenientes da base de dados gerada no

Projeto “Perfil de resistência genotípica do HIV aos antirretrovirais em uma população de mulheres infectadas pelo HIV expostas a quimioprofilaxia com antirretrovirais para a prevenção da transmissão vertical do HIV durante a gestação”. Os resultados da CV e da genotipagem na secreção genital foram digitados em uma pequena base de dados em separado.

3.8.2 Análise Descritiva

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

3.8.3 Análise Comparativa do RNA do HIV no Plasma e na Secreção Genital

As análises do RNA do HIV nas amostras de plasma coletadas na visita inicial (pré-TARV) foram comparadas através do coeficiente de *Spearman*. Foram consideradas estatisticamente significativas as diferenças encontradas ao nível de 5%.

3.8.4 Análise comparativa do RNA do HIV no plasma e na secreção genital entre as amostras obtidas antes do início de TARV e após a interrupção da TARV

O teste pareado de Wilcoxon foi utilizado para avaliar as diferenças da quantificação do RNA do HIV entre as amostras de plasma e entre as amostras de secreção genital obtidas antes do início de TARV e após a sua interrupção.

O teste pareado de Wilcoxon calcula as diferenças entre duas medidas (no caso, coleta pré-TARV e coleta após a interrupção da TARV) para um mesmo indivíduo e compara o número de diferenças positivas, negativas e de empates. As diferenças positivas ocorreram quando as medianas do log do RNA do HIV nas amostras obtidas após a interrupção de TARV foram maiores do que as medianas calculadas para estes parâmetros nas amostras obtidas antes do início de TARV. As diferenças negativas ocorreram quando os valores observados nas amostras obtidas após a interrupção do TARV foram menores do que os valores observados nas amostras obtidas antes do início de TARV. Os empates ocorreram quando as diferenças entre as medianas do log do RNA do HIV 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.

Qualquer medida da quantificação do RNA do HIV mais próxima da introdução da TARV, seja anterior ou até sete dias após a sua introdução, foi considerada como referente à visita inicial da gestante (pré-TARV). Para as medidas do RNA do HIV referentes à visita após a interrupção da TARV foi admitido um intervalo de +/- 6 meses.

4. Resultados

A primeira etapa do estudo consistiu na caracterização e análise sócio-demográfica e comportamental da população de 92 mulheres estudadas. Assim como das análises das cargas virais (CV) nos compartimentos plasmático e genital, técnicas de estatística descritiva foram inicialmente utilizadas para fornecer um perfil geral da população do estudo em termos de CV plasmática e genital e a contagem de células TCD4+.

4.1 CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO ESTUDADA

4.1.1 Características sócio demográficas

Na população estudada a idade média e mediana das mulheres foi de 26,4 (DP = 6,3) e 25,1 anos (IQI = 21,4 – 30,0), respectivamente, sendo que 50% (n= 45) delas apresentavam idade inferior a 25 anos. Cerca de três quartos das mulheres se intitularam como sendo da raça não-branca (72,8%) e pouco mais da metade (54,4%) declararam ter até sete anos de escolaridade. Quase 80% delas tinham renda familiar mensal de até dois salários-mínimos no momento da inclusão na coorte, sendo que mais da metade (55,4%) relatou renda familiar de até um salário mínimo. (Tabela 1).

Tabela 1: Características sócio-demográficas das gestantes com HIV/AIDS no momento da inclusão no estudo (n=92)

Características		N	%
Faixa etária	< 25 anos	45	50,0
	25 a 35 anos	35	38,9
	≥ 35 anos	10	11,1
	Total	90	100,0
Cor da pele	Branca	25	27,2
	Não branca	67	72,8
	Total	92	100,0
Escolaridade	Até 4 anos	19	20,7
	5-7 anos	31	33,7
	8 ou mais anos	42	45,7
	Total	92	100,0
Renda familiar mensal (SM)	≤ 1 SM	51	55,4
	2 SM	22	23,9
	≥ 3 SM	19	20,7
	Total	92	100,0

* Números variam devido à informação ignorada

4.1.2. Análise dos parâmetros laboratoriais

A maioria das mulheres (83,7%) apresentou contagem de linfócitos TCD4+ no momento de ingresso no estudo (pré-TARV) igual ou superior a 350 céls./mm³, o que pode ser também observado após a retirada do tratamento (pós-TARV). Um total de 9,8% das mulheres apresentava CV plasmática no pré-TARV indetectável (< 50 cópias/mL), enquanto 45,9% apresentavam CV genital indetectável neste mesmo momento. Porém, no momento pós-TARV houve um aumento no número de mulheres com CV indetectável no plasma (45,9%) e um acréscimo da CV genital detectável (66,7%). (Tabela 2).

Tabela 2: Características laboratoriais das gestantes estudadas na inclusão no estudo (N= 92) e após a interrupção de TARV (N=54) HGNI, 2005-2008.

Características		N	%
Contagem de TCD4+ (cels/mm3) no momento pré-TARV	< 200	1	1,1
	200-350	14	15,2
	> 350	77	83,7
	Total	92	100,0
CV plasmática no momento pré-TARV	Detectável	83	90,2
	Indetectável	9	9,8
	Total	92	100,0
CV na secreção genital no momento pré-TARV	Detectável	40	54,1
	Indetectável	34	45,9
	Total	74	100,0

Características		N	%
Contagem de TCD4+ no momento pós-TARV (cels/mm3)	< 200	1	2,4
	200-350	3	6,9
	> 350	39	90,7
	Total	43	100,0
CV plasmática no momento pós-TARV	Detectável	35	81,4
	Indetectável	8	18,6
	Total	43	100,0
CV na secreção genital no momento pós-TARV*	Detectável	24	66,7
	Indetectável	12	33,3
	Total	36	100,0

* A quantificação da CV genital foi feita para as 92 mulheres no momento pré-TARV e apresentou resultado inválido para 18 delas. No momento pós-TARV a quantificação foi feita para 43 amostras e apresentou resultado inválido para 5 delas.

Em relação às características gestacionais (Tabela 3), 36,5% já sabiam ser portadoras da infecção pelo HIV quando engravidou e em torno de dois terços (63,5%) teve o diagnóstico confirmado para a infecção pelo HIV durante o pré-natal referente a gestação estudada. Cerca de 17% das mulheres relataram diagnóstico infecção sexualmente transmissível (IST) anterior à gestação. Entretanto, durante a gestação, verificou-se um aumento na frequência de diagnóstico de IST (16,7% vs 25%) porém, esse aumento não foi estatisticamente significativo (Teste do Fisher, $p= 0,38$). No mínimo, 80,4% das mulheres foram submetidas a esquemas antirretrovirais que continham um inibidor de protease durante a gestação, conforme estabelecido pelo Ministério da Saúde, enquanto que para as demais foi prescrito

esquema contendo inibidor de transcriptase reversa não-nucleosídeo (ITRNN). A substituição do esquema de medicamentos devido a eventos adversos ocorreu em 7,6% das gestantes. A média e a mediana do tempo de uso da terapia antirretroviral (TARV) durante a gestação foi de 98,2 (DP: 45,9) e 98,0 (IQI: 61,0-142,0) dias, respectivamente. Apenas 7,6% das gestantes usou ARVs por menos de 4 semanas, tendo a maior parte delas (55,4%) usado TARV por 4 a 16 semanas. Em torno de 93,4% das gestantes receberam AZT intravenoso durante o trabalho de parto, e 58,2% foram submetidas à cesárea eletiva. Cerca de 87% das gestantes tiveram uma gestação de 37 semanas ou mais.

Das mulheres em que foi diagnosticada IST em algum momento durante o estudo, ou seja, nos momentos pré ou pós-TARV, 70% apresentavam CV genital detectável, porém, não houve associação significativa entre estas duas medidas (teste de Fisher, $p= 0,7086$).

Tabela 3: Características gestacionais das mulheres estudadas. HGNI, 2005-2008

Características		N	%
Idade gestacional no parto	<37	12	13,0
	≥ 37	80	87,0
	Total	92	100,0
Momento do diagnóstico do HIV	Anterior a gestação	31	36,5
	Durante gestação	54	63,5
	Total	85	100,0
Diagnóstico de IST anterior a gestação	Sim	15	16,7
	Não	75	83,3

Características		N	%
Total		90	100,0
Diagnóstico de IST durante o pré-natal	Sim	23	25,0
	Não	69	75,0
	Total	92	100,0
Diagnóstico de AIDS CDC-93 no momento da inclusão na coorte	Não	88	100,0
	Sim	0	0,0
	Total	88	100,0
Esquema ARVs usados na gestação*	AZT+3TC+NVP	12	13,0
	AZT+3TC+NFV	62	67,4
	AZT+3TC+LPVr	12	13,0
	AZT+3TC+(NVP ou NFV)	6	6,5
	Total	92	100,0
Tempo de uso de antiretroviral na gestação (semanas)	< 4 semanas	7	7,6
	4-16 semanas	51	55,4
	17-27 semanas	34	37,0
	≥ 28 semanas	0	0,0
	Total	92	100,0
Substituição do esquema ARV durante o pré-natal por evento adverso	Não	85	92,4
	Sim	7	7,6
	Total	92	100,0

Características		N	%
AZT venoso durante o trabalho de parto	Não	6	6,6
	Sim	85	93,4
	Total	91	100,0
Tipo de parto	Vaginal	35	38,5
	Cesárea eletiva	53	58,2
	Cesárea de urgência	3	3,3
	Total	91	100,0

*AZT+3TC+(NVP ou NFV) = durante o acompanhamento a mulher teve estes 2 esquemas:

AZT+3TC+NVP e AZT+3TC+N

4.2. COMPARAÇÃO ENTRE A CV NA SECREÇÃO GENITAL E NO PLASMA DAS GESTANTES ESTUDADAS NO MOMENTO PRÉ-TARV

A tabela 4 ilustra a distribuição das CVs no plasma e na secreção genital antes da introdução da TARV. Das 92 mulheres incluídas no estudo, 74 apresentaram resultados mensuráveis para CV na secreção genital, enquanto que 18 (19,4%) apresentaram resultados inválidos para o teste. Com base nesses dados passamos a considerar o universo das 74 mulheres para a análise comparativa das cargas virais nos dois compartimentos. Assim, a tabela 5 apresenta a frequência e o percentual das CVs plasmáticas e genitais, distribuídos nas faixas selecionadas de quantificação do RNA do HIV. Como pode ser observado, um perfil distinto de distribuição das CVs pode ser detectado nestes dois compartimentos ($p < 0.0068$),

sendo este mais evidente em relação às CVs abaixo de 1.000 cópias/ml onde observamos uma frequência de (24,4% vs 48,6%) respectivamente para o plasma e a secreção genital.

Tabela 4: Distribuição das cargas virais detectáveis e indetectáveis no plasma e na secreção genital antes da introdução de TARV. HGNI, 2005-2008.

Carga Viral*			
Compartimento	Detectável	Indetectável	Inválido
Plasma (n=92)	83 (91,3%)	9 (9,7%)	-
Secreção Genital (n=92)	40 (43,5%)	34 (37%)	18 (19,4%)

*Metodologias: plasma-b-DNA; secreção-EasyQ.

Tabela 5: Distribuição da CV plasmática e genital entre as faixas selecionadas.

Faixas de CV	Plasma	Secreção Genital*
<LDL-1.000 cópias/ml	18 (24,3%)	36(48,6%)
>1.000 – 10.000 cópias/ml	29 (39,2%)	16(21,6%)
>10.000 cópias/ml	27(36,5%)	22 (29,8%)
Total	74 (100%)	74 (100%)

*18 amostras de secreção genital tiveram resultados inválidos no teste de quantificação da CV. Teste do Qui-quadrado com $p < 0.0068$.

A análise comparativa das cargas virais entre o plasma e a secreção genital foi realizada para as 74 amostras e os resultados estão apresentados na tabela 6, onde evidenciamos que cerca de 50% (36 das 74 amostras) das amostras de plasma e na secreção genital encontra-se na mesma faixa de CV (evidenciado na tabela 6). Destas, 13 (36%) na faixa de detecção abaixo de 1000 cópias/ml, 9 (25%) para a faixa intermediária de 1.000 – 10.000 cp/ml e 14 (39%) para a faixa acima de 10.000 cp/ml. Trinta e oito amostras (51%) tiveram perfil discordante na comparação

entre as diferentes faixas de CV, com maior discrepância na faixa intermediária (1.000 – 10.000 cópias/ml), confirmando as diferenças entre níveis analisados de CV plasmática e na secreção genital antes da introdução de TARV ($p=0,013$), com uma diferença estatisticamente significativa.

Tabela 6: Distribuição da CV na secreção genital, de acordo com a CV plasmática, antes da introdução de TARV (N=74). HGNI, 2005 – 2008.

CV Plasmática no pré-TARV	CV genital no pré-TARV							
	< LDL - 1000 cópias/ml		>1000-10.000cópias/ml		> 10.000 cópias/ml		Total	
	N	%	N	%	N	%	N	%
< LDL –1000cópias/ml	13	72,2	3	16,7	2	11,1	18	100,0
>1000-10.000cópias/ml	14	48,3	9	31,0	6	20,7	29	100,0
> 10.000 cópias/ml	9	33,3	4	14,8	14	51,9	27	100,0
Total	36	48,6	16	21,6	22	29,7	74	100,0

P-valor do Teste Qui-quadrado: 0, 013

4.3. COMPARAÇÃO ENTRE A CV NA SECREÇÃO GENITAL E NO PLASMA DAS GESTANTES ESTUDADAS NO MOMENTO PÓS-TARV

Do total das 92 mulheres selecionadas para o estudo, 43 possuíam amostra genital e plasmática posterior a interrupção do tratamento, coletadas com diferença máxima de duas semanas. Estas amostras foram obtidas nas visitas realizadas entre 2 e 6 meses após o parto com uma mediana de 3,5 meses (DP= 1,7, IQI= 2-6). Das 43 amostras genitais coletadas, 36 geraram resultados mensuráveis de CV e sete foram inválidas para o teste. A tabela 7 ilustra a distribuição da CV nos dois compartimentos no momento após a interrupção da terapia antirretroviral (pós-TARV), onde se observa que 55,8% das mulheres tinham CV detectável na secreção genital e um percentual mais elevado de CV indetectável na secreção quando comparada ao plasma. Com base nesses dados passamos a utilizar o universo de 36 amostras para as análises comparativas de CV nos dois compartimentos.

Tabela 7: Distribuição das cargas virais detectáveis e indetectáveis nos compartimentos plasmático e genital no momento pós-TARV.

Carga Viral*			
Compartimento	Detectável	Indetectável	Inválido
Plasma (n=43)	34 (79,1%)	9 (20,9%)	-
Secreção Genital (n=43)	24 (55,8%)	12 (27,9%)	5 (16,3%)

*Metodologias: plasma-b-DNA; secreção-EasyQ; 7 amostras apresentaram resultados inválidos na quantificação da CV genital

A tabela 8 apresenta a distribuição das CV plasmática e genital, entre as faixas selecionadas de quantificação do RNA do HIV. Como pode ser observado, um perfil

semelhante de distribuição das CVs pode ser detectado nestes dois compartimentos (p=0,9273) no momento pós-TARV.

Tabela 8: Frequência da distribuição da CV plasmática genital entre as faixas selecionadas no momento pós-TARV.

Faixas de CV	Plasma	Secreção Genital*
<LDL-1.000 cópias/ml	13 (37,0%)	12 (33,4%)
>1.000 – 10.000 cópias/ml	11 (30,0%)	7 (19,4%)
>10.000 cópias/ml	12 (33,0%)	17 (47,2%)
Total	36 (100%)	36 (100%)

*7 amostras de secreção genital tiveram resultados inválidos no teste de quantificação da CV.

p= 0,9273 teste Qui-quadrado

A análise comparativa das cargas virais entre o plasma e a secreção genital foi realizada para as 36 amostras e os resultados estão apresentados na tabela 9, onde evidenciamos 55% (20 das 36 amostras) das amostras de plasma e secreção genital apresentavam resultados na mesma faixa de CV. Destas, 8 (40%) na faixa de detecção abaixo de 1.000 cópias/ml, 3 (15%) para a faixa intermediária de 1.000 – 10.000 cp/ml e 9 (45%) para a faixa acima de 10.000 cópias/ml. Por outro lado, dezesseis amostras (45%) tiveram perfil discordante na comparação entre as diferentes faixas de CV, com maior discrepância na faixa intermediária (1.000 – 10.000 copias/ml), indicando que existem diferenças entre as frequências de mulheres pelas faixas analisadas de CV plasmática e na secreção genital após a interrupção de TARV (p=0, 049).

Tabela 9: Distribuição da CV na secreção genital, de acordo com a CV plasmática, após a interrupção de TARV (N=36). HGNI, 2005-2008.

CV Plasmática no pós-TARV	CV na secreção Genital no pós-TARV							
	< LDL-1000cópias/ml		>1000-10.000cópias/ml		> 10.000 cópias/ml		Total	
	N	%	N	%	N	%	N	%
<LDL - 1000cópias/ml	8	61,5	2	15,4	3	23,1	13	100,0
>1000-10.000cópias/ml	3	27,3	3	27,3	5	45,5	11	100,0
> 10.000 cópias/ml	1	8,3	2	16,7	9	75,0	12	100,0
Total	12	33,3	7	19,4	17	47,2	36	100,0

P-valor do Teste Exato de Fisher: 0, 049

4.4 CORRELAÇÃO ENTRE AS CVs PLASMÁTICA E GENITAL ANTES DA INTRODUÇÃO DA TARV E APÓS A INTERRUPÇÃO

A correlação nos momentos pré e pós-TARV foi feita para as 74 e 36 mulheres, respectivamente, que tiveram sua CV genital quantificada e válida (Figura 8). Após a conversão logarítmica da CV foi aplicado o teste estatístico de *Spearman*. Com isso, verificou-se que a excreção genital do HIV antes do início do tratamento, teve uma correlação positiva, ou seja, quando a CV era alta no plasma, normalmente, o mesmo acontecia na secreção ($r= 0,3516$; $p= 0,0023$).

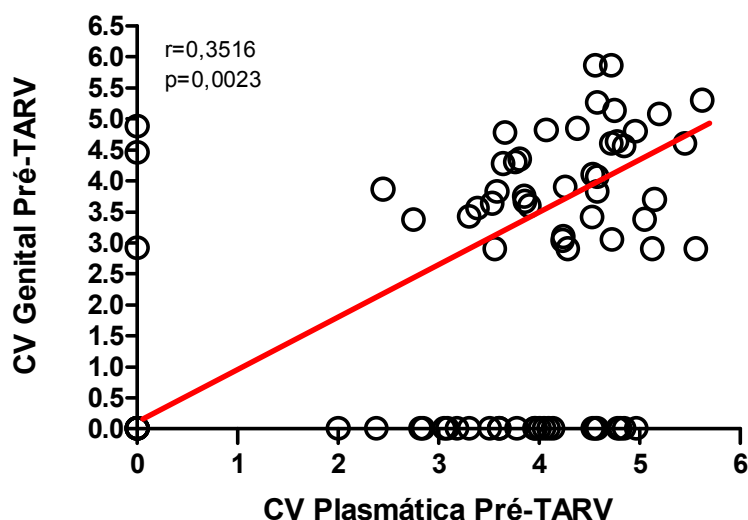


Figura 8: Correlação da CV plasmática e genital das gestantes estudadas no momento pré- TARV (Log10). Teste de Spearman.

Da mesma forma para o momento pós-TARV, pode-se verificar (Figura 9), através do teste estatístico de *Spearman*, que houve correlação entre os dois compartimentos para as 36 amostras analisadas ($r= 0,5861$ e $p= 0,0001$).

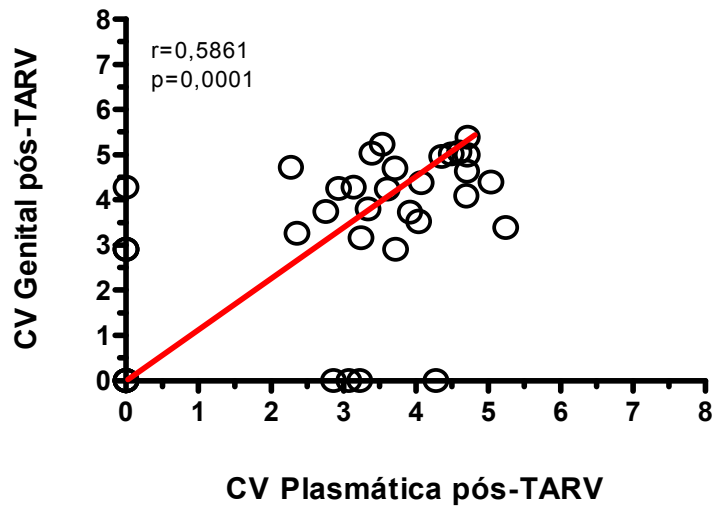


Figura 9: Correlação da CV plasmática e genital das gestantes estudadas no momento pós-TARV (Log10). Teste de Spearman.

4.5 COMPARAÇÃO DA CV NO COMPARTIMENTO GENITAL NOS MOMENTOS PRÉ E PÓS-TARV

No sentido de avaliar se a retirada da TARV tinha impacto sobre a CV genital, comparamos a frequência de mulheres nas diferentes faixas de cargas virais analisadas na secreção genital antes da introdução e após a interrupção de TARV. Esta análise foi realizada apenas para as mulheres que tinham CV na secreção genital nos dois momentos (N=24). Os valores de medianas nos dois momentos foi, respectivamente, de 3,63 (IQI 2,90 - 4,60) e 3,52 (IQI 2,90 - 4,39) para pré e pós-TARV, sem diferenças estatisticamente significativas (teste de Wilcoxon; $p=0,42$).

visando à avaliação de resistência transmitida aos antirretrovirais. O fluxograma de amplificação e genotipagem das amostras encontra-se na figura 11.

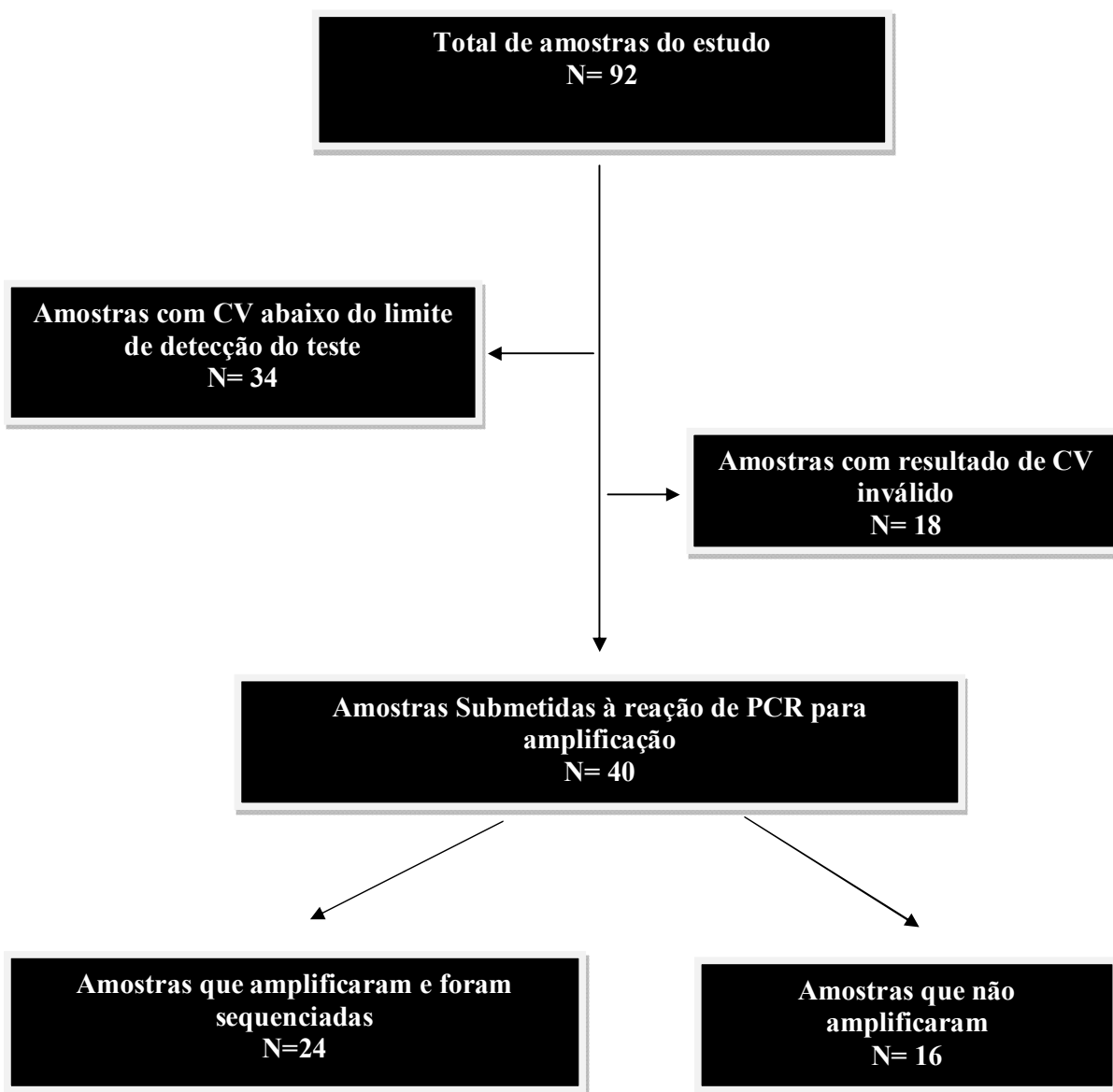


Figura 11. Fluxograma de amplificação e genotipagem das amostras no momento pré-TARV. HGNI 2005-2008.

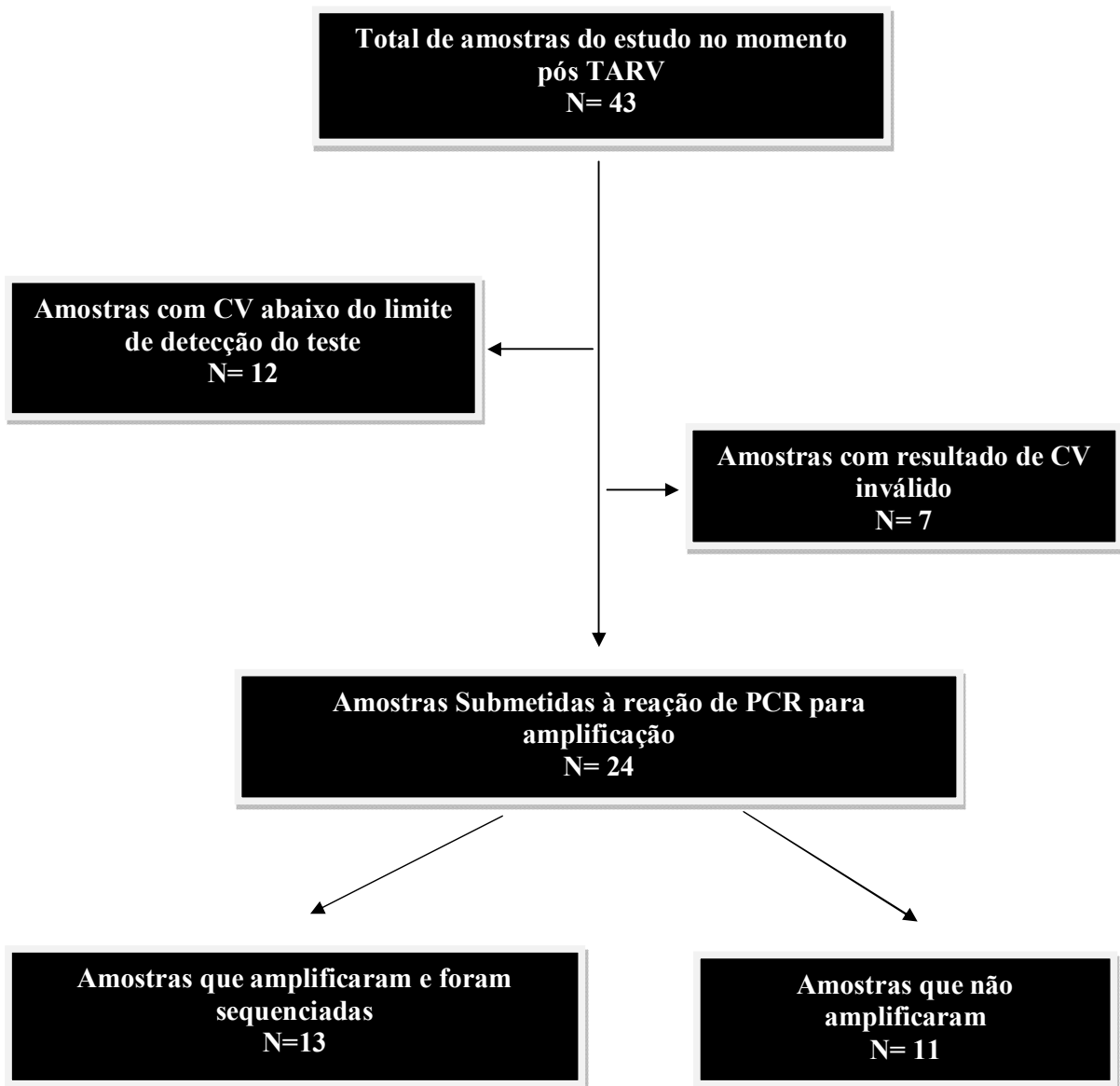


Figura 12. Fluxograma de amplificação e genotipagem das amostras no momento pós-TARV. HGNI 2005-2008

A amplificação e a genotipagem foram possíveis para 24 (60%) amostras no momento pré-TARV (Figura 11) e 13 (40%) das 24 amostras de secreção genital com CV detectável tiveram amplificação para o fragmento alvo no momento pós-TARV (Tabela 10).

Tabela 10: Amplificação de cDNA HIV obtido para o fragmento do gene *pol* a partir de amostras de secreção genital de mulheres soropositivas para o HIV nos momentos pré-TARV (n=40) e pós-TARV (n= 34). HGNI, 2005-2008.

	Pré-TARV N (%)	Pós-TARV N (%)	Total N (%)
Amostras com amplificação	24 (60)	13 (54)	37 (100)
Amostras sem amplificação	16 (40)	11 (46)	27 (100)
Total	40 (100)	24 (100)	64 (100)

Do total das 37 amostras sem amplificação apenas uma tinha CV acima do limite de detecção e abaixo de 1.000 cópias/ml, o que seria um fator limitante para a genotipagem. As demais possuíam CV acima de 1.000 cópias/ml. Possivelmente a não amplificação tenha acontecido em decorrência do procedimento de obtenção da secreção genital, que corresponde a 30ul do material biológico diluído em 500 ul de tampão, restringindo o quantitativo de RNA viral a ser analisado.

4.6.1 Determinação do Subtipo Viral

As amostras com amplificação em ambos os momentos já haviam sido analisadas quanto à prevalência dos subtipos e recombinantes virais com base na

análise de amostras do plasma (Pilotto 2008; Pilotto *et al.*, 2011 submetido á publicação).

A partir da análise das amostras de secreção cervical, 86% (30/35 gestantes) foram caracterizadas como sendo do subtipo B na região *pol*, incluindo as regiões da protease e da transcriptase reversa; e 14% do subtipo não B, sendo 11% destas identificadas como subtipo F e 3% apresentando um perfil recombinante BF. Estes resultados repetem os observados a partir da análise do plasma destas mesmas gestantes. A determinação do subtipo viral e a análise de recombinantes entre a protease e a transcriptase reversa foi possível através da ferramenta REGA HIV – 1 *Subtyping Tool*, a partir de fragmentos de 1200 pb (Figura 12), evidenciando os pontos de recombinação nestes genomas.

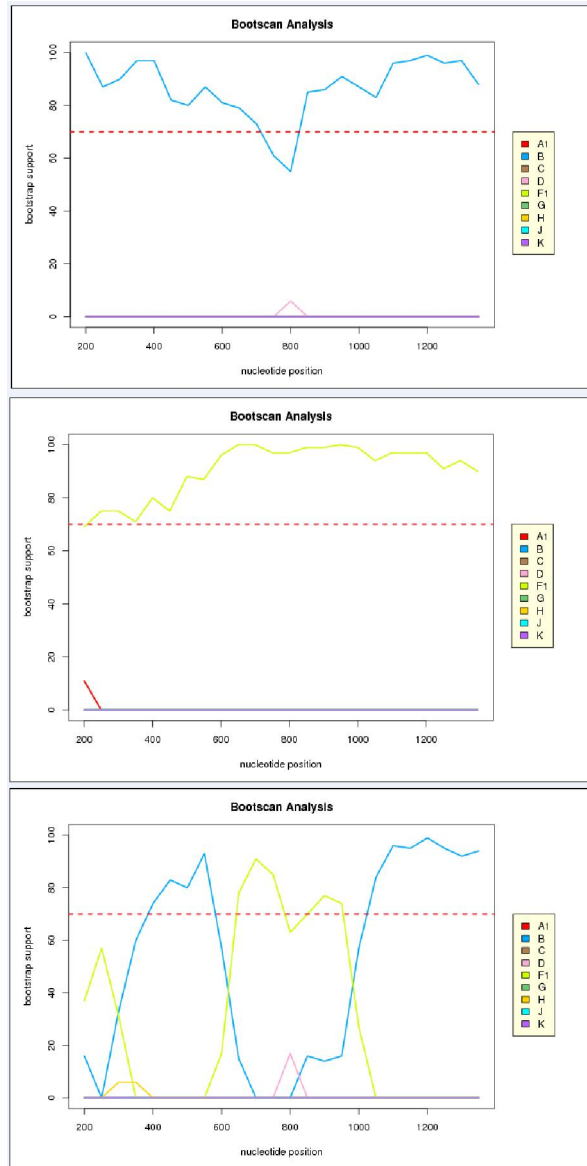


Figura 12: Análise das sequências de nucleotídeos da região da polimerase do HIV representativas dos genomas dos subtipos B , F e do recombinante B/F , respectivamente. Avaliação por *bootscanning* através do site REGA HIV *Subtyping Tool* versão 2.0, com janelas de 400pb, movendo em passos de 50pb.

A fim de verificar a correspondência entre as amostras plasmáticas e genitais, estas foram submetidas às análises filogenéticas da região da polimerase. Os resultados obtidos não evidenciaram discordância entre as amostras de ambos os compartimentos no momento pré-TARV (figura 13) e no momento pós-TARV (figura 14).

Momento pré-TARV

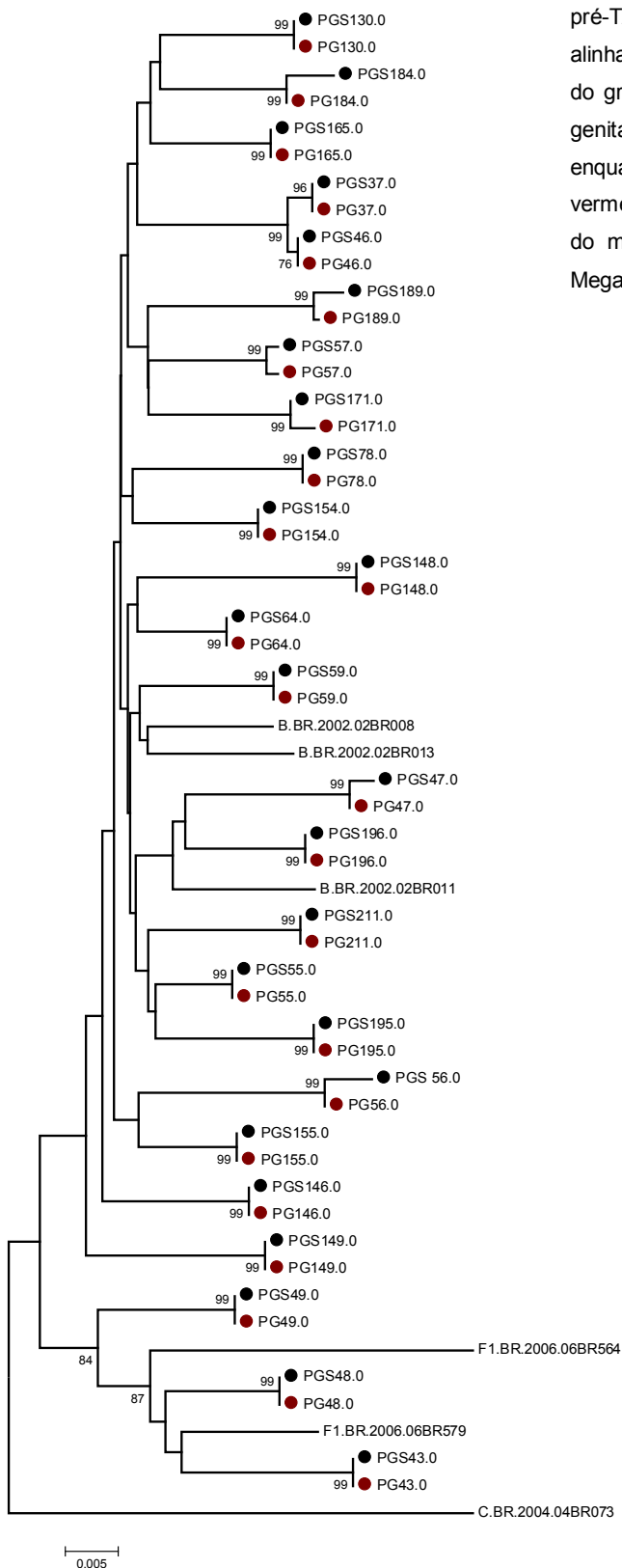


Figura 13: Análise filogenética do gene *pol* das amostras plasmáticas e genitais de HIV, no momento pré-TARV, demonstrando a concordância entre elas. O alinhamento foi realizado com amostras de referência do grupo M do HIV subtipo B e C e F1. As amostras genitais estão representadas com círculos em negrito, enquanto as plasmáticas estão com círculos vermelhos. A análise filogenética foi realizada através do método de *Neighbor joining* incluídas no pacote Mega 4.0.

4.6.2. Análise da Resistência Primária

A análise da resistência primária foi feita a partir do seqüenciamento das amostras de secreção obtidas no momento pré-TARV. Depois de editadas, as seqüências foram analisadas e um laudo descrevendo todas as mutações encontradas e seu impacto respectivo na ação de cada medicamento foi gerado para cada gestante presente neste estudo.

Além do laudo fornecido pelo programa Viroseq[®] versão 2.8, todas as seqüências foram submetidas ao algoritmo de Stanford para interpretação de resistência genotípica e comparação dos resultados obtidos (disponível em www.hivdb.stanford.edu).

Embora o objetivo principal desta análise fosse o de comparar os dados de resistência primária aos antirretrovirais previamente identificados no plasma (Pilotto *et al.*, 2011 submetido á publicação) com o compartimento genital, verificamos que, dentre as nove gestantes que apresentaram mutações de resistência primária no plasma, sete delas tiveram CV na secreção abaixo do limite de detecção do teste. Das duas com CV detectável, uma não foi possível amplificar a amostra viral e somente para uma das gestantes (PGS 57) pode-se proceder à genotipagem do HIV. A análise da seqüência obtida não revelou nenhuma mutação de resistência primária aos antirretrovirais, embora a presença da mutação K101E, associada à resistência aos inibidores não-nucleosídicos da transcriptase reversa, tenha sido verificada na amostra correspondente de plasma. Porém, algumas diferenças em polimorfismos foram observadas entre as seqüência de aminoácidos das amostra plasmática e genital (figura 15).

```

PGS57.0 PFVNIKVGQQ IKEALLDTGA DDPVLEDINL PGKWKPKMIG GIGGFIKVRQ YDQILIEICG HKAIGTVLVG IGPENPYNTP VFAIKKKIST KWRKLVDFRE LNKRTQDFWE
PG57.0 .L..... .T...MS. .R..... .E..... .T..... .S..... .E.R..... .L...

PGS57.0 VQLGIPHPAG LKKKKSVTVL DVGDAYFSVP LHEDFRKYTA FTIPSTNNET PGIRYQYNVL PQGWKGSPIA FQCSMTKILE PFRKQNPDIY IYQYMDLYV GSDLEIGQHR
PG57.0 A..... .E..... .K..... .Y...

PGS57.0 TKIEELRQHL LSWGLTTPDK KHQKEPFFLW MGYELHPDKW TVQPIQLPEK DSWTVNDIQK LVGKLNWASQ IYAGIKVKQL CKLLRGAKAL TEIVPLTAEA ELELAENREI
PG57.0 ..... .M..... .K..... .V.....

PGS57.0 LKEPVHGVYY DPSKDLIAEL QKQGQG
PG57.0 ..... .R.....

```

Figura 15: Alinhamento dos aminoácidos, correspondente à região da protease e transcriptase reversa do gene *pol* da amostra 57 nos compartimentos genital (PGS) e plasmático (PG) no momento de inclusão do estudo, onde se observa a possibilidade de compartimentalização, frente às diferenças de aminoácidos nas mesmas posições.

Dentre as 13 mulheres para as quais foi possível seqüenciar as amostras de HIV obtidas na secreção no pós-TARV, duas (15,2%) possuíam sua análise no início do estudo, antes da introdução do tratamento antirretroviral. A comparação entre as seqüências nestes dois momentos demonstrou a ocorrência de diferenças entre alguns polimorfismos tanto entre os dois momentos, como entre os compartimentos analisados. As demais mulheres, para as quais só dispúnhamos de amostras de secreção no pós-TARV, não apresentaram diferenças em relação aos polimorfismos quando comparadas ao compartimento plasmático.

Para estas duas gestantes que possuíam amostras nos dois momentos do estudo foi feita uma análise de seqüências de nucleotídeos em ambos os compartimentos e a partir dessa análise foi gerada uma árvore filogenética (Figura 16). A fim de verificar a ocorrência de polimorfismos, as seqüências de nucleotídeos obtidas para estas amostras foram traduzidas e as seqüências deduzidas de aminoácidos foram alinhadas. Estes resultados estão apresentados na figura 17, onde observamos cada uma delas. Observou-se que havia diferenças em alguns nucleotídeos, porém em nenhuma amostra foi detectada mutação de resistência aos antirretrovirais.

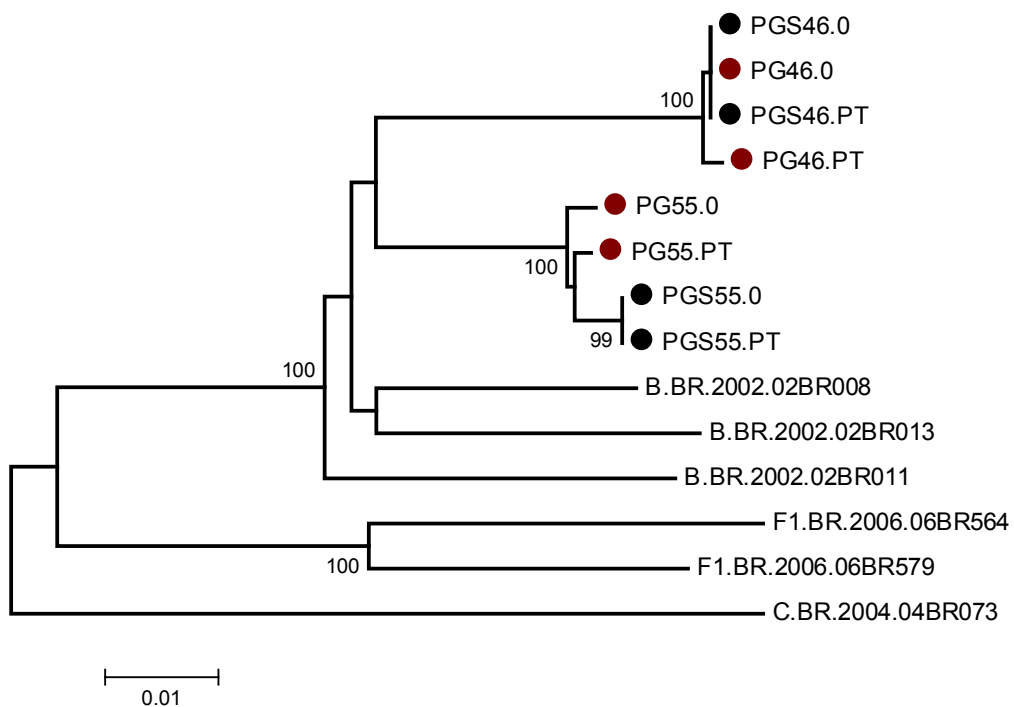


Figura 16: Análise filogenética do fragmento de 1200pb, correspondente a região da polimerase de amostras plasmáticas e genitais de cinco gestantes HIV positivas, indicando os agrupamentos nos dois compartimentos. As seqüências foram alinhadas com seqüências de referencia obtidas do Banco de dados de Los Alamos, representando os subtipos do grupo M. Valores de *bootstrap* estão representados na figura.

```

#PGS46.0  PQITLWQRPL VTIKIGGQLK EALLDTGADD TVLEEMNLPG RWKPKMIGGI GGFIVKVRQYD QILVEICGHR AIGTVLVGPT PVNIIGRNLL TQIGCTLNFP ISPIETVPVK LKPGMDGPKV
#PG46.0    .....
#PGS46.PT  .....
#PG46.PT   .....

#PGS46.0  KQWPLTEEKI KALVEICTEM EKEGKISKVG PENPYNTPIF AIKKKISTKW RKLVDFRELN KRTQDFWEVQ LGIPHPAGLK KKKSVTVLDV GDAYFSVPLD KDFRKYTAFT IPSTNNEQPG
#PG46.0    .....
#PGS46.PT  .....
#PG46.PT   .....

#PGS46.0  TRYQYNVLPQ GWKGSFAIFQ SSMTKILEPF RKQNPDIYIY QYMDDLYVGS DLEIGQHRIK IEELRQHLLR WGFTTPDKKH QKEPPFLWVG YELHPDKWTV QPIVLPEKDS WTVNDIQKLV
#PG46.0    .....
#PGS46.PT  .....
#PG46.PT   .....

#PGS46.0  GKLNWASQIY PGIRVKHLCK LLRGTKALTE VVPLTEEAEL ELAENREILK EPVHGVYDYP SKDLIAEIQK QGYG
#PG46.0    .....
#PGS46.PT  .....
#PG46.PT   .....

#PGS55.0  PQITLWQRPL VTIKIGGQLK EALLDTGADD TVLEEMNLPG RWKPKMIGGI GGFIVKVRQYD QIPIEICGQK AIGTVLVGPT PVNIIGRNLL TQIGCTLNFP ISPIETVPVK LKPGMDGPRV
#PG55.0    .....
#PGS55.PT  .....
#PG55.PT   .....

#PGS55.0  KQWPLTEEKI KALVEICTEM EKEGKISKIG PENPYNTPVF AIKKKISTKW RKLVDFRELN KRTQDFWEVQ LGIPHPAGLK KKKSVTVLDV GDAYFSVPLD KDFRKYTAFT IPSTNNETPG
#PG55.0    .....
#PGS55.PT  .....
#PG55.PT   .....

#PGS55.0  IRYQYNVLPQ GWKGSFAIFQ ASMTKILEPF RKQNPDLVIY QYMDDLYVGS DLEIGQHRTK IEELRQHLLR WGLTTPNKKH QKEPPFLWVG YELHPDKWTV QPIVLPEKDS WTVNDIQKLV
#PG55.0    .....
#PGS55.PT  .....
#PG55.PT   .....

#PGS55.0  GKLNWASQIY AGIKVKQLCK LLRGTKSLTE VVPLTEEAEL ELAENREILK EPVHGVYDYP SKDLIAEIQK QGQG
#PG55.0    .....
#PGS55.PT  .....
#PG55.PT   .....

```

Figura 17: Alinhamento dos aminoácidos, correspondente à região da transcriptase reversa do gene *pol* nos compartimentos genital (PGS) e plasmático (PG) em ambos os momentos do estudo, onde se observa a possibilidade de compartimentalização, frente às diferenças de aminoácidos nas mesmas posições.

4.6.3 Genotipagem da região da Protease e da Transcriptase Reversa nas secreções genitais

A análise de 24 amostras de secreção genital obtidas no momento pré-TARV e 13 no pós-TARV não revelou a ocorrência de mutações principais associadas com a resistência aos antirretrovirais. Entretanto mutações acessórias e alguns polimorfismos associados aos inibidores da protease e da transcriptase reversa foram detectados.

Região da Protease

Foi possível realizar o seqüenciamento e análise da região da protease do gene da polimerase viral para 23 mulheres no pré-TARV e para 13 no pós-TARV, num total de 36 seqüências. Os resultados dos polimorfismos e mutações acessórias encontram-se detalhados na figura 19. Em algumas amostras foram verificadas os polimorfismos L10I/V, I13V, K20I/M/R, M36I, A71V e V77I que estão associadas à redução de susceptibilidade aos medicamentos da classe dos IPs.

Pré-Tarv

A mutação L63P foi a mais prevalente, sendo detectada em 35% (8/23) das amostras. O polimorfismo L63P é freqüente e por isso sua incidência é elevada em pacientes em tratamento antirretroviral. A mutação L10I/V foi encontrada em 9% (2/23) das amostras. Esta mutação ocorre geralmente em 5 a 10% dos pacientes virgens de

tratamento, sendo esta uma mutação acessória responsável por conferir resistência aos IPs apenas quando presente com demais mutações.

A mutação acessória I13V encontrada em 9% (2/23) das amostras, é freqüentemente encontrada em pacientes tratados com inibidores de protease, de vírus geralmente pertencentes ao subtipo B e é uma mutação que confere baixa resistência ao TPV apenas quando presente em associação com outras mutações.

A mutação acessória M36I foi encontrada em 39% (9/23) das amostras. É uma mutação polimórfica que confere baixa resistência aos IPs quando em combinação com outras mutações e é uma assinatura freqüentemente encontrada nos subtipos não B.

A mutação V77I encontrada em 17 % (4/23) das mulheres estudadas é um polimorfismo freqüente que causa uma possível resistência ao NFV quando presente com demais mutações.

Pós-TARV

No momento após a interrupção da terapia houve um acréscimo destes polimorfismos e o surgimento da mutação D60E que foi encontrada em 16% (2/13) das amostras, apenas a L10I/V permaneceu constante, com os mesmos 9% iniciais.

A figura 18 ilustra a freqüência das mutações acessórias e polimorfismos na região da protease.

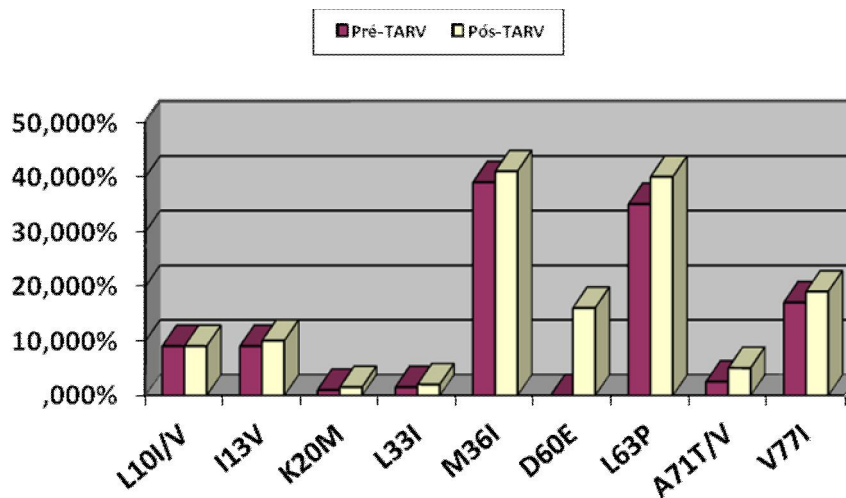


Figura 18: Prevalência de mutações acessórias e polimorfismo encontrados na região da protease do HIV para a população de mulheres analisadas.

Região da Transcriptase Reversa

A análise do gene da transcriptase reversa foi realizada para as 37 gestantes incluídas no estudo.

Em relação aos Inibidores nucleosídicos da TR não houve registro de mutação principal que conferisse algum grau de resistência aos medicamentos dessa classe. Contudo, algumas mutações acessórias foram identificadas.

Pré-TARV

A mutação acessória M41L presente em 8% das 37 mulheres estudadas, geralmente ocorre em conjunto com a mutação T215Y, onde juntas, conferem altos níveis de resistência ao AZT e d4T e níveis mais baixos de resistência aos ddl, ABC e TDF. A mutação M41L está presente em amostras como a PGS-70, porém, sem as

outras mutações não foi capaz de conferir, isoladamente, níveis consideráveis de resistência aos ITRN.

Em relação aos Inibidores não-nucleosídicos da RT, que incluem a Delavirdina (DLV), o Efavirenz (EFV) e a Nevirapina (NVP), não foi evidenciada mutação principal de resistência à esta classe de medicamento em nenhum dos momentos estudados.

Pós-TARV

No momento após a interrupção da terapia houve um aumento no número de mulheres com a mutação M41L de 8 para 23%. Houve também o incremento dos polimorfismos na posição G333D/E que foram encontrados em 15% das amostras.

A figura 19 ilustra a freqüência das mutações acessórias e polimorfismos na região da transcriptase reversa.

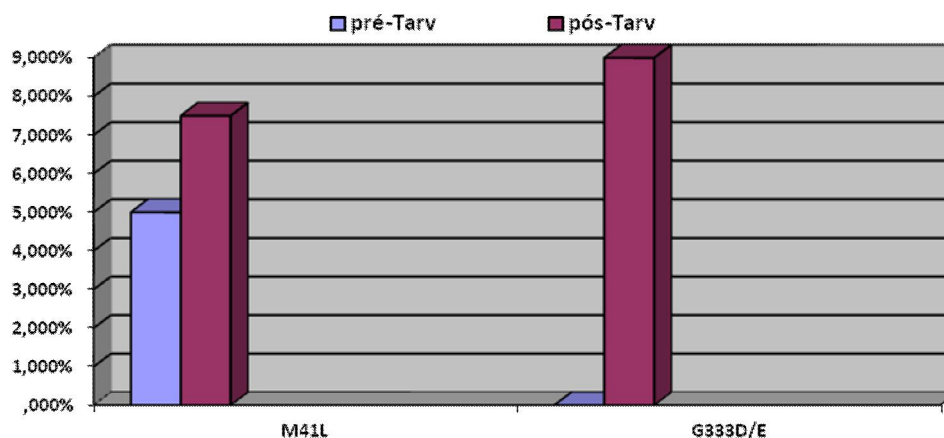


Figura 19: Prevalência de polimorfismos e mutações acessórias aos Inibidores da Transcriptase Reversa Nucleosídeos e Não – Nucleosídeos na população de mulheres analisadas.

5 Discussão

Os principais fatores envolvidos na transmissão vertical do HIV são a CV, o grau de imunodeficiência, fatores obstétricos e fetais e o aleitamento materno, entre outros. O estágio avançado da doença materna é fator de risco e taxas aumentadas de transmissão vertical são encontradas entre mães com imunodeficiência avançada (Duarte *et al.*, 2005). Neste contexto, tivemos a oportunidade de avaliar os parâmetros laboratoriais como contagem de linfócitos T CD4+ e quantificação da CV plasmática e genital em uma coorte de mulheres HIV positivas virgens de tratamento e após a suspensão do mesmo. A compartimentalização do HIV é o foco deste estudo, onde foram analisadas as cargas virais e os genomas virais presentes nas amostras de plasma e de secreção genital de uma população de gestantes HIV positivas e ainda não tratadas, assim como o impacto da retirada do TARV, na evolução destes parâmetros. Outros aspectos moleculares do HIV, como a análise filogenética e a genotipagem para identificação de resistência primária aos antirretrovirais, foram também investigados na tentativa de identificar possíveis associações entre estes dados, a compartimentalização viral e implicações na transmissão vertical do HIV.

Existem poucos estudos acerca da compartimentalização do HIV e sobre a associação entre a CV no plasma sanguíneo e no trato genital em mulheres, principalmente gestantes, comparados aos estudos com homens (Pasquier *et al.*, 2009, Osborne *et al.*, 2011). Entretanto, a compreensão da excreção do HIV entre estes dois compartimentos é fundamental para estudar os efeitos sistêmicos da terapia antirretroviral e a epidemiologia da transmissão vertical e heterossexual do HIV. A

compreensão da dinâmica viral neste compartimento é importante para melhorar as intervenções e diminuir a transmissão do vírus.

Embora os estudos evidenciem que a CV no trato genital geralmente é correspondente a CV plasmática (Fiore *et al.*, 2003; Vettore *et al.*, 2005; Kelley *et al.*, 2010), há evidências de compartimentalização entre o plasma e o trato genital (Kelley *et al.*, 2010). Conseqüentemente, a terapia antirretroviral pode nem sempre diminuir a níveis indetectáveis a CV no trato genital feminino, mesmo na ausência de uma co-infecção, como uma infecção sexualmente transmissível (IST).

Alguns estudos objetivaram correlacionar a excreção genital do HIV com a viremia plasmática e o uso de TARV. Na maioria deles, verificou-se uma forte correlação positiva entre CV plasmática e os níveis de excreção do HIV no trato genital feminino (Iversen 1999; Coombs *et al.*, 2003). Outros estudos sugerem que a viremia é o mais importante preditor da excreção genital do HIV (Kovacs *et al.*, 2001; Neely *et al.*, 2007, Morrison *et al.*, 2011), estando fortemente associada à probabilidade de transmissão do HIV. Além disso, pode-se observar rápida queda na excreção genital do vírus com a introdução da TARV (Graham *et al.*, 2007, Nagot *et al.*, 2008), em resposta a potente ação supressora dos esquemas terapêuticos combinados sobre a replicação viral (Cu-Uvin *et al.*, 1997).

Um estudo conduzido por Nagot em 2008, com mulheres HIV positivas de Burkina Faso virgens de tratamento, demonstrou que antes da introdução da terapia todas as mulheres apresentavam CV plasmática detectável e 72% delas possuíam excreção genital de RNA do HIV detectável. Após 18 semanas de uso de terapia, apenas uma (2,5%) apresentou CV detectável no plasma e duas delas (5,0%)

apresentaram excreção genital do vírus, demonstrando que a supressão da viremia é acompanhada pela supressão na excreção genital do HIV. Embora, em nossos resultados algumas mulheres apresentassem CV plasmática indetectável, antes da introdução de TARV, a grande maioria (91,3%) apresentava CV detectável neste momento. O número de pacientes que apresentava níveis indetectáveis de CV genital nesse momento era mais elevado (37%). Outros estudos similares também identificaram excreção genital do HIV, mesmo em mulheres com CV plasmática indetectável (Shields *et al.*, 2002, Garcia-Bujalance *et al.*, 2002, Iversen *et al.*, 2004).

No estudo original, a partir do qual derivamos o presente estudo, as gestantes foram submetidas à profilaxia para transmissão vertical do HIV com esquemas contendo Zidovudina (AZT) combinado com Lamivudina (3TC) e Nevirapina (NVP) ou Nelfinavir (NFV), sendo esta interrompida, logo após o parto, caso a mãe não tivesse indicação para continuar a terapia para sua própria saúde. Não houve nenhum caso de transmissão vertical (Pilotto *et al.*, 2011).

A contagem de células TCD4+ inferior a 350 céls/mm³ tem sido associada a um maior risco de transmissão vertical (European Collaborative Study, 1999). Entretanto, a maioria das mulheres incluídas no nosso estudo apresentava contagem de células TCD4+ maior que 350 céls/mm³ (83,7% das gestantes) o que pode ter influenciado positivamente a ausência de caso de transmissão vertical. Foi observada nessas pacientes uma grande variabilidade de CV, sendo que 75,6% apresentavam CV acima de 1.000 cópias/ml no plasma e 51,4% na secreção genital. O que está de acordo com outros estudos, em que a CV plasmática está, na maioria dos casos, mais alta que a CV genital (Cu-Uvin *et al.*, 2006; Campos *et al.*, 2008; Cu-Uvin *et al.*, 2010; Morrison *et al.*,

2010). Contudo, Chaudhary e colaboradores concluíram recentemente que um sistema imune íntegro contribui para a compartimentalização do vírus, através da manutenção das quasispécies no sangue e nas secreções genitais.

No nosso estudo, 43,5% das mulheres apresentavam uma CV detectável na secreção genital antes de iniciarem TARV, sendo essa prevalência maior do que as relatadas por outros autores (Spinillo *et al.*, 2001; Kovacs *et al.*, 2001; Cu-Uvin *et al.*, 2010). Entre essas, 58,1% apresentavam concordância quanto à detecção do RNA viral plasmática, com uma correlação positiva substancial (Debiaggi *et al.*, 2001; Coombs *et al.*, 2003).

Nossos resultados demonstram que o número de amostras genitais com CV indetectável foi bastante superior ao número de amostras plasmáticas com CV indetectável, o que corrobora com resultados já descritos na literatura (Nagot, *et al.*, 2008), demonstrando uma menor excreção de HIV nas secreções genitais ainda que a CV plasmática esteja elevada. Além disso, em função do volume restrito de secreção genital (30 µl) utilizado no ensaio de mensuração da CV, a sensibilidade do método fica também mais restrita (800 cópias/ml), o que limita a detecção de baixas CV (<1.000 cópias/ml).

Das mulheres com CV plasmática abaixo de 1.000 cópias/ml, 28% (5/18) e 38% (5/13), respectivamente nos momentos pré e pós TARV, tinham o vírus detectável no compartimento genital, com quantificações nas categorias acima de 1.000 cópias/ml, o que aponta para uma possível compartimentalização do vírus, corroborando com outros estudos que também apontam para tal fenômeno (Campos *et al.*, 2008, Vettore *et al.*, 2005, Barroso *et al.*, 2000, Cu-Uvin *et al.*, 2000, Fiore *et al.*, 2003, Nunnari *et al.*, 2005,

Kelley *et al.*, 2010). Observamos um quantitativo de CV substancialmente maior (acima de 5.000 cópias/ml de diferença) na secreção do que no plasma em 18 amostras.

Kovacs e colaboradores em 2001 detectaram HIV no compartimento genital de mulheres quando o vírus era indetectável no plasma, utilizando 500 cópias/ml como limite de detecção. Cerca de 28,5% das gestantes, neste estudo, apresentaram CV detectável acima de 1.000 cópias na secreção genital, enquanto no plasma a CV não passava de 1.000 cópias/ml. Cabe salientar, que duas delas possuíam CV plasmática abaixo do limite de detecção do teste (50 cópias/ml).

Recentemente, Cohen e colaboradores no estudo HPTN 052 compararam os resultados clínicos e as taxas de transmissão entre casais soro discordantes para o HIV. Nesse estudo, indivíduos HIV-positivos com contagens de células TCD4+ entre 350-550 células/mL foram aleatoriamente distribuídos para receber o tratamento imediatamente, ou para retardar a iniciação até preencher os critérios segundo as Diretrizes de Tratamento respectivas (TCD4+ inferior a 250). O ensaio divulgou seus resultados preliminares antes do previsto devido à forte evidência de que o acesso imediato à combinação de terapia antiretroviral em indivíduos HIV positivos com contagens de células TCD4+ entre 350-550 diminui a incidência de eventos clínicos graves em 40% e também o risco de transmissão ao seu parceiro HIV negativo em 96% (Cohen *et al.*, 2011)

Outros estudos sugerem que diferentes esquemas antirretrovirais podem exercer efeitos diferentes sobre a excreção do HIV em secreções genitais. Segundo Fiore e colaboradores (2003), a interrupção da terapia antiviral resultou em níveis detectáveis

do RNA do vírus tanto no plasma quanto na secreção genital, o que é confirmado por nossos resultados, visto que a CV aumenta após a descontinuidade da terapia.

Nossos resultados mostraram que uma alta contagem de células TCD4+, mesmo na ausência de CV no plasma não implica necessariamente a ausência do HIV nas secreções genitais. Um estudo conduzido por Kovacs e colaboradores em 2001 relatou semelhantes resultados, pois observaram uma associação significativa entre a excreção genital do HIV vaginal, o aumento da contagem de células TCD4+ e a introdução de TARV (Kovacs *et al.*, 2001).

O tratamento antirretroviral é capaz de suprimir a replicação viral no plasma e no compartimento genital, possibilitando a redução da transmissão vertical e heterossexual do vírus (Kovacs *et al.*, 2001, Saracino *et al.*, 2001, Cohen *et al.*, 2011).

No nosso estudo observamos que a CV estava aumentada nos dois compartimentos no momento após a interrupção da terapia antirretroviral (pós-TARV), quando 55,8% das mulheres tinham CV detectável na secreção genital. Este aumento da CV na secreção na grande maioria das vezes foi seguido por um aumento da viremia plasmática, o que corrobora com outros autores que relatam um incremento da CV após a suspensão de TARV (Philpott *et al.*, 2004, Tirado *et al.*, 2004b). Observamos ainda que cinco mulheres apresentavam CV elevada no compartimento genital na ausência de viremia, antes da introdução da terapia, o que também ocorreu com uma mulher após a suspensão do tratamento, aumentando o risco de transmissão heterossexual do HIV, neste caso. No entanto, os valores de CV obtidos no pós-TARV para os compartimentos plasmático e genital foram equivalentes aos verificados no momento pré-TARV.

Estudos anteriores que visaram outros compartimentos, tais como, fluido cérebro-espinhal (Schnell *et al.*, 2010, Christo *et al.*, 2011) e leite materno (Gant *et al.*, 2010, Salazar-Gonzalez *et al.*, 2011) documentaram a compartimentalização do HIV com seqüências virais de cada compartimento que, embora relacionadas filogeneticamente, possuíam distinção entre si (Tirado 2004a; Tirado 2004b; Bull *et al.*, 2009).

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

Em um estudo sobre transmissão vertical na Tanzânia, Renjifo e colaboradores em 2001 observaram que mães infectadas pelos subtipos A, C e recombinantes tinham mais tendência à transmissão vertical do que aquelas infectadas pelo subtipo D. Em 2003, Tàpia e colaboradores realizaram um estudo para avaliar se o subtipo de HIV poderia influenciar na transmissão vertical analisando 31 amostras de gestantes da Tanzânia (46% do subtipo A, 21% do subtipo C, 2,7% do subtipo D e 25% de formas recombinantes). Entre as oito mães transmissoras, quatro eram do subtipo A, um subtipo C, três recombinantes A/C e verificaram que não existia nenhuma diferença significativa na transmissibilidade do HIV entre os subtipos A, C, D e formas recombinantes.

No nosso estudo, a determinação do subtipo viral foi realizada de modo a confirmar a paridade entre as amostras plasmáticas e genitais, visto que as amostras plasmáticas já haviam sido subtipadas anteriormente. O subtipo evidenciado na maioria

das amostras (79,4%) foi o subtipo B. Entretanto, não tivemos como inferir alguma relação do subtipo com a transmissão vertical, visto que não houve crianças infectadas.

Variantes resistentes no trato genital feminino podem surgir como consequência da pressão seletiva dos medicamentos antirretrovirais e sua difusão e absorção no trato genital feminino. No estudo conduzido por Si-Mohamed e colaboradores em 2000 a seleção de variantes virais resistentes no compartimento genital foi sustentada pela absorção dos antirretrovirais e pela compartimentalização da replicação do HIV no trato genital feminino.

Em um estudo realizado na França em 2000, Vergne e colaboradores analisaram o gene da polimerase de 142 indivíduos virgens de tratamento, não encontrando nenhuma mutação primária de resistência às drogas antirretrovirais. No entanto, encontraram diversas mutações acessórias, principalmente no gene da protease, onde somente 5,6% das amostras não apresentaram mutações secundárias na protease.

Na nossa coorte, no compartimento plasmático, foi evidenciada uma prevalência de 10,6% de resistência transmitida, com 5,6% de mutações de resistência aos NRTIs, 2,0% aos NNRTIs e 3,0% de resistência aos IPs nas mulheres estudadas (Pilotto, 2011 submetido à publicação).

Apesar de não ter sido evidenciada nenhuma mutação de resistência primária nas amostras de secreção genital (mesmo a que apresentou mutação primária no plasma) concordando com outros estudos (De Pasquale *et al.*, 2003), o alinhamento de nucleotídeos demonstrou diferenças de aminoácidos entre as seqüências do plasma e da secreção genital na visita de entrada na coorte (pré-TARV), anterior à introdução da terapia, indicando que estas mulheres já foram infectadas com variantes virais

polimórficas, corroborando com outros estudos em que não são demonstradas mutações, porém diferenças nos polimorfismos das seqüencia de dois compartimentos (Tirado *et al.*, 2004a ; Gantt *et al.*, 2010). No entanto, serão necessários estudos adicionais, comparando clones obtidos a partir de amostras de plasma e de secreção genital para verificar com mais detalhes a segregação de populações minoritárias distintas entre estes dois compartimentos. O desenvolvimento de variantes de HIV resistentes às drogas tem sido uma das principais preocupações que contribuem para a transmissão do vírus (Ghosn *et al.*, 2004, Gant *et al.*, 2010).

Assim como no momento pré-TARV, nas amostras colhidas após a interrupção da terapia não foi evidenciada ocorrência de mutações principais. A árvore filogenética confirma o parentesco genético exato entre seis de 13 pares de variantes do HIV detectados em ambos os compartimentos, plasmático e genital neste momento. Entretanto, foram identificados alguns polimorfismos nas amostras de secreção genital que não estavam presentes antes da introdução de TARV. Estes dados são concordantes com outros estudos que observaram o surgimento de polimorfismos e algumas mutações secundárias após a interrupção da TARV, devido ao escape de polimorfismos e mutações de resistência na ausência de pressão seletiva exercida pelos antirretrovirais (Ghosn *et al.*, 2004).

A possibilidade de compartimentalização do HIV pode ocorrer em decorrência de diferentes fatores tais como a imunidade da gestante, a diferença de absorção das drogas nos compartimentos e o “surgimento” das quasispecies virais. Mesmo sob supressão com esquemas TARV, pode ocorrer um escape viral, o que aumenta a

possibilidade de transmissão sexual e vertical do HIV mesmo em indivíduos em tratamento e com CV plasmática baixa.

6 Conclusões

Nosso estudo retrata alguns aspectos importantes na análise comparativa dos compartimentos plasmático e genital quanto à dinâmica de CV e a ocorrência de populações virais distintas. Com base nos resultados deste trabalho, podemos concluir que:

1. A CV do HIV no plasma é um importante preditor da CV nas secreções genitais. Foi identificada uma correlação da CV genital com a CV no plasma. Entretanto, algumas mulheres apresentaram um perfil de CV distinto no plasma e na secreção genital, sugerindo que o compartimento genital pode funcionar como um reservatório para a replicação do HIV;
2. A persistência de CV nas secreções genitais, em alguns casos, sugere que mulheres tratadas podem permanecer com CV do HIV detectável e elevada nesse compartimento, potencializando o risco de transmissão heterossexual e vertical, apesar de não haver viremia;
3. A retirada da TARV leva a um incremento na CV genital, embora neste estudo esse incremento não tenha sido estatisticamente significativo devido ao baixo quantitativo de mulheres com amostras analisadas;

4. Não se observou diferença significativa entre as cargas virais detectadas nas secreções genitais nos momentos pré e pós-TARV;
5. O compartimento genital pode funcionar não somente para a replicação viral, mas também como um compartimento para a evolução e diferenciação do vírus.

7 Referências Bibliográficas

1. Anderson BL, Cu-Uvin S. "Pregnancy and optimal care of HIV-infected patients." *Clin Infect Dis*. 2009; 15; 48(4):449-55.
2. Andreoletti L, Skrabal K, Perrin V, Chomont N, Saragosti S, Gresenguet G, Moret H, Jacques J, Longo Jde D, Matta M, Mammano F, Belec L. "Genetic and phenotypic features of blood and genital viral populations of clinically asymptomatic and antiretroviral-treatment-naive clade a human immunodeficiency virus type 1-infected women." *J Clin Microbiol*.2007;45(6):1838-42.
3. Attia S, Egger M, Müller M, Zwahlen M, Low N. "Sexual transmission of HIV according to viral load and antiretroviral therapy: systematic review and meta-analysis". *AIDS*. 2009; 17;23(11):1397-404.
4. Barreto CC, Nishyia A, Araújo LV, Ferreira JE, Busch MP, Sabino EC. "Trends in antiretroviral drug resistance and clade distributions among HIV-1--infected blood donors in Sao Paulo, Brazil". *J Acquir Immune Defic Syndr*, 2006;41(3):338-41.
5. Barroso PF, Schechter M, Gupta P, Melo MF, Vieira M, Murta FC, Souza Y, Harrison LH. "Effect of antiretroviral therapy on HIV shedding in semen." *Ann Intern Med*. 2000 Aug 15;133(4):280-4.
6. Bello G, Eyer-Silva WA, Couto-Fernandez JC, Guimarães ML, Chequer-Fernandez SL, Teixeira SL, Morgado MG. Demographic history of HIV-1 subtypes B and F in Brazil. *Infect Genet Evol*. 2007;7(2):263-70.

7. Boer K, Nellen JF, Patel D, Timmermans S, Tempelman C, Wibaut M, Sluman MA, van der Ende ME, Godfried MH. "The AmRo study: pregnancy outcome in HIV-1-infected women under effective highly active antiretroviral therapy and a policy of vaginal delivery." *BJOG*. 2007;114(2):148-55.
8. Bonguertz V. "Vertical Human Immunodeficiency Virus Type 1 - HIV-1-Transmission . A Review." *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, 2001; Vol. 96(1): 1-14.
9. Boom R, Sol CJ, Salimans MM, Jansen CL, Wertheim-van Dillen PM, van der Noordaa J. "Rapid and simple method for purification of nucleic acids." *J Clin Microbiol*, 1990; 28(3):495-503.
10. Brindeiro RM, Diaz RS, Sabino EC, Morgado MG, Pires IL, Brigido L, Dantas MC, Barreira D, Teixeira PR, Tanuri A; Brazilian Network for Drug Resistance Surveillance. "Brazilian Network for HIV Drug Resistance Surveillance (HIV-BResNet): a survey of chronically infected individuals." *AIDS*. 2003; 2;17(7):1063-9.
11. Bull M, Learn G, Genowati I, McKernan J, Hitti J, Lockhart D, Tapia K, Holte S, Dragavon J, Coombs R, Mullins J, Frenkel L. 2009. "Compartmentalization of HIV-1 within the female genital tract is due to monotypic and low-diversity variants not distinct viral populations." *PLoS One*. 2009; 22;4(9):e71.
12. Bulterys M, Lepage P. 1998. "Mother-to-child transmission of HIV". *Curr Opin Pediatr*.1998; 10(2):143-50.

13. CÂMARA C & OLIVEIRA R. “Manual: Implicações Éticas do Diagnóstico e da Triagem Sorológica do HIV / Secretaria Vigilância em Saúde, Programa Nacional de DST e Aids.” – Brasília: Ministério da Saúde, 2004.
14. Campos A, Amaral E, Levi JE, Portugal P, Villarroel M, Bezerra KC, Silva MT, Morais SS. 2008. “HIV vaginal viral load in Brazilian HIV-infected women.” *Rev Assoc Med Bras.* 2008;54 (1):67-71.
15. Chasela C., Hudgens M., Jamieson D., Dumbani Kayira M., Hosseinipour M., M.D., Martinson A., Gerald Tegha G., Knight R., Ahmed Y., B.M., Kamwendo D., Hoffman I., Ellington S., Kacheche Z., Soko A., Wiener J., Fiscus S., Kazembe P., Mofolo I., Chigwenembe M., R.N., Sichali D., Horst C., & BAN Study Group*. “Maternal or Infant Antiretroviral Drugs to Reduce HIV-1 Transmission.” *N Engl J Med,* 2010;362:2271-81.
16. Chaudhary S, Noel RJ, Rodríguez N, Collado S, Munoz J, Kumar A, Yamamura Y. 2011. “Correlation between CD4 T cell counts and virus compartmentalization in genital and systemic compartments of HIV-infected females.” *Virology.* 1;417(2):320-6.
17. Chersich MF, Luchters SM, Yard E, Othigo JM, Kley N, Temmerman M. ” Morbidity in the first year postpartum among HIV-infected women in Kenya.” *Int J Gynaecol Obstet.* 2008; 100(1):45-51.
18. Christo PP, Greco DB, Aleixo AW, Livramento JA. “Analysis of correlation between cerebrospinal fluid and plasma HIV-1 RNA levels in patients with neurological opportunistic diseases.” *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 2011; 53(4):193-6.

19. Chuachoowong R, Shaffer N, Siriwasin W, Chaisilwattana P, Young NL, Mock PA, Chearskul S, Waranawat N, Chaowanachan T, Karon J, Simonds RJ, Mastro TD. "Short-course antenatal zidovudine reduces both cervico-vaginal human immunodeficiency virus type 1 RNA levels and risk of perinatal transmission." *J. Infect Dis*, 2000; 181(1):99-106.
20. Cohen MS, Chen YQ, McCauley M, Gamble T, Hosseinipour MC, Kumarasamy N, Hakim JG, Kumwenda J, Grinsztejn B, Pilotto JH, Godbole SV, Mehendale S, Chariyalertsak S, Santos BR, Mayer KH, Hoffman IF, Eshleman SH, Piwowar-Manning E, Wang L, Makhema J, Mills LA, de Bruyn G, Sanne I, Eron J, Gallant J, Havlir D, Swindells S, Ribaud H, Elharrar V, Burns D, Taha TE, Nielsen-Saines K, Celentano D, Essex M, Fleming TR; HPTN 052 Study Team. 2011. "Prevention of HIV-1 infection with early antiretroviral therapy." *N Engl J M*. 2011;11;365(6):493-505.
21. Consenso Brasileiro para Terapia Antiretroviral, 2008. Acessado em maio 2010. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/recomendacao_terapia.pdf.
22. Coombs RW, Reichelderfer PS, Landay AL. Recent observations on HIV type- 1 infection in the genital tract of men and women. *AIDS* 2003;17:455-80.
23. Coombs RW, Wright DJ, Reichelderfer PS, Burns DN, Cohn J, Cu-Uvin S, Baron PA, Cohen MH, Landay AL, Lewis S, Kovacs A; Women's Health Study 001 Team. "Variation of human immunodeficiency virus type 1 viral RNA levels in the female genital tract: implications for applying measurements to individual women." *J Infect Dis*. 2001;184(9):1187-91.

24. Craigo JK, Patterson BK, Paranjpe S, Kulka K, Ding M, Mellors J, Montelaro RC, Gupta P. "Persistent HIV type 1 infection in semen and blood compartments in patients after long-term potent antiretroviral therapy." *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2004; 20(11):1196-209.
25. Cu-Uvin S, Caliendo AM. "Genital tract HIV-1 RNA shedding among women with below detectable plasma viral load." *AIDS*. 2011 ;25(6):880-1.
26. Cu-Uvin S, Caliendo AM, Reinert S, Chang A, Juliano-Remollino C, Flanigan TP, Mayer KH, Carpenter CC. "Effect of highly active antiretroviral therapy on cervicovaginal HIV-1 RNA." *AIDS*. 2000; 10;14(4):415-21.
27. Cu-Uvin S, DeLong AK, Venkatesh KK, Hogan JW, Ingersoll J, Kurpewski J, De Pasquale MP, D'Aquila R, Caliendo AM. "Genital tract HIV-1 RNA shedding among women with below detectable plasma viral load." *AIDS*. 2010; 23;24(16):2489-97.
28. Cu-Uvin S, Snyder B, Harwell JI, Hogan J, Chibwasha C, Hanley D, Ingersoll J, Kurpewski J, Mayer KH, Caliendo AM. "Association between paired plasma and cervicovaginal lavage fluid HIV-1 RNA levels during 36 months." *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2006;15;42(5):584-7.
29. Debiaggi M, Zara F, Spinillo A, De Santolo A, Maserati R, Bruno R, Sacchi P, Achilli G, Pistorio A, Romero E, Filice G. "Viral excretion in cervicovaginal secretions of HIV-1-infected women receiving antiretroviral therapy." *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2001;20:91-6.
30. Deeks SG. Transmitted Minority Drug-Resistant HIV Variants: A New Epidemic?. *Plosmedicine*; July 2008, Volume 5, Issue 7;e164;disponível em www.plosmedicine.org

31. De Pasquale MP, Leigh Brown AJ, Uvin SC, Allega-Ingersoll J, Caliendo AM, Sutton L, Donahue S, D'Aquila RT. "Differences in HIV-1 pol sequences from female genital tract and blood during antiretroviral therapy." *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2003; 1;34(1):37-101.
32. Deschamps MM, Pape JW, Hafner A, Johnson WD, Jr. "Heterosexual Transmission of HIV in Haiti." *Ann Intern Med*,1996;125:324-30.
33. Devereux HL, Burke A, Lee CA, Johnson MA. "In vivo HIV-1 compartmentalization: drug resistance-associated mutation distribution." *J Med Virol*, 2002; 66:8-12.
34. Delwart EL, Mullins JI, Gupta P, Learn GH Jr, Holodniy M, Katzenstein D, Walker BD, Singh MK. " Human immunodeficiency virus type 1 populations in blood and semen." *J Virol.* 1998 ;72(1):617-23
35. Diaz RS, Filho AC 2004. HIV 50 FAQ Frequently Asked Questions.
36. Duarte G, Quintana S. "Fatores que influenciam a transmissão vertical do vírus da imunodeficiência humana tipo 1." *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*, 2005;27 (11): 698-705.
37. Ellerbrock TV, Lennox JL, Clancy KA, Schinazi RF, Wright TC, Pratt-Palmore M, Evans-Strickfaden T, Schnell C, Pai R, Conley LJ, Parrish-Kohler EE, Bush TJ, Tatti K, Hart CE. "Cellular replication of human immunodeficiency virus type 1 occurs in vaginal secretions." *J Infect Dis.*2001;184(1):28-36.

38. Eyer-Silva WA, Morgado MG. "Molecular epidemiology of HIV-1 infection in a small Brazilian county: usefulness of envelope and polymerase sequences to epidemiologic studies." *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2006;15;41(5):664-70.
39. Epidemia de VIH nos países de língua oficial portuguesa Situação atual e perspectivas futuras rumo ao acesso universal à prevenção, tratamento e cuidados, 2ª edição, ONUSIDA-Brasil. 2010.
40. Fiore JR, Suligoï B, Saracino A, Di Stefano M, Bugarini R, Lepera A, Favia A, Monno L, Angarano G, Pastore G. "Correlates of HIV-1 shedding in cervicovaginal secretions and effects of antiretroviral therapies." *AIDS* ,2003;17:2169-76.
41. Fiore JR, Suligoï B, Monno L, Angarano G, Pastore G. "HIV-1 shedding in genital tract of infected women." *Lancet.* 2002; 27;359(9316):1525-6.
42. Fiore JR . Suligoï B , Saracino A , Di Stefano M , R Bugarini , Lepera A , Favia A , Monno L , Angarano G , G Pastore . "Correlates of HIV-1 shedding in cervicovaginal secretions and effects of antiretroviral therapies." *AIDS.* 2003; 17 (15): 2169-76.
43. Fleming DT, Wasserheit JN. "From epidemiological synergy to public health policy and practice: the contribution of other sexually transmitted diseases to sexual transmission of HIV infection." *Sex Transm Infect.*, 1999;75(1):3-17.
44. Garcia-Bujalance S, Ruiz G, De Guevara CL, Pena JM, Bates I, Vazquez JJ, Gutierrez A. 2004. "Quantitation of human immunodeficiency virus type 1 RNA loads in cervicovaginal secretions in pregnant women and relationship between viral loads in the genital tract and blood." *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2004;23:111-5.

45. Ghosn J, Viard JP, Katlama C, de Almeida M, Tubiana R, Letourneur F, Aaron L, Goujard C, Salmon D, Leruez-Ville M, Rouzioux C, Chaix ML. 2004. "Evidence of genotypic resistance diversity of archived and circulating viral strains in blood and semen of pre-treated HIV-infected men." *AIDS*. 20;18(3):447-57.
46. Gonzalez CR, Alcalde R, Nishiya A, Barreto CC, Silva FE, de Almeida A, Mendonça M, Ferreira F, Fernandes SS, Casseb J, Duarte AJ. "Drug resistance among chronic HIV-1-infected patients naïve for use of antiretroviral therapy in Sao Paulo city". *Virus Res*. 2007; 129(2):87-90.
47. Graham SM, Holte SE, Peshu NM, Richardson BA, Panteleeff DD, Jaoko WG, Ndinya-Achola JO, Mandaliya KN, Overbaugh JM, McClelland RS. "Initiation of antiretroviral therapy leads to a rapid decline in cervical and vaginal HIV-1 shedding." *AIDS*, 2007; 21:501-7.
48. Guimarães ML, Eyer-Silva WA, Couto-Fernandez JC, Morgado MG. Identification of two new CRF_BF in Rio de Janeiro State, Brazil. *AIDS*. 2008; 30;22(3):433-5.
49. HIV Medicine. Acessado em maio de 2011. Disponível em www.hivmedicine.com.
50. Inocência LA, Pereira AA, Sucupira MC, Fernandez JC, Jorge CP, Souza DF, Fink HT, Diaz RS, Becker IM, Suffert TA, Arruda MB, Macedo O, Simão MB, Tanuri A. "Brazilian Network for HIV Drug Resistance Surveillance: a survey of individuals recently diagnosed with HIV." *J Int AIDS Soc*.2009;12(1):20.

51. Islam S, Oon V, Thomas P. "Outcome of pregnancy in HIV-positive women planned for vaginal delivery under effective antiretroviral therapy." *J Obstet Gynaecol.* 2010;30(1):38-40.
52. Iversen AK, Attermann J, Gerstoft J, Fugger L, Mullins JI, Skinhoj P. "Longitudinal and cross-sectional studies of HIV-1 RNA and DNA loads in blood and the female genital tract". *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.*, 2004;117:227.
53. Jaspan HB, Liebenberg L, Hanekom W, W Burgers, Coetzee D, Williamson AL, F Pouco, Myer L, Coombs RW, Sodora D, JA Passmore. Immune activation in the female genital tract during HIV infection predicts mucosal CD4 depletion and HIV shedding.. *J Infect Dis.* 2011 Nov 15; 204 (10) :1550-6.
54. Johansson EL, Rudin A, Wassen L, Holmgren J. Distribution of lymphocytes and adhesion molecules in human cervix and vagina. *Immunology* 96: 272-277, 1999.
55. Johansson M, Lycke NY. Immunology of the human genital tract. *Curr Opin Infect Dis* 16: 43-49,2003.
56. Kandathil AJ, Ramalingam S, Kannangai R, David S, Sridharan G. Molecular epidemiology of HIV. *Indian J Med Res*,2005;121(4):333-344.
57. Kelley CF, Sullivan ST, Lennox JL, Evans-Strickfaden T, Hart CE. "Lack of effect of compartmentalized drug resistance mutations on HIV-1 pol divergence in antiretroviral-experienced women." *AIDS.* 2010;1;24(9):1361-6.
58. Kemal KS, Foley B, Burger H, Anastos K, Minkoff H, Kitchen C, Philpott SM, Gao W, Robison E, Holman S, Dehner C, Beck S, Meyer WA 3rd, Landay A, Kovacs A, Bremer J, Weiser B. "HIV-1 in genital tract and plasma of women:

compartmentalization of viral sequences, coreceptor usage, and glycosylation.” Proc Natl Acad Sci U S A. 2003; 28;100(22):12972-7.

59. Kovacs A, Wasserman SS, Burns D, Wright DJ, Cohn J, Landay A, Weber K, Cohen M, Levine A, Minkoff H, Miotti P, Palefsky J, Young M, Reichelderfer P; DATRI Study Group; WIHS Study Group. “Determinants of HIV-1 shedding in the genital tract of women.” Lancet. 2001 Nov 10;358 (9293):1593-601. Errata em: Lancet 2002 Feb 16;359(9306):630.

60. Lal RB, Chakrabarti S e Yang C. Impact of genetic diversity of HIV-1 on diagnosis, antiretroviral therapy & vaccine development. Indian J Med Res. 2005;121(4):287-314.

61. Marins JR, Jamal LF, Chen SY, Barros MB, Hudes ES, Barbosa AA, Chequer P, Teixeira PR, Hearst N. “Dramatic improvement in survival among adult Brazilian.” AIDS patients. AIDS, 2003; 17:1675-1682.

62. “Maternal viral load and vertical transmission of HIV-1: an important factor but not the only one. The European Collaborative Study.” AIDS. 1999 Jul 30;13(11):1377-85.

63. Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico DST/AIDS - Ano 2008.

Acessado em maio de 2011. Disponível em:
http://www.aids.gov.br/sites/default/files/Boletim2007_internet090108.pdf

64. Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico DST/AIDS - Ano V, N.1 - 1^a a 26^a Semanas Epidemiológicas 2008. Acessado em maio de 2011. Disponível em:
http://www.aids.gov.br/sites/default/files/Boletim2008_versao1_6.pdf.

65. Morgado MG, Sabino E, Sphaer E, Bongertz V, Brígido L, Guimarães MD, Castilho EA, Galvão-Castro B, Mullins J, Hendry RM, Mayer A. 1994 Polymorphism in the V3 region of the envelope protein of HIV-1 in Brazil: Divergence from prevalent NorthAmerican/European subtype B strains and identification of newly described F subtype. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*.10: 569-576.
66. Morgado, M; Velasco-Castro CA; Gaido C; Rodrigues-Pedro A; and Pilotto JH. Emergence of subtype K-like recombinant HIV-1 samples in an outskirts area of Rio de Janeiro. *AIDS VACCINE 2008*; 13-16 october, Cape Town, África do Sul. *AIDS RESEARCH AND HUMAN RETROVIRUSES* vol.24, (supplement 1): 155-156
67. Morrison CS, Chen PL, Nankya I, Rinaldi A, Van Der Pol B, Ma YR, Chipato T, Mugerwa R, Dunbar M, Arts E, Salata RA. "Hormonal contraceptive use and HIV disease progression among women in Uganda and Zimbabwe." *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2011;1;57(2):157-64.
68. Murthy MB, Krishnamurthy B. "Safety of single-dose nevirapine for prevention of vertical transmission of human immunodeficiency virus infection". *Indian J Pharmacol*. 2011; 43(2):207-9.
69. Nagot N, Ouedraogo A, Weiss HA, Konate I, Sanon A, Defer MC, Sawadogo A, Andonaba JB, Vallo R, Becquart P, Segondy M, Mayaud P, Van de PP. Longitudinal effect following initiation of highly active antiretroviral therapy on plasma and cervicovaginal HIV-1 RNA among women in Burkina Faso. *Sex Transm Infect* 2008;84:167-70

70. Nigatu T, Woldegebriel Y. "Analysis of the Prevention of Mother-to-Child Transmission (PMTCT) Service utilization in Ethiopia: 2006-2010." *Reprod Health*.2011;16;8:6.
71. Nunnari G, Sullivan J, Xu Y, Nyirjesy P, Kulkosky J, Cavert W, Frank I, Pomerantz RJ. "HIV type 1 cervicovaginal reservoirs in the era of HAART." *AIDS Res Hum Retroviruses*.2005; 21(8):714-8.
72. Neely MN , Benning L , J Xu , Strickler HD , RM Greenblatt , Minkoff H , M Jovem , Bremer J , Levine AM , Kovacs A . "Cervical shedding of **HIV-1** RNA among women with low levels of viremia while receiving highly active antiretroviral therapy." *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2007;44 (1) :38-42.
73. Newell, M. L., G. Gray, Bryson YJ. "Prevention of mother-to-child transmission of HIV-1 infection." *Aids*, 1997; 11 Suppl A: S165-72.
74. Osborne BJ, Sheth PM, Kovacs C, Mazzulli T, Kaul R. "Impact of Collection Method on Assessment of Semen HIV RNA Viral Load." *PLoS One*. 2011;6(8):e23654.
75. Pasquier CJ , Moinard N , K Sauné , Souyris C , Lavit M , Daudin M , Izopet J , L Buján . "Persistent differences in the antiviral effects of highly active antiretroviral therapy in the blood and male genital tract." *AIDS*. 2008; (14) :1894-6.
76. Pasquier C, Sauné K, Raymond S, Moinard N, Daudin M, Bujan L, Izopet J. "Determining seminal plasma human immunodeficiency virus type 1 load in the context of efficient highly active antiretroviral therapy." *J Clin Microbiol*. 2009; 47(9):2883-7.
77. Philpott S, Burger H, Tsoukas C, Foley B, Anastos K, Kitchen C, Weiser B. "Human immunodeficiency virus type 1 genomic RNA sequences in the female genital

tract and blood: compartmentalization and inpatient recombination.” *J Virol.*2005;79:353-63.

78. Pilotto JH, Grinsztejn B, Veloso V, Velasque I, Friedman R, Moreira R, Rodrigues-Pedro A, Muri S, Currier J, Morgado M. “Prevalence of transmitted drug-resistance mutations among HIV positive pregnant women in Rio de Janeiro, Brazil”. 2011. Submetido á publicação.

79. Pilotto JH, Velasque LS, Friedman RK, Moreira RI, Veloso VG, Grinsztejn B, Morgado MG, Watts DH, Currier JS, Hoffman RM. “Maternal outcomes after HAART for the prevention of mother-to-child transmission in HIV-infected women in Brazil.” *Antivir Ther.* 2011; 16(3):349-56.

80. Plantier, J.-C., et al. 2009. A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. *Nat. Med.* **15**:871-872.

81. Prakash M, S Patterson, Kapembwa MS. . Avaliação da técnica de amostragem cervical escova cytobrush para a preparação de células mononucleares CD45 + do colo do útero humano *J Immunol Methods.* 2001; 258 . :37-46 .

82. Pudney J, Oneta M, Mayer K, Seage G, Anderson D. “Pre-ejaculatory fluid as potential vector for sexual transmission of HIV-1.” *Lancet.*1992; 12;340 (8833):1470.

83. Pudney J, Quayle AJ, Anderson DJ. Immunological microenvironments in the human vagina and cervix: mediators of cellular immunity are concentrated in the cervical transformation zone. *Biol Reprod* 73: 1253-1263, 2005.

84. Quayle AJ. The innate and early immune response to pathogen challenge in the female genital tract and the pivotal role of epithelial cells. *J Reprod Immunol* 57: 61-79, 2002.
85. Read JS & THE INTERNACIONAL PERINATAL HIV GROUP. "The mode of delivery and the risk of vertical transmission of human immunodeficiency virus type 1. A Meta-analysis of 15 prospective cohort studies." *NEJM*. 1999; 340(13):977-987.
86. Renjifo B, Fawzi W, Mwakagile D, Hunter D, Msamanga G, Spiegelman D, Garland M, Kagoma C, Kim A, Chaplin B, Hertzmark E, Essex M. Differences in perinatal transmission among human immunodeficiency virus type 1 genotypes. *J Hum Virol.*,2001; 4(1):16-25.
87. Rothenberg RB, Wasserheit JN, St Louis ME, Douglas JM. "The effect of treating sexually transmitted diseases on the transmission of HIV in dually infected persons: a clinic-based estimate. Ad Hoc STD/HIV Transmission Group." *Sex Transm Dis*. 2000;27(7):411-6.
88. Sá-Ferreira JA, Brindeiro PA, Chequer-Fernandez S, Tanuri A, Morgado MG. "Human immunodeficiency virus-1 subtypes and antiretroviral drug resistance profiles among drug-naïve Brazilian blood donors." *Transfusion*. 2007; 47(1):97-102.
89. Salazar-Gonzalez JF, Salazar MG, Learn GH, Fouda GG, Kang HH, Mahlokozera T, Wilks AB, Lovingood RV, Stacey A, Kalilani L, Meshnick SR, Borrow P, Montefiori DC, Denny TN, Letvin NL, Shaw GM, Hahn BH, Permar SR; Center for HIV/AIDS Vaccine Immunology A0167854. "Origin and evolution of HIV-1 in breast milk determined by single-genome amplification and sequencing." *J Virol*. 2005; 79(6): 2751-63.

90. Saracino A, Di Stefano M, Vimercati A, Greco P, Fiore JR, Monno L, Angarano G, Pastore G." Cervicovaginal HIV-1 shedding in pregnant women near delivery." *Antivir Ther.*, 2001; 6(1):79-81.
91. Schnell G, Price RW, Swanstrom R, Spudich S. "Compartmentalization and clonal amplification of HIV-1 variants in the cerebrospinal fluid during primary infection." *J Virol.* 2010; 84(5):2395-407. 16.
92. Shafer RW. Genotypic testing for human immunodeficiency virus type 1 drug resistance. *Clin Microbiol Rev.* 2002. 15: 247-77
93. Shields JW. "HIV-1 shedding in genital tract of infected women. " *Lancet*, 2002;359:1526.
94. Si-Mohamed A, Kazatchkine MD, Heard I, Goujon C, Prazuck T, Aymard G, Cessot G, Kuo YH, Bernard MC, Diquet B, Malkin JE, Gutmann L, Bélec L. "Selection of drug-resistant variants in the female genital tract of human immunodeficiency virus type 1-infected women receiving antiretroviral therapy." *J Infect Dis.* 2001;182(1):112-22.
95. Sperling, R. S., D. E. Shapiro, D. Coombs R., Tood J., Herman S., McSherry G., Dyke R., Jimenez E., Rouzioux C., Sullivan J., PACTG 076 Group. "Maternal viral load, zidovudine treatment, and the risk of transmission of human immunodeficiency virus type 1 from mother to infant. Pediatric AIDS Clinical Trials Group Protocol 076 Study Group." *N Engl J Med*, 1996; 335(22): 1621-9.
96. Spinillo A, Debiaggi M, Zara F, De Santolo A, Polatti F, Filice G."Human immunodeficiency virus type 1-related nucleic acids and papillomavirus DNA in

cervicovaginal secretions of immunodeficiency virus-infected women.” *Obstet Gynecol*; 2001; 97(6):999-1004.

97. Sucupira MC, Souza IE, Costa LJ, Scheinberg MA, Diaz RS. “Antiretroviral treatment failure and HIV-1 genotypic resistance in Sao Paulo, Brazil”. *Antivir Ther*.2006;6(4):263-4.

98. Sullivan ST, Mandava U, Evans-Strickfaden T, Lennox JL, Ellerbrock TV, Hart CE. “Diversity, divergence, and evolution of cell-free human immunodeficiency virus type 1 in vaginal secretions and blood of chronically infected women: associations with immune status.” *J Virol*. 2005; 79(15):9799-809.

99. Szwarcwald CL; Bastos FI; Esteves MAP, Andrade CLT. A disseminação da epidemia da AIDS no Brasil, no período de 1987-1996: uma análise espacial. *Cad. Saúde Pública*, 2000; 16(Sup.1):7-19.

100. Tamura K., Dudley J, Nei M., Kumar. Mega 4.0- Molecular Evolutionary Genetics Analysis-mega/.softeare version 4.0. Molecular.” *Biology and Evolution*, 2007; 24:1596-1599.

101. Tápia N, Franco S, Puig-Basagoiti F, Menéndez C, Alonso PL, Mshinda H, Clotet B, Saiz JC, Martinez MA.” Influence of human immunodeficiency vírus type 1 subtype on mother-to-child transmission.” *J Gen Virol*. 2003; 84:607-613.

102. Tirado G, Jove G, Kumar R, Noel RJ, Reyes E, Sepulveda G, Yamamura Y, Kumar A. “Compartmentalization of drug resistance-associated mutations in a treatment-naive HIV-infected female.” *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2004a; 20(6):684-6.

103. Tirado G, Jove G, Kumar R, Noel RJ, Reyes E, Sepulveda G, Yamamura Y, Kumar A. "Differential virus evolution in blood and genital tract of HIV-infected females: evidence for the involvement of drug and non-drug resistance-associated mutations". *Virology*. 2004b;1;324(2):577-86.
104. Thea DM, Steketee RW, Pliner V, Bornschlegel K, Brown T, Orloff S Matheson PB, Abrams EJ, Bamji M, Lambert G, Schoenbaum EA, Thomas PA, Heagarty M, Kalish ML. "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*, 1997; 11(4):437-444.
105. UNAIDS/WHO AIDS Epidemic Update: Acessado em maio de 2011. [Internet]. Disponível em: <http://www.unaids.org>.
106. Unicef. Acessado em maio de 2011. Disponível em: <http://www.unicef.org/aids/index.html>.
107. Uvin SC, Anderson D, Parekh B. Human immunodeficiency virus-1 shedding in the genital tract of a female long-term nonprogressor without detectable plasma human immunodeficiency virus ribonucleic acid. *Am J Obstet Gynecol* 1997;177:490-1.
108. VELASCO-de-CASTRO, C. A.; GRINSZTEJN, B.; MORGADO, M. "HIV - 1 incidence, prevalence and social-demographic profile in VCTs of Rio de Janeiro State, Brazil. In: XVI International AIDS Conference, 2006.
109. Vergara TRC; Barroso PF. Transmissão sexual do HIV. Tendências em HIV "AIDS, 2006; 4 (Volume 1): 17-24.

110. Vettore MV, Schechter M, Melo MF, Boechat LJ, Barroso PF. " Genital HIV-1 viral load is correlated with blood plasma HIV-1 viral load in Brazilian women and is reduced by antiretroviral therapy." *J Infect*, 2006 ;52:290-3.
111. Vergne L, Peeters M, Mpouli-Ngole E, Bourgeois A, Liegeois F, Toure-Kane C, Mboup S, Mulanga-Kabeya C, Saman E, Jourdan J, Reynes J, Delaporte E. "Genetic diversity of protease and reverse transcriptase sequences in non-subtype-B human immunodeficiency virus tpe 1 strains: evidence of many minor drug resistance mutations in treatment naive patients." *J. Clin Microb*, 2000; 38(11):3919-3925.
112. Wasserheit JN. "Epidemiological synergy. Interrelationships between human immunodeficiency virus infection and other sexually transmitted diseases". *Sex Transm Dis*, 1992: 19(2):61-77.
113. Weinberg A., Forster-Harwood J., Davies J., McFarland E., Pappas J., Kinzie K ., Barr E ., Paul S ., Salbenblatt C., Soda E., Vazquez A., Levin M. "Safety and Tolerability of Antiretrovirals during Pregnancy. " *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology*, 2011; 867674.
114. Zara F, Nappi RE, Berra R, Migliavacca R, Maserati R, Spinillo A. "Markers of local immunity in cervicovaginal secretions of HIV infected women:implications for HIV shedding." *Sex Transm Infect*,2004; 80:108-12.

