UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
BIOLOGIA DE AGENTES INFECCIOSOS E PARASITÁRIOS

EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DO VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA 1 (HIV-1) EM MULHERES (MÃES E GRÁVIDAS) DOS ESTADOS DO ACRE E TOCANTINS, BRASIL

IRAN BARROS COSTA

Belém-Pará
2009

IRAN BARROS COSTA

EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DO VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA 1 (HIV-1) EM MULHERES (MÃES E GRÁVIDAS) DOS ESTADOS DO ACRE E TOCANTINS, BRASIL

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Fernando Almeida Machado

Belém-Pará
2009

Dados Internacionais da Catalogação-na-Publicação (CIP)
Biblioteca de Pós-Graduação do ICB-UFPA – Belém (PA)

Costa, Iran Barros

Epidemiologia molecular do vírus da imunodeficiência humana 1 (HIV-1) em mulheres (mães e grávidas) dos estados do Acre e Tocantins, Brasil / Iran Barros Costa; orientador, Luiz Fernando Almeida machado. – 2009.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários, Belém, 2009.

1. HIV (Vírus). 2. Epidemiologia molecular - Acre. 3. Epidemiologia molecular – Tocantins. 3. AIDS (Doença) na gravidez. 4. AIDS (Doença) – Transmissão. I. Título.

CDD – 20. ed. 616.9792

IRAN BARROS COSTA

EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DO VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA 1 (HIV-1) EM MULHERES (MÃES E GRÁVIDAS) DOS ESTADOS DO ACRE E TOCANTINS, BRASIL

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Fernando Almeida Machado
Laboratório de Virologia, ICB, UFPA

Banca Examinadora: Prof. Dra. Ana Cecília Ribeiro Cruz
Serviço de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas, Instituto Evandro Chagas (IEC)

Profa. Dra. Rita Catarina Medeiros de Souza
Núcleo de Medicina Tropical, UFPA

Prof. Dr. Marcio Roberto Teixeira Nunes
Serviço de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas, Instituto Evandro Chagas (IEC)

Prof . Dr. José Alexandre Rodrigues Lemos (Suplente)
Instituto de Ciências Biológicas, UFPA

Belém, 07 de outubro de 2009.

SUMÁRIO

Lista de Tabelas **8**

Lista de Quadros **9**

Lista de Figuras **10**

Lista de Siglas e Abreviaturas **11**

RESUMO **16**

ABSTRACT **17**

1 INTRODUÇÃO **18**

1.1 HISTÓRICO **18**

1.2 ESTRUTURA E CLASSIFICAÇÃO DO HIV-1 **19**

1.3 ORGANIZAÇÃO GENÔMICA **21**

1.3.1 Gene *gag* **22**

1.3.2 Gene *pol* **23**

1.3.3 Gene *env* **23**

1.3.4 Genes *tat* e *rev* **24**

1.3.5 Gene *vpr* **24**

1.3.6 Gene *vpu* **25**

1.3.7 Gene *nef* **25**

1.3.8 Gene *vif* **26**

1.4 REPLICAÇÃO DO HIV **26**

1.4.1 Fase inicial da replicação viral **27**

1.4.2 Fase tardia da replicação viral **28**

1.5 VARIABILIDADE GENÉTICA DO HIV **31**

1.6 EPIDEMIOLOGIA DO HIV **35**

1.6.1 Modos de transmissão do HIV 35

1.6.2 Distribuição Geográfica do HIV 38

1.6.3 HIV-1 no Brasil 39

1.6.4 Epidemiologia Molecular do HIV-1 41

1.7 TERAPIA ANTIRETROVIRAL (TARV) **46**

1.8 RECOMENDAÇÕES PARA PROFILAXIA DA TRANSMISSÃO VERTICAL DO HIV E TARV EM GESTANTES **49**

1.9 RESISTÊNCIA A TARV EM GRÁVIDAS INFECTADAS PELO HIV **52**

1.10 OBJETIVOS **54**

1.10.1 Objetivo Geral 54

1.10.2 Objetivos Específicos 54

2 MATERIAL E MÉTODOS 55

2.1 TIPO DE ESTUDO **55**

2.2 CASUÍSTICA **55**

2.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO **55**

2.4 ASPECTOS ÉTICOS **56**

2.5 COLETA E CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS **56**

2.6 MÉTODOS LABORATORIAIS **57**

2.6.1 Reação em Cadeia mediada pela Polimerase (PCR) 57

2.6.2 Amplificação da região da protease do HIV-1 57

2.6.3 Amplificação da região da transcriptase reversa do HIV-1 58

2.7 ELETROFORESE **59**

2.8 SEQUENCIAMENTO NUCLEOTÍDICO **60**

2.8.1 Precipitação do DNA 61

2.8.2 Desnaturação do DNA precipitado 61

2.8.3 Eletroforese do DNA sequenciado 62

2.9 ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS NUCLEOTÍDICAS **62**

2.9.1 Edição e Alinhamento das Sequências 62

2.9.2 Análise Filogenética 62

2.9.2.1 Método de Agrupamento de Vizinhos (*Neighbor-Joining*) para a análise Filogenética **63**

3 RESULTADOS 64

3.1 IDENTIFICAÇÃO DOS SUBTIPOS DO HIV-1 CIRCULANTES NA POPULAÇÃO DE MULHERES GRÁVIDAS E DE MÃES PORTADORAS DO VÍRUS **72**

3.2 CONHECIMENTO DO PERFIL DE RESISTÊNCIA/SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIRETROVIRAIS (ARV) UTILIZADOS ATUALMENTE DAS CEPAS DO HIV-1 IDENTIFICADAS NAS CIDADES ESTUDADAS **75**

4 DISCUSSÃO 81

4.1 DADOS EPIDEMIOLÓGICOS **81**

4.2 EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DO HIV-1 **83**

4.3 RESISTÊNCIA AOS INIBIDORES DE PROTEASE **84**

4.4 RESISTÊNCIA AOS INIBIDORES DE TRANSCRIPTASE REVERSA **86**

5 CONCLUSÕES 89

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 90

ANEXOS 114

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Distribuição das participantes do estudo nos devidos estados analisados	**64**
Tabela 2	Características epidemiológicas das mulheres participantes do estudo residentes no Estado do Tocantins (n=25)	**68**
Tabela 3	Características comportamentais das mulheres participantes do estudo residentes no Estado do Tocantins (n=25)	**69**
Tabela 4	Distribuição das contagens de linfócitos T CD4+ e da carga viral entre mulheres portadoras do HIV-1 de Tocantins participantes do estudo	**70**

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Casos de AIDS notificados no SINAN em indivíduos com 13 anos de idade ou mais, segundo categoria de exposição hierarquizada por sexo e ano de diagnóstico. Brasil, 2007 e 2008.	**36**
Quadro 2	Distribuição mundial do HIV	**43**
Quadro 3	Classes de ARV e suas características	**48**
Quadro 4	TARV profilaxia	**51**
Quadro 5	TARV tratamento	**52**
Quadro 6	Iniciadores utilizados nas duas reações de *Nested* PCR para amplificação da região da protease do HIV-1	**58**
Quadro 7	Iniciadores utilizados nas duas reações de *Nested* PCR para amplificação da região da transcriptase reversa do HIV-1	**59**
Quadro 8	Perfil de mutações em amostras que apresentaram algum nível de resistência aos inibidores de protease	**75**
Quadro 9	Perfil de mutações em amostras que apresentaram algum nível de resistência aos inibidores de transcriptase reversa	**76**
Quadro 10	Aminoácidos e suas funções biológicas	**78**
Quadro 11	Substituições de aminoácidos nas sequências de TR de cepas do HIV-1 provenientes das cidades estudadas nas posições chaves associadas com a resistência às drogas ITRNN disponíveis	**80**
Quadro 12	Substituições de aminoácidos nas sequências de TR de cepas do HIV-1 das cidades estudadas nas posições chaves associadas com a resistência às drogas ITRN disponíveis atualmente	**80**

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Organização estrutural do HIV-1	**20**
Figura 2	Organização genômica do HIV-1	**22**
Figura 3	Replicação do HIV-1	**30**
Figura 4	Classificação do HIV de acordo com os tipos, grupos, subtipos e sub-subtipos CRF e URF	**34**
Figura 5	Número estimado de pessoas vivendo com HIV em 2008	**39**
Figura 6	Distribuição dos subtipos e das CRF nas diferentes regiões geográficas do Brasil	**45**
Figura 7	Estado civil das mulheres participantes do estudo nos respectivos estados analisados	**71**
Figura 8	Comparação do nível de escolaridade das mulheres participantes do estudo nos respectivos estados analisados	**71**
Figura 9	Comparação da renda familiar (em salário mínimo) das mulheres participantes do projeto entre os estados estudados	**72**

Lista de Siglas e Abreviaturas

ARV - Antiretrovirais

ARV - Retrovírus associado a AIDS

CA - Capsídeo viral

CCR5 - Receptor β-quimiocina

CD4

CPH-I - Complexo principal de histocompatibilidade de classe I

CRF - Forma Recombinate Circulante

CXCR4 - Receptor α-quimiocina

DNA - Ácido desoxirribonucléico

dNTP - desoxinucleotídios

DST - Doenças Sexualmente Transmissíveis

env - Gene responsável pela produção das gricoproteínas da superfície viral

EUA - Estados Unidos da América

gag - Gene responsável pela síntese do capsídeo viral

gp120 - Glicoproteínas de superfície

gp41 - Glicoproteínas transmembrana

HIV-1 - VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA 1

HIV-2 - VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA 2

HSH - Homens que fazem sexo com homens

HTLV - Vírus linfotrópico de células T humanas

ICB - Instituto de Ciências Biológicas

ICTV - Comitê Internacional de Taxonomia Viral

IF - inibidores de Fusão

IN - Integrase

IP - Inibidores de Protease

ITRN - Inibidores de transcriptase reversa análogos de nucleosídeos

ITRNN - inibidores de transcriptase reversa não análogos de nucleosídeos

kDa - Kilodalton

LACEN - Laboratório Central de Saúde Pública

LAV - Vírus associado à linfadenopatia

LTR - Longas repetições terminais

M - (Major) Um dos grupos do HIV

MA - Matriz

MEGA-4 - *Molecular Evolutionary Genetics Analysis* versão 4.0

$MgCl_2$ - Cloreto de magnésio

mRNA - RNA mensageiro viral

MS - Ministério da Saúde

N - (New ou non-M/non-O) Um dos grupos do HIV

NC - Nuclecapsídeo

O - (Outlier) Um dos grupos do HIV

p17 - Proteínas da matriz

p24 - Capsídeo viral

p7 - Nucleocapsídeo

PCR - Reação em Cadeia mediada pela Polimerase

PIC - Complexo de preintegração

pol - Gene responsável por codificar as proteínas TR, IN e PR

PR - Enzima Protease

Rev - Regulador da transcrição do gene viral

RNA - Ácido ribonucléico

RNase H - Ribonuclease H

rpm - Rotações por minuto

SAE - Serviço de Assistência Especializada

SIDA/AIDS - Síndrome da imunodeficiência adquirida

SIM - Sistema de Informações sobre Mortalidade

SINAN - Sistema de Informação de Agravos de Notificação

SISCEL – Sistema de Informações sobre Mortalidade

SIV - Vírus da imunodeficiência símia

SU - Glicoproteína de superfície

TAE - Tris Acetato EDTA

TARV - Terapia Antiretroviral

Tat - Transativador transcricional

TM - Gricoproteína Transmembrana

TR - Transcriptase reversa

UDE - Usuários de drogas endovenosas

UDNE - Usuários de drogas não endovenosas

UFPA - Universidade Federal do Pará

URF - Formas Recombinantes Únicas

WHO - World Health Organization

Epígrafe

As ideias têm de funcionar pelos cérebros e braços de homens, senão não serão mais que sonhos.

Ralph Emerson

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Dica e Longuinho, que sempre me apoiaram, de forma incondicional, em todas as etapas e fases da minha vida, se, bons ou ruins, assim como por todo o carinho e dedicação que me deram, dando-me boa educação e mostrando com ética o que é “certo ou errado”, o que foi fundamental para minha formação moral e científica.

Ao meu irmão, Irlan Barros, o qual também sempre esteve ao meu lado, sempre me apoiando e presente em meus momentos de alegria e tristeza, a gente se diverti muito e a companhia dele é fundamental para mim.

Á minha namorada, minha“bankelinha”, minha companheira, meu amor, que também esteve ao meu lado em mais essa etapa da minha vida, sempre me deixando feliz, me aconselhando e me fazendo rir, TE AMO.

A toda minha família e amigos que estão ao meu lado sempre, e que acreditaram em mim, vocês me dão força.

AGRADECIMENTOS

Á todas as mães e grávidas que concederam participação na pesquisa cedendo suas amostras, dessa forma viabilizando a realização desse trabalho.

A todos os funcionários dos Serviços de Assistência Especializada (SAE) dos estados do Tocantins e do Acre, que contribuíram de alguma forma para a realização do trabalho, no que diz respeito à coleta das amostras, dos dados epidemiológicos e no envio do material.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Luiz Fernando de Almeida Machado, por sua orientação, com muita paciência, mostrando o que devia fazer ou não, me aconselhando, criticando sempre com muita sabedoria e sempre mantendo o seu bom humor que é sua marca registrada, um excelente orientador e ser humano.

Ao programa de Pós-Graduação em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários (BAIP) da Universidade Federal do Pará (UFPA), pela oportunidade e apoio.

Obrigado a todos vocês

RESUMO

A transmissão vertical é a principal fonte de infecção pelo HIV em crianças, e pode ocorrer antes, durante e depois do nascimento, dessa forma sendo um grande problema de saúde pública mundial. O presente trabalho teve como objetivo descrever a epidemiologia molecular e o perfil de susceptibilidade/resistência das cepas de HIV-1 identificadas em mulheres nos estados do Acre e do Tocantins. Coletou-se amostra de sangue de 36 mulheres, sendo 9 grávidas e 16 mães de Palmas (Tocantins) e 1 grávida e 10 mães do Rio Branco (Acre) entre abril de 2007 a outubro de 2008. Realizou-se a técnica molecular Reação em Cadeia mediada pela Polimerase (PCR) *Nested*, para a amplificação de duas regiões genômicas (*pro* e *tr*) do DNA proviral, seguido de sequenciamento nucleotídico e análise filogenética. No Acre, tanto em relação ao segmento da protease quanto da transcriptase reversa, todas as amostras foram do subtipo B. Em Tocantins, quanto ao segmento da protease, todas as amostras pertenceram ao subtipo B, já em relação ao segmento da transcriptase reversa 87,5% foram do subtipo B e 12,5% pertencente ao subtipo F. No estado do Acre, todas as cepas analisadas foram suscetíveis aos inibidores de protease (IP) e apenas uma grávida de Tocantins (4,7%) apresentou cepa com resistência aos IP utilizados atualmente. Além disso, verificou-se uma baixa prevalência de cepas com mutações de resistência aos inibidores de transcriptase reversa nucleosídicos (ITRN) e não nucleosídicos (ITRNN), sendo que a resistência as três classes desses ARV foi observada em apenas uma amostra proveniente do estado do Tocantins. Dessa forma, a maioria das cepas de HIV isoladas mostrou susceptibilidade aos ARV utilizados, indicando que há baixa circulação de cepas do HIV resistentes a estes medicamentos nesses estados.

ABSTRACT

The vertical transmission is the main source of the HIV infection in children, and it may occur before, during, of after birth and thus a big world public health problem. The present work had as objective to describe the molecular epidemiology and the profile of susceptibility/resistance of HIV-1 strains identified in women from the States of Acre and Tocantins. Samples were collected from 36 women, being 9 pregnants and 16 mothers from Palmas (Tocantins) and 1 pregnant and 10 mothers from Rio Branco (Acre) between April 2007 and October 2008. The molecular technique of Polimerase Chain Reaction was performed mediated by *Nested* Polimerase, to the amplification of two genomic regions (*pro* and *tr*) from proviral DNA, followed by nucleotidic sequencing and phylogenetic analysis. In the Acre, both in relation to the segment of protease and reverse transcriptase, all samples were subtype B. In the Tocantins, the segment of the protease, all samples belonged to subtype B, as compared to the reverse transcriptase segment of 87.5% were subtype B and 12.5% belonging to subtype F. In the State of Acre, as the strains analyzed showed susceptibility to the protease inhibitors (PI) and only ne pregnant from Tocantins (4,7%) showed a strain with resistance to current used PI. Beyond that, was verified a low prevalence of strains with resistance mutations to the nucleosidic reverse transcriptase inhibitor (NRTI) and non nucleosidic (NNRTI), being that the resistance to the three classes of these ARV was observed in only one sample from the State of Tocantins. So the majority of HIV isolated strains showed susceptibility to the ARV used, suggesting that there is low circulation of HIV resistant strains to these drugs in these states.

1. INTRODUÇÃO

1.1 HISTÓRICO

A entidade atualmente conhecida como síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA/AIDS) foi reportada pela primeira vez no início da década de 80, a partir do relato de pneumonia causada por *Pneumocystis* carinii, atualmente conhecido como *Pneumocystis jiroveci* (Lee *et al*., 2009) assim como outras infecções incomuns em cinco homens que fazem sexo com homens (HSH) que não apresentavam história pregressa de imunodeficiência (Gottlieb *et al.*, 1981).

Os retrovírus infectam animais, tais como aves, répteis e mamíferos, sendo que o primeiro retrovírus a ser encontrado em humanos foi isolado em 1980 por Gallo *et al.*, o qual foi denominado de Vírus linfotrópico de células T humanas 1 (HTLV-1) e 2 (HTLV-2). Posteriormente, Gallo *et al.* (1983) identificaram um novo vírus causador de infecção naqueles indivíduos que desenvolveram pneumonia por *Pneumocystis jiroveci*, o qual foi chamado de HTLV-III.

Levy *et al.* (1984) desenvolveram uma linhagem de células T de pessoas com AIDS do estado de São Francisco, nos Estados Unidos. Essas culturas ratificaram a descoberta feita nos trabalhos anteriores, porém não foi estabelecida uma direta comparação com o LAV e, por isso, a este isolado foi dado o nome de retrovírus associado a AIDS (ARV).

Na mesma época, foi isolado um retrovírus de paciente apresentando linfadenopatia cervical e astenia, sendo denominado de Vírus associado à linfadenopatia (LAV) (Barre-sinoussi *et al*., 1983).

Posteriormente, os isolados virais descritos por Gallo, Montagnier e Levy foram denominados de *Vírus da imunodeficiência humana* (HIV) pelo Comitê Internacional de Taxonomia Viral (ICTV, 2009).

A origem do HIV ainda é discutida. Estudos de filogenia molecular revelaram que o HIV-1 teve origem a partir do *Vírus da imunodeficiência símia* (SIV) que infecta a subespécie de chimpanzé *Pan troglodytes troglodytes* (SIVcpz), enquanto que o HIV-2 deriva de uma cepa de SIV que infecta o primata *Sooty mangabey* (SIVsm) **(**Papathanasopoulos *et al*., 2003**)**. Neste contexto, é sugerido que a rota de infecção humana com o SIV se deu pela exposição ao sangue de macacos durante o processo de caça e abatimento desses animais e não pela ingestão da carne desses primatas (Gao *et al*., 1999).

Inferências e estudos sobre a origem do HIV foram importantes, pois acabaram por estabelecer semelhanças existentes entre o SIV e HIV, uma vez que cinco evidências sustentam essa origem e a relação existente entre os dois vírus: (I) similaridade na organização dos genomas desses vírus; (II) as relações filogenéticas existentes entre os dois; (III) a prevalência do SIV nos seus hospedeiros naturais; (IV) a coincidência geográfica no surgimento do HIV e do SIV e (V) a existência de vias de transmissão admissíveis entre espécies (Marx *et al*., 2004).

1.2 ESTRUTURA E CLASSIFICAÇÃO DO HIV-1

O HIV é classificado como membro da família *Retroviridae*, subfamília *Orthoretrovirinae*, gênero *Lentivirus* (ICTV, 2009). Possui um capsídeo em forma de cone que comporta o genoma do vírus formado por duas moléculas de ácido ribonucléico (RNA) de fita simples. Os retrovírus são caracterizados pela habilidade que possuem de transcrever

o seu genoma de RNA em uma molécula de ácido desoxirribonucléico (DNA) de dupla fita, previamente a integração do genoma do vírus ao cromossomo da célula hospedeira. Esse processo é mediado por uma DNA polimerase dependente de RNA, denominado de transcriptase reversa (Turner & Summers, 1999).

O HIV-1 apresenta um envelope lipoprotéico (Figura 1) derivado da membrana da célula alvo, a qual expõe em sua superfície glicoproteínas (gp120) que são ancoradas no vírus por meio de interações com glicoproteínas transmembrana (gp41) (Turner & Summers, 1999). Além dessas proteínas, existem outras que também são derivadas da membrana da célula hospedeira durante o processo de entrada do vírus na célula, que são antígenos do Complexo Principal de histocompatibilidade, actina e ubiquitina (Arthur *et al*., 1992).

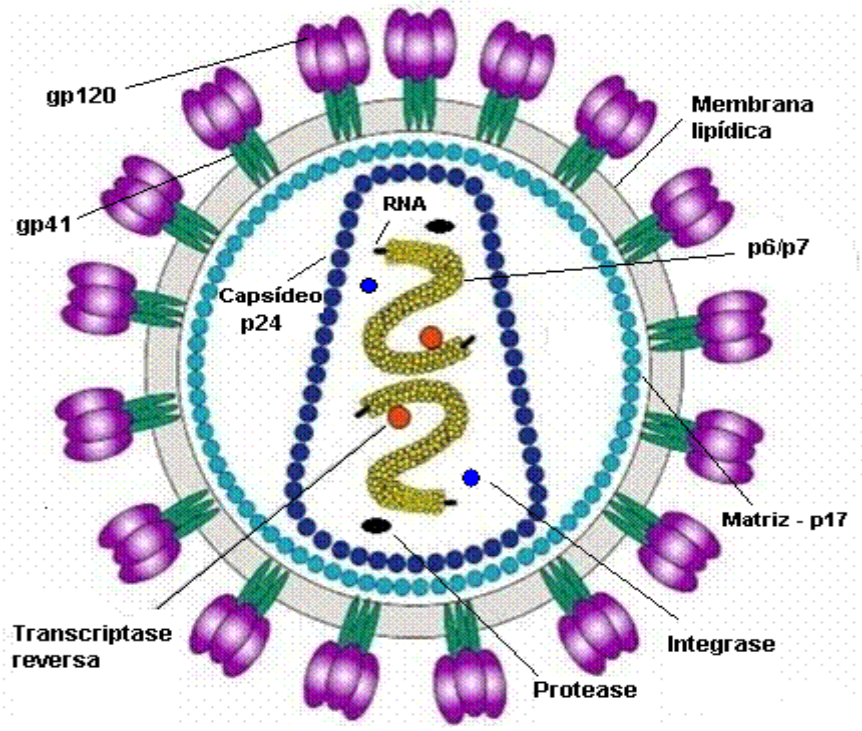

Figura 1 - Organização estrutural do HIV-1 (Adaptado de www.stanford.edu/.../2005gongishmail/HIV.html)

O HIV possui uma matriz estrutural a qual é formada por proteínas da matriz (p17), do capsídeo viral (p24), do nucleocapsídeo (p7), a qual envolve as duas cópias do genoma viral e p6 (Freed, 2002). No interior do capsídeo estão presentes as enzimas protease (PR), transcriptase reversa (TR) e integrase (IN).

O genoma do HIV é também responsável por codificar as proteínas regulatórias Tat (transativador transcricional) e Rev (regulador da transcrição do gene viral), assim como as proteínas acessórias Vpr, Vpu, Nef e Vif. Essas proteínas são importantes para o processo de transcrição viral e, conseqüentemente, na patogênese no hospedeiro (Freed, 2002).

1.3 ORGANIZAÇÃO GENÔMICA

Todos os retrovírus, assim como o HIV, apresentam três genes estruturais: *gag*, responsável pela síntese do capsídeo viral; *pol* (polimerase), que codifica as proteínas TR, IN e PR e o *env* (envelope), o qual é responsável pela produção das glicoproteínas da superfície viral. Além desses o HIV apresenta dois genes regulatórios (*tat* e *rev*) e quatro genes acessórios (*vpr*, *vpu*, *nef* e *vif*) (Larder *et al*., 2001; Figura 2).

No DNA proviral, o conjunto desses genes está flanqueado em suas extremidades por duas regiões chamadas longas repetições terminais (LTR), estas sequências contém sítios promotores importantes para a regulação da transcrição. São encontradas em cada extremidade 5’ da fita de DNA e possuem sítios de ligação para vários fatores de transcrição celular. Estas sequências são formadas por três regiões: U3 (extremidade 3’ única); R (repetição) e U5 (extremidade 5’ única) (Ross *et al*., 1991; Yuntao & Marsh, 2003).

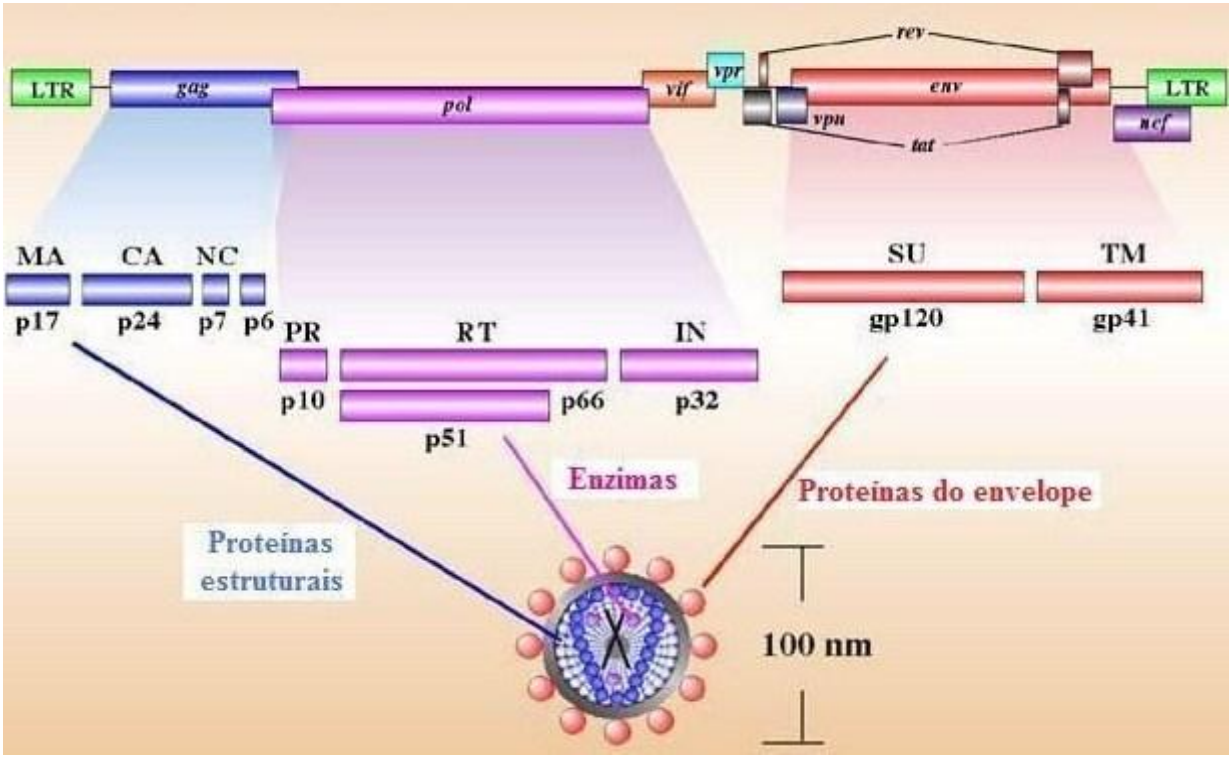

Figura 2 - Organização genômica do HIV-1, mostrando o provírus integrado, flanqueado por repetições terminais (U3, R e U5), e os genes estruturais e acessórios (Adaptado de www.stanford.edu/.../2005gongishmail/HIV.html).

1.3.1 Gene *gag*

O gene *gag* é responsável por codificar uma poliproteína de 55 kDa ($Pr55^{Gag}$), a qual é clivada proteoliticamente por uma protease produzida pelo vírus, para que possa exercer a sua função biológica (Tanuri *et al*., 1999). Durante ou logo após o processo de montagem do vírus na célula hospedeira, a poliproteína precursora Gag sofre processamento dando origem a proteínas estruturais p17 da matriz (MA) do vírus, a p24 componente do capsídeo viral (CA) e as proteínas formadoras do nucleocapsídeo (NC) p6 e p7 (Freed, 1998).

1.3.2 Gene *pol*

As enzimas sintetizadas pelo gene *pol* são primeiramente sintetizadas a partir de uma grande poliproteína precursora de 160 kDa (Pr 160^{GagPol}), a qual é clivada por uma protease viral dando origem as enzimas (PR, TR e IN) (Freed, 1995).

1.3.3 Gene *env*

O gene estrutural *env* apresenta informação para a codificação de uma glicoproteína de 160 kDa (gp160) que é processada por uma protease viral levando a formação de duas glicoproteínas menores, gp120 e gp41. Estas glicoproteínas são importantes no reconhecimento e ligação do vírus à célula alvo (Hope & Trono, 2000; Barbour & Grant, 2005).

A glicoproteína de superfície (SU) gp120 contém domínios que interagem com receptores (CD4) e co-receptores (CCR5 ou CXCR4) presentes na membrana de linfócitos T auxiliares, monócitos, macrófagos e células dendríticas (Dragic *et al*., 1996). Já a glicoproteína transmembrana (TM) gp41 é responsável por estabilizar o complexo gp120/gp41 na membrana da célula, assim como também dispõe de domínios importantes para o processo de fusão entre o envelope viral e a camada bilipídica da célula hospedeira durante a entrada do vírus (Sleasman & Goodenow, 2003).

Estudos comparativos, entre sequências do gene *env*, de um grande número de isolados virais, mostraram que a gp120 pode ser dividida em cinco regiões conservadas (C1-C5) e cinco regiões altamente variáveis (V1-V5), enquanto que a gp41 é formada por três domínios principais, um ectodomínio (possui domínios essenciais para o processo de

fusão entre o envelope viral e a membrana da célula hospedeira), uma seqüência ancorada transmembrana e um endodomínio (Freed, 2002).

1.3.4 Genes *tat* e *rev*

Os genes regulatórios *tat* e *rev* são responsáveis por codificar proteínas essenciais para o sucesso da replicação viral (Frankel & Young, 1998). O primeiro é responsável por codificar uma proteína composta por 101 aminoácidos que desempenha papel chave no controle da produção e processamento dos genes virais durante a transcrição, funcionando como um regulador transcricional, sendo capaz de aumentar os níveis de transcrição do promotor situado nas sequências LTR do HIV-1 (Liang & Wainberg, 2002). O segundo codifica a proteína regulatória Rev (19 kDa), que desempenha a função essencial de se ligar ao elemento RRE (*Rev responsive element*) do RNA mensageiro viral (mRNA), desencadeando o processo de exportação do transcrito viral não processado do núcleo para o citoplasma, para posterior tradução (Gergerfelt *et al*., 2002).

1.3.5 Gene *vpr*

O gene *vpr* sintetiza a proteína Vpr, de 14 kDa, a qual é expressa dentro da célula infectada. Após fusão e entrada, ocorre desnudamento da partícula viral no interior do citoplasma celular, sendo que há o rápido transporte, mediado pela enzima Vpr, para o núcleo da célula alvo de um complexo nucleoprotéico formado pelas proteínas TR, IN, MA, pelo RNA genômico e por DNA parcial, transcrito reversamente (Poon *et al*., 1998; Vodicka *et al*., 1998).

1.3.6 Gene *vpu*

O gene acessório *vpu* esta presente no HIV-1, assim como em outros retrovírus como o SIVcpz e o SIVgsn (Huet *et al*., 1990; Courgnaud *et al*., 2002). Este gene é responsável por codificar a proteína Vpu, a qual é expressa durante o ciclo de replicação viral e, dentre as suas funções, é responsável por mediar à degradação do receptor celular CD4 dentro do retículo endoplasmático, após a formação de complexos entre os receptores CD4 e a moléculas gp160 (Crise *et al*., 1990; Jabbar & Nayak, 1990; Bour *et al*., 1995).

Esse processo ocorre devido à clivagem de moléculas gp160 recém sintetizadas que são retidas no retículo endoplasmático através de interações com moléculas CD4 também recém sintetizadas, dessa forma Vpu promove a degradação desses receptores nestes complexos, dessa forma permitindo que haja o transporte da gp120 e gp41 para a superfície da célula infectada. Somado a isso, a proteína Vpu potencializa a liberação de partículas virais das células infectadas pelo HIV-1 (Willey *et al*., 1992; Bour & Strebel, 2003).

1.3.7 Gene *nef*

O gene *nef* é responsável pela codificação da proteína Nef de 27 kDa, a qual é responsável pela diminuição da expressão de receptores CD4 na superfície celular assim como moléculas do complexo principal de histocompatibilidade de classe I (CPH-I), pela modulação da atividade celular através da sua influência em vias de transdução de sinal e no aumento da infectividade viral (Greenway *et al*., 2003; Jere *et al*., 2004).

1.3.8 Gene *vif*

A proteína Vif, de 23 kDa, codificada pelo gene *vif*, é responsável pela produção de vírus infecciosos, sendo que a síntese de proteínas mutantes mostra marcadamente a redução nos níveis de síntese de DNA viral e alta formação de intermediários replicativos instáveis, sugerindo que o funcionamento dessa proteína ocorre antes ou durante a síntese do DNA (Zhang *et al*., 2000). Sugere-se, também, que essa proteína atua no ciclo replicativo do HIV durante a montagem, brotamento ou maturação do vírus, efetivando o processo de transcrição reversa nas células alvo e, desse modo, conferindo maior infectividade à progênie viral (Inubushi & Adachi, 1999; Gaddis *et al*., 2003; Lake *et al*., 2003).

1.4 REPLICAÇÃO DO HIV

A replicação do HIV consiste de uma série de eventos que podem ser divididos em uma fase inicial e outra tardia, embora alguns eventos ocorram de forma coordenada ou mesmo de forma simultânea (Freed *et al*., 2002).

O HIV utiliza-se de receptores e co-receptores presentes na superfície de linfócitos T ou macrófagos para que haja reconhecimento e adsorção do vírus, proporcionando o começo da infecção viral. A interação ocorre entre receptores CD4 que estão presentes na membrana da célula alvo e as moléculas de gp120 presentes no envelope viral (Manavi, 2006).

Para que haja o reconhecimento, ligação e entrada do HIV na célula hospedeira há necessidade, também, da interação com co-receptores (receptores de quimiocina) que estão adjacentes aos receptores CD4, sendo as moléculas CCR5 (receptor

β-quimiocina) e CXCR4 (receptor α-quimiocina) as mais bem estudadas. Após o estabelecimento dessas interações moleculares, o nucleocapsídeo viral entra no citoplasma da célula hospedeira para que ocorra o processo de replicação do genoma viral (Manavi, 2006).

1.4.1 Fase inicial da replicação viral

Essa fase inicia-se com a ligação específica de partículas de HIV-1 com células que apresentam, em sua superfície, receptores do tipo CD4, uma proteína que apresenta função imunológica. Essa ligação ocorre através de interações específicas entre as glicoproteínas do envelope viral (gp120) e o domínio amino-terminal da molécula CD4, a qual é fundamental para a ligação, porém não suficiente para a infecção.

Diferente de outros retrovírus, o HIV-1 necessita de uma proteína de superfície adicional presente na célula hospedeira para que ocorra a fusão entre o envelope viral e a membrana da célula hospedeira. Tais proteínas são os co-receptores CXCR4 e CCR5, que direcionam a fusão entre as membranas (Nazari & Joshi, 2008).

Inicialmente, a molécula de gp120 se liga a molécula de CD4 presente na membrana da célula alvo, tal interação molecular gera mudanças conformacionais na molécula gp120, a qual acaba expondo novos sítios de ligação, permitindo assim a interação molecular entre a gp120 e os co-receptores CCR5 ou CXCR4. Dessa forma, tais interações levam a modificações na conformação agora na molécula de gp41, a qual expõe uma região hidrofóbica denominada peptídeo de fusão, que se insere na membrana da célula que será infectada permitindo a fusão entre o envelope viral e a membrana celular (Freed, 2002).

Após a fusão entre o envelope viral com a membrana da célula hospedeira, ocorre o desnudamento do vírus com inserção do capsídeo viral no citoplasma celular, o que resulta na liberação do genoma viral associado às enzimas virais PR, TR e IN, as quais se tornam ativas, iniciando assim o ciclo de replicação viral (Freed, 2002).

O RNA viral é transcrito pela enzima TR levando, primeiramente, a formação de uma molécula híbrida RNA/DNA, que posteriormente dará origem a molécula de DNA linear de dupla fita (Telesnitsky & Goff, 1997). A TR é uma enzima multifuncional que apresenta tanto a atividade de DNA polimerase dependente de DNA assim como de RNA, bem como de ribonuclease H (RNase H), a qual atua na formação da molécula híbrida RNA/DNA, por meio da clivagem específica da fita de RNA viral. Esse DNA proviral será associado às proteínas virais IN, MA, TR e Vpr, formando um complexo de preintegração (PIC), o qual será transportado até o núcleo celular, onde poderá ser integrado ao genoma da célula infectada (Götte & Wainberg, 1999; Sherman & Greene, 2002). A integração é um passo essencial na replicação e, conseqüentemente, para persistência da infecção (Wu *et al*., 1999; Reinke *et al*., 2001).

1.4.2 Fase tardia da replicação viral

A fase final da replicação do HIV-1 inicia a partir do momento em que há síntese de mRNA, sendo que duas classes são geradas, um RNA genômico em que não há processamento do tipo *splicing* (*unspliced*), o qual servirá para a incorporação do vírus maduro, e dois RNA transcritos com eventos de processamento do tipo *splicing* (RNA subgenômico), os quais são usados para gerar poliproteínas virais. Estes são transportados para fora do núcleo onde sofrerão tradução (Urnovitz & Murphy, 1996).

Inicialmente, pequenas moléculas de RNA possuindo informação para a síntese das proteínas regulatórias Tat, Rev e Nef são sintetizadas (Greene, 1990). Geralmente moléculas de RNA genômicos que não sofreram evento de processamento do tipo *splicing* (*unspliced*) são retidas no núcleo onde podem sofrer mais eventos de processamento ou serem degradados (Ohno *et al*., 1998). Contudo, uma longa e única molécula de mRNA, que não sofreu eventos de processamento, é necessária no citoplasma para a síntese e posterior empacotamento da proteína Gag e da poliproteína Gag-Pol, sendo que o procedimento de exportação para o citoplasma é mediado pela proteína acessória Rev (Lever, 2005).

A gp160 é sintetizada no retículo endoplasmático usando mRNA *spliced* contendo informação do gene *env*. Esta poliproteína é modificada pós-tradução no retículo endoplasmático e no Complexo Golgiense e posteriormente transportada para a membrana da célula para a montagem do vírus (Freed & Martin, 1995).

Ambas as moléculas, gp160 e CD4, são sintetizadas no retículo endoplasmático, sendo que a ligação prematura da molécula de CD4 a essa organela pode inibir o deslocamento da gp160 para a membrana da célula infectada (Hoxie *et al*., 1986).

O receptor CD4 é alvo para a remoção no retículo endoplasmático pela proteína acessória Vpu. De forma parecida, receptores CD4 presentes na membrana celular são inseridos na via de degradação endossomal através da ligação da proteína Nef ao receptor celular (Deora & Ratner, 2001; Arora & Fredericksen, 2002).

A montagem dos novos vírus ocorre devido ao acúmulo de transcritos completos do genoma de RNA dentro de um complexo de nucleoproteínas, o qual é formado pelas proteínas codificadas pelo gene *gag*, assim como as enzimas codificadas

pelo *pol*. Esse nucleocapsídeo é coberto por um envelope proveniente da membrana plasmática da célula hospedeira, na qual estão presentes tanto proteínas oriundas da própria membrana celular, como as glicoproteínas virais gp120 e gp41. Posteriormente, o vírus é liberado da célula hospedeira por meio de brotamento e sofrerá maturação ficando apto a infectar novas células (Janeway *et al*., 2002). O ciclo de replicação do HIV-1 está representado esquematicamente na Figura 3.

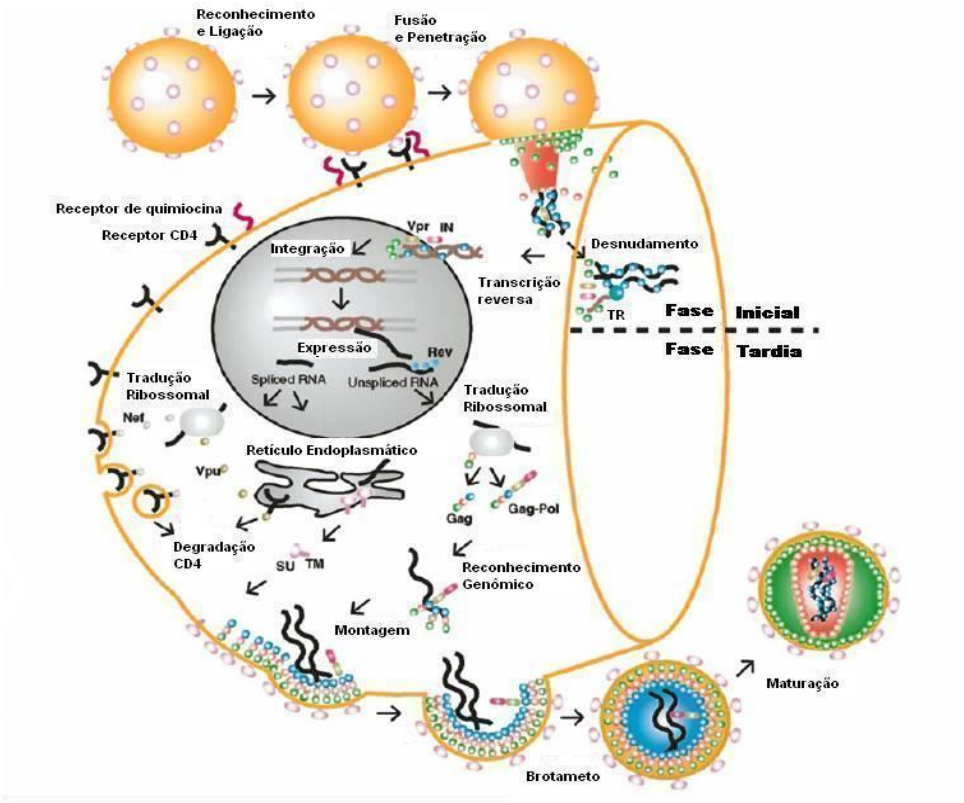

Figura 3 - Replicação do HIV-1. A fase inicial ocorre a partir do momento em que há reconhecimento da molécula de CD4, com posterior integração do DNA proviral. A fase tardia inclui todos os eventos de transcrição do DNA proviral, brotamento e maturação viral (Adaptado de Turner & Summers, 1999).

1.5 VARIABILIDADE GENÉTICA DO HIV

A elevada diversidade do HIV, assim como dos outros retrovírus, consiste no fato de que a transcriptase reversa não possui a capacidade de autocorreção durante o processo de replicação do vírus, uma propriedade comum à DNA polimerase de outros organismos (Overbaugh & Bangham, 2001; Markowitz *et al*., 2003). Como conseqüência dessa falha de correção, há formação de substituições nucleosídicas incorretas (aproximadamente 10^{-4} por nucleotídeo) assim como de mutações (3×10^{-5} nucleotídeos / dia) (Veras, 2006).

A elevada taxa de replicação viral (aproximadamente 10 bilhões/dia), somada à variedade genética dos vírus, aumenta a diversidade do mesmo ao longo da infecção no hospedeiro (Pinto & Struchiner, 2006).

Além dos erros ocorridos durante a inserção de nucleotídeos, a TR também possibilita a realização de um processo denominado de recombinação homóloga, que consiste na recombinação entre genomas virais em indivíduos que estão infectados por variantes virais distintas. Durante a transcrição reversa, a TR pode se deslocar de uma fita de RNA para outra levando a formação de uma fita de DNA viral contendo segmentos dos dois RNA iniciais (Hu & Temin, 1990). No entanto, tal processo só é eficaz para a geração de variabilidade, se as duas fitas de RNA presentes no vírus forem diferentes uma da outra, ou seja, que anteriormente tenha sido formado genomas virais heterozigotos, fato que ocorre quando há infecção simultânea por duas variantes virais em um único indivíduo (Hu & Temin, 1990).

A grande variabilidade genômica do HIV traz importantes implicações para o diagnóstico laboratorial, o tratamento, assim como para investigações epidemiológicas. A

complexidade genômica adquirida através desses processos descritos acima acaba por trazer a essas populações de mutantes a capacidade de responder de forma rápida e eficaz às modificações ocorridas no ambiente de replicação, em virtude de oferecerem uma grande quantidade de variantes (mutantes) sobre as quais a seleção natural pode atuar (Peeters & Sharp, 2000; Overbaugh & Bangham, 2001).

Devido à grande diversidade existente entre as cepas de HIV-1 circulantes, até no começo da década de 90, do século passado, estas variantes virais eram organizadas em dois grupos, de acordo com o local de onde foram identificadas: “americanas” ou “africanas” (Veras, 2006). No entanto, com a descoberta de novas variantes, esta classificação tornou-se inadequada sendo inicialmente substituída por uma ordenação em subtipos baseada na análise dos genes *env* ou *gag*. Posteriormente, adotou-se a classificação segundo a análise completa do genoma de cepas de HIV-1, adquiridas em diferentes regiões geográficas do mundo (Simon *et al*., 1998).

Estudos filogenéticos de inúmeras dessas cepas mostraram que elas poderiam ser subdivididas em grupos, subtipos, sub-subtipos e Formas Recombinantes Circulantes (CRF) (Robertson *et al*., 2000). Dessa forma, estes estudos permitiram classificar o HIV-1 em três grandes grupos: M (*Major*); O (*Outlier*) e N (*New ou non-M/non-O*) (Gao *et al*., 1999; Requejo *et al*., 2006).

A grande maioria das cepas do HIV-1 pertence ao grupo M, o qual é o responsável pela atual pandemia de AIDS. Este grupo foi dividido em nove subtipos eqüidistantes filogeneticamente, nomeados de A, B, C, D, F, G, H, J, K, sendo os dois últimos subtipos caracterizados como formas recombinantes. Alguns desses subtipos

podem ser separados em sub-subtipos como o A (A1 e A2) e grupo F (F1 e F2) (Peeters & Sharp, 2000; Papathanasopoulos *et al*., 2003)**.**

Após a classificação em subtipos do grupo M, observou-se que algumas cepas, quando analisadas filogeneticamente, eram enquadradas dentro de diferentes grupos se diferentes sequências fossem analisadas, bem como foram encontradas em pelo menos três indivíduos sem uma ligação epidemiológica, a essas variantes chamou-se de CRF. Estas formas têm origem a partir do momento em que um indivíduo é infectado por dois diferentes subtipos de HIV-1, em que haja o estabelecimento de recombinação genética satisfatória para a adaptação da nova forma ao seu ambiente de replicação (Requejo *et al*., 2006).

Segundo a nomenclatura proposta, cada CRF é denominada de acordo com a ocorrência da recombinação mais as letras indicando os subtipos envolvidos na formação do mosaico. Se o genoma contiver sequências originárias de mais de dois subtipos, as letras são representadas por "cpx" o que diz respeito a complexo (Thomson *et al*., 2002; Requejo *et al*., 2006).

Além das CRF, pelo menos outras 30 formas recombinantes, chamadas de Formas Recombinantes Únicas (URF) já foram identificadas, entretanto sem evidência de surtos epidêmicos (Motomura *et al*., 2000). A maior parte dessas variantes foi identificada em regiões onde múltiplos subtipos circulam (Mccutchan, 2000).

Há dois tipos de HIV responsáveis por causar infecção e a AIDS em seres humanos. Entretanto, o principal agente causador da infecção no mundo é vírus tipo 1 (HIV-1), enquanto o vírus tipo 2 (HIV-2), o qual apresenta 7 grupos (A-G) foi primeiramente identificado no Oeste da África, estando restrito nessa região, assim como

em Portugal, Índia e casos raros reportados em alguns países do Ocidente, na Coréia e Filipinas (Barin *et al*., 1985; Takebe *et al*., 2004). O esquema mostrando as várias divisões o qual sofreu o HIV (tipos, grupos, subtipos, subsubtipos, CRFs e URFs) está representado na Figura 4.

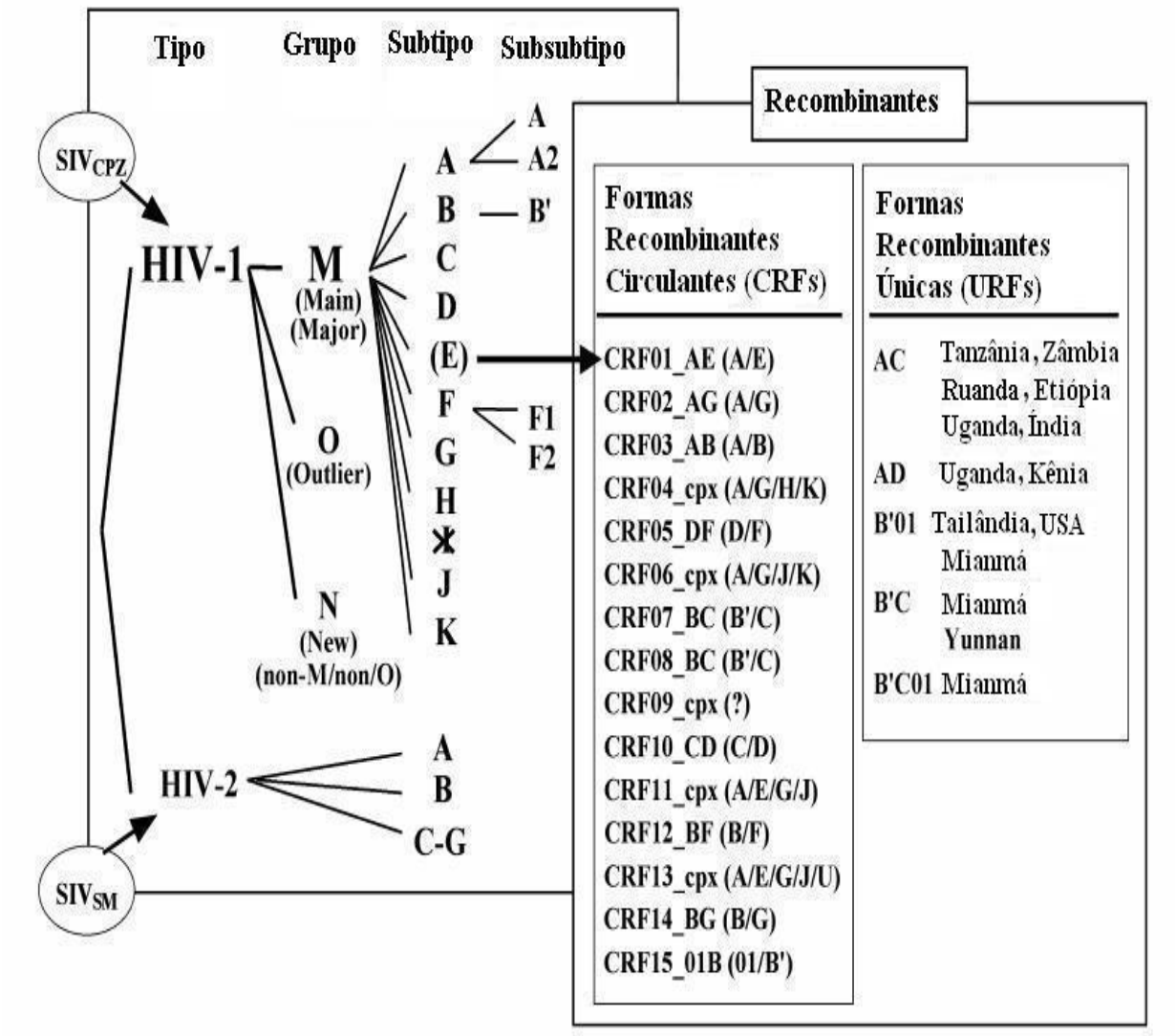

Figura 4 - Classificação do HIV de acordo com os tipos, grupos, subtipos e sub-subtipos CRF e URF (Adaptado de Takebe *et al*., 200

1.6 EPIDEMIOLOGIA DO HIV

1.6.1 Modos de transmissão do HIV

O HIV-1 pode ser transmitido horizontalmente pela via sexual, parenteral, a qual pode ocorrer pelo compartilhamento de seringas ou agulhas contaminadas pelo vírus, bem como a utilização de hemoderivados contaminados, e pela via vertical (Manavi, 2006).

A rota de transmissão que mais contribui para a disseminação do vírus é a sexual, a qual é responsável por boa parte dos casos de contaminação pelo HIV em todo o mundo, sendo a transmissão heterossexual a principal via de transmissão (Davdison *et al*., 2009).

Dados recentes, divulgados em 2008, mostram haver considerável queda na notificação de casos de AIDS, no Brasil, segundo as diferentes categorias de exposição, como podemos observar no Quadro 1.

A infecção pelo HIV-1, em crianças, é geralmente mais séria do que em adultos devido a diferentes fatores que levam a uma progressão mais rápida da doença e a uma alta taxa de mortalidade nessa faixa etária da vida (Connor *et al*., 1994).

A transmissão materno-fetal pode ocorrer no decorrer da gravidez (transplacentária), durante o parto ou por ocasião da amamentação (Newell, 1998; Coll *et al*., 2002). Orienta-se que mulheres infectadas pelo HIV substituam o leite materno por alimentação artificial, entretanto, essa iniciativa é pouco eficaz em países onde culturalmente, economicamente e por falta de higiene há dificuldades na substituição do tipo de alimentação (Cohan, 2003).

Quadro 1 - Casos de AIDS notificados no SINAN em indivíduos com 13 anos de idade ou mais, segundo categoria de exposição hierarquizada por sexo e ano de diagnóstico. Brasil, 2007 e 2008.

Categoria de exposição	2007	2008
Masculino		
HSH	2077	336
Bissexual	995	149
Heterossexual	4922	810
UDI	849	127
Hemofílico	6	3
Transfusão	10	1
Total	8859	1426
Feminino		
Heterossexual	6269	953
UDI	182	30
Transfusão	7	2
Total	6458	985

Fonte: Ministério da Saúde. **Boletim Epidemiológico 2008**

Na transmissão mãe-filho do HIV há uma relação diretamente proporcional entre a alta carga viral das mulheres infectadas pelo vírus durante a gestação, em particular aquelas que soroconvertem durante a gravidez, e a transmissão do vírus para seus filhos no útero ou durante o parto, sendo que o risco de transmissão aumenta se a amamentação for por um longo período (Burgess, 2001).

O período de maior transmissão via amamentação, ocorre nos primeiros seis meses de idade, sendo a pouca idade materna geralmente associada a pouca experiência em amamentação (produção de danos mamários), a incidência de mastite e a soroconversão viral durante o aleitamento os principais fatores de risco para a transmissão do HIV (Burgess, 2001).

Estratégias de prevenção têm reduzido o risco de transmissão materno-infantil pelo HIV através da utilização da terapia antiretroviral em mulheres grávidas e em seus recém nascidos, assim como a utilização de práticas obstétricas que minimizem a exposição da criança aos fluidos maternos (Del bianco *et al*., 2005; Fowler *et al*., 2007).

A redução do risco de transmissão materno-infantil é feita por meio da administração de estratégias isoladas ou em associação, que pode ser por meio da redução sistemática da carga viral mediante a terapia com drogas antiretrovirais ou por terapia imune, reduzir a exposição do recém nascido ao sangue e secreção materna, assim como outras condições que inviabilizem a transmissão como o uso de antibióticos para corioamniotites, redução da carga viral da secreção vaginal utilizando medicamentos locais e tratamento profilático do recém nascido através da TARV (Mwanyumba *et al*., 2002; Del bianco *et al*., 2005).

Além destas medidas, práticas obstétricas que previnam o nascimento de crianças prematuras, cuidado para não romper membranas mais de quatro horas anteriormente ao parto e o uso desnecessário de instrumentos durante o procedimento, garantem uma redução no risco de transmissão vertical do HIV (Rogers & Shaffer, 1999).

A transmissão por via sangüínea vem diminuindo, substancialmente, em relação a procedimentos de pós-transfusão. O primeiro caso registrado de infecção por HIV

associado a procedimentos de transfusão ocorreu no início de 1983, desde então os bancos de sangue questionam os seus doadores quanto aos fatores de risco aos quais estão expostos, excluindo dessa forma o risco de contaminação após doação. Após a implementação de testes sorológicos para identificação de infecção por HIV em 1985, apenas cinco casos de infecção por HIV associados com transfusão são registrados anualmente, em comparação com os 714 casos registrados no ano anterior a utilização da triagem (Goodnough, 2005).

1.6.2 Distribuição Geográfica do HIV

Nos últimos anos, tem ocorrido um esforço global para a contenção da epidemia de HIV/AIDS, que inclui aumento do acesso ao tratamento efetivo, assim como o desenvolvimento de programas preventivos (Cooley & Lewin, 2003). Entretanto, o número de pessoas vivendo com HIV continua crescendo, assim como o número de mortes que ocorrem em conseqüência da AIDS. Estima-se que dois milhões de pessoas evoluíram pra óbito devido a AIDS em 2008 (UNAIDS/WHO, 2009).

Segundo dados divulgados recentemente (UNAIDS/WHO, 2009), o número estimado de pessoas vivendo com HIV, em 2008, correspondeu à cerca de 33,4 milhões, sendo que desse total de infectados, 31,3 milhões são adultos, e destes metade corresponde a mulheres.

O número de novas infecções sofreu uma redução de três milhões, em 2001, para 2,7 milhões em 2008. O número de casos de infecção pelo HIV em crianças com idade inferior a 15 anos foi de, aproximadamente, dois milhões. Diante desse quadro, a África Sub-saariana continua concentrando a maioria dos casos de pessoas infectadas pelo HIV no

mundo (67% do total), enquanto que a Oceania continua sendo a região geográfica com menor número de infecções pelo vírus com, aproximadamente, 59.000 casos (UNAIDS/WHO, 2009, Figura 5).

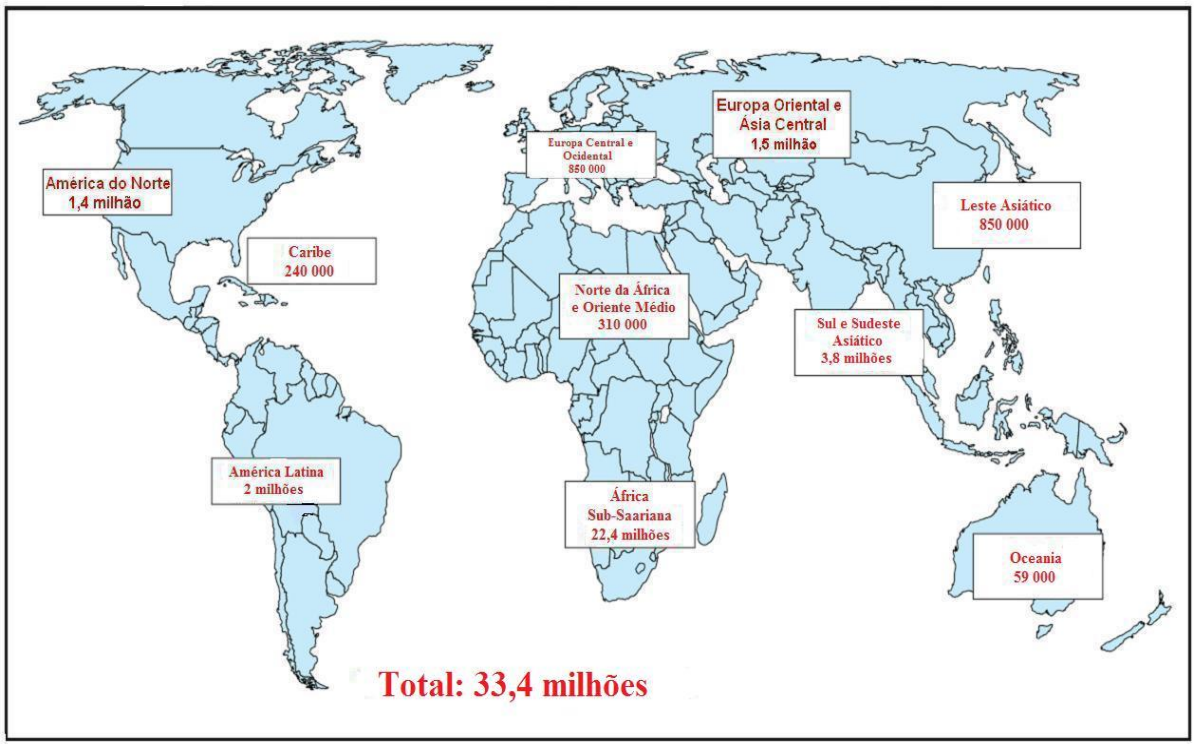

Figura 5 - Número estimado de pessoas vivendo com HIV em 2008 (Adaptado de UNAIDS/WHO, 2009).

1.6.3 HIV-1 no Brasil

O Brasil investe na prevenção e no tratamento da infecção pelo HIV, essa metodologia tem ajudado em manter estável a epidemia durante vários anos (Okie, 2006). Recentemente foi divulgado o número de casos de AIDS notificados no SINAN e

registrados no SISCEL desde o ano de 1980 até 2009, o que correspondeu a um total de 544846 (AIDS Boletim Epidemiológico, 2009).

Desse total, a região sudeste foi a que mais registrou notificações, 323.069 o que corresponde a 59% do total, já a região com o menor número de notificações foi à região Norte com 21.389 (3,9%) casos identificados. De 1980 a 2008, foram registrados no Sistema de Informações sobre Mortalidade (SIM) um total de 217.091 óbitos por AIDS, sendo que a região Sudeste se destaca por conter a maioria dessas mortes (66%) e a região Norte apresentando menor percentual, aproximadamente 3% de óbitos (AIDS Boletim Epidemiológico, 2009).

No Estado do Pará houve uma significativa queda no número de notificações de 2008 a 2009 registradas no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), de 1263 para 518 casos notificados, enquanto que 393 pessoas morreram por AIDS no ano de 2008 (AIDS Boletim Epidemiológico, 2009).

No Brasil, já foram notificados 36.300 casos de grávidas infectadas pelo HIV entre os anos 2000 a 2007, sendo que a região Sudeste destaca-se por abrigar a maioria dessas notificações, com 16.905 casos, seguida da região Sul com 11.714, Nordeste com 4.399 notificações, Centro-Oeste com 1.934 casos e, por último, da região Norte com 1.348 infecções (AIDS Boletim Epidemiológico, 2008). Dentro da região Norte, o estado do Pará abriga o maior número de notificações totalizando 589 casos, já os estados do Acre e Tocantins, notificaram 56 e 127 casos, respectivamente (AIDS Boletim Epidemiológico, 2008).

1.6.4 Epidemiologia Molecular do HIV-1

O primeiro caso de infecção pelo grupo M foi descrito em 1959, de forma retrospectiva utilizando-se sorotecas de amostras de sangue coletadas em Kinshasa, República Democrática do Congo, área essa onde tem sido registrada alta diversidade desse grupo (Vidal *et al*., 2000).

Em escala global, os subtipos mais prevalentes são os subtipos B, com uma prevalência de, aproximadamente, 63%, seguido dos subtipos C (12,1%), A (7,6%), D (2,7%) e CRF01_AE (4,2%) (www.hiv.lanl.gov/components/sequence/HIV/geo).

A maior diversidade genética do HIV-1 está presente na África Central, onde os subtipos A e C são mais comuns, entretanto, todos os grupos e subtipos (exceto o subtipo B) são encontrados nessa região, o que reforça a hipótese de que a África foi à fonte da atual pandemia de AIDS (Vidal *et al*., 2000).

O primeiro caso de infecção pelo grupo O foi registrado em um paciente norueguês, o qual pode ter sido infectado no início de 1960 (Jonassen *et al*., 1997). Este grupo está restrito a pessoas que vivem na África Central, sendo endêmico na República dos Camarões e em outros países vizinhos do Centro-oeste africano, entretanto, nessa região, infecções por esse grupo é vista raramente (Tatt *et al*., 2001). Por ser altamente prevalente na República dos Camarões, este país é considerado como o epicentro da infecção pelo HIV do grupo O (Mccutchan**,** 2000; Takebe *et al*., 2004).

O grupo N causa infecções também em países do Centro-oeste africano, o qual foi identificado em alguns pacientes da República dos Camarões, sendo restrito a esse país da África (Simon *et al*., 1998; Ayouba *et al*., 2000).

O subtipo A é predominante no Leste da África e África Central, entretanto é presente também no Oeste africano e em países do Leste europeu, onde tem sido disseminado desde 1995, principalmente na Rússia e Ucrânia (Liitsola *et al*., 1998; Papathanasopoulos *et al*., 2003; Vidal *et al*., 2003).

O subtipo B é a principal variante epidêmica no Leste Europeu, sendo presente também na América, Austrália e em alguns países Asiáticos como a Coréia, Índia, Singapura e Japão (Louwagie *et al*., 1994; Kitsutani *et al*., 1998; Se-thoe *et al*., 1998; Herring *et al*., 2003).

O subtipo C é mais prevalente na Índia, sendo encontrado também no Sul e Leste africano e no Brasil (Soares *et al*., 2003; Geretti, 2006), enquanto que o subtipo D é predominante no Leste africano e na África Central, juntamente com o subtipo A (Laukkanen *et al*., 1996; Peeters & Sharp, 2000).

O subtipo E, renomeado como CRF01_AE, é freqüente no Sudeste Asiático, sendo mais comum no Vietnã e países vizinhos, principalmente em usuários de drogas intravenosas (UDI) (Ou *et al*., 1992; Lole *et al*., 1999; Chakrabarti *et al*., 2000). O subtipo F é o mais comum no Leste Europeu, principalmente na Romênia em crianças e adultos (Apetrei *et al*., 1998).

Os subtipos G, H, J e K são prevalentes na África Central, Taiwan e Rússia; África Central e Bélgica; Congo, Gâmbia e Suécia e Camarões, respectivamente (Carr *et al*., 1998). O Quadro 2 mostra de forma resumida a distribuição mundial dos tipos, grupos e subtipos do HIV.

Quadro 2 - Distribuição mundial do HIV.

Tipo	Grupo	Subtipo	Distribuição global
HIV-1	M	A	Leste da África, Oeste da África, África Central e Leste Europeu
		B	América do Norte e Sul, Brasil (Acre e Tocantins) Europa, Ásia e Oceania
		C	Sul e Leste da África, Índia e Brasil
		D	África Central
		F	África Central, Romênia e América Latina, Brasil (Tocantins)
		G	África Central, Taiwan e Rússia
		H	África Central e Bélgica
		J	Congo, Gâmbia e Suécia
		K	Camarões
	O		Camarões, Gabão e Noruega
	N		Camarões
HIV-2	A-G		Oeste Africano, Portugal, Espanha, Alemanha, França, Suécia, Inglaterra, Estados Unidos, Índia e Coréia

(Fonte: Takebe *et al*., 2004)

Assim como na América Latina e no resto do mundo, no Brasil, o subtipo predominante é o B, sendo que de forma igual o subtipo F é o segundo de maior predominância no Brasil e na América Latina (www.hiv.lanl.gov/components/sequence/HIV/geo).

O subtipo C tem aumentado no Brasil desde a sua introdução no dos anos 90 do século passado, principalmente na região Sul do país. Inúmeros estudos de

epidemiologia molecular, realizados no Rio Grande do Sul (Sul do Brasil), mostraram a presença dos subtipos B(75%), C (22%), F (2,5%), D (0,5%) e as formas recombinantes F1/B, D/B, B/C, que podem ser também encontradas com taxas de prevalência menores (Soares *et al*., 2003; Monteiro *et al*., 2007; Bello *et al*., 2008).

Estudo publicado em 2007, Locateli *et al*., o qual analisou os genes *gag* e *env* de cepas estabelecidas no Estado de Santa Catarina, também sul do Brasil, revelou a predominância do subtipo C, seguido dos subtipos B e F. No estado de São Paulo, vários estudos ratificaram a predominância dos subtipos B e F1 e a presença das formas recombinantes CRF12_BF, CRF28_BF, CRF29_BF (Brígido *et al*., 2005; Carreto *et al*., 2005; Filho *et al*., 2006; Souza *et al*., 2008; Molina *et al*., 2009).

Outro estudo também realizado na região Sudeste do país, agora no estado do Espírito Santo, mostrou a predominância do subtipo B nesse estado, seguido dos subtipos F e C e das formas recombinantes B/F e F/B (Cabral *et al*., 2006).

No Estado do Rio de Janeiro, estudos recentes mostraram a presença dos subtipos B, F1 e D e das formas recombinantes BF1 e CRF02_AG (Couto-Fernandez *et al*., 2005; Fernandez *et al*., 2005; Eyer-Silva *et al*., 2007). Estudo feito na região Centro-Oeste do Brasil, Brasília e nos estados de Goiás, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul, revelou predominância do subtipo B e F nessa região (Stefani *et al*., 2007).

A região Nordeste do Brasil apresenta uma situação a ser bem analisada, fatos como a dificuldade econômica, a dificuldade de acesso a educação, o intenso turismo sexual e a prostituição, estão relacionados com o aumento da disseminação da infecção pelo HIV e a inserção na região de novas formas genéticas do vírus. Estudo feito por Monteiro *et al*. (2009), na Bahia, mostrou a predominância do subtipo B, nesse estado, assim como a

presença dos subtipos F e D. Resultado semelhante foi encontrado nos estados do Ceará, Pernambuco, também presentes na região Nordeste do Brasil (Gadelha *et al*., 2003; Medeiros *et al*., 2006; Monteiro *et al*., 2009).

Na região Norte, em Manaus, foi descrita a prevalência de 38,7% do subtipo B nas amostras analisadas, assim como uma alta incidência de recombinantes B/F (35,5%) e pelo subtipo F (16%) (Vicente *et al*., 2000), outro estudo realizado no Pará revelou a circulação de cinco subtipos genéticos do vírus: B, F, C, D e da forma recombinante CRF02_AG (Machado *et al*., 2004). A distribuição desses subtipos no Brasil pode ser visualizada na Figura 6.

Figura 6 - Distribuição dos subtipos e das CRF nas diferentes regiões geográficas do Brasil (Adaptado de Morgado *et al*., 2002).

1.7 TERAPIA ANTIRETROVIRAL (TARV)

O tratamento utilizado contra a AIDS é feito por meio da utilização dos chamados medicamentos antiretrovirais (ARV), os quais apresentam como objetivo geral a inibição da replicação viral no indivíduo infectado, sendo que a associação desses medicamentos para fins terapêuticos é dada o nome de Terapia Antiretroviral (TARV) (www.aids.gov.br).

Existem quatros classes de ARV, os Inibidores de transcriptase reversa análogos de nucleosídeos (ITRN); inibidores de transcriptase reversa não análogos de nucleosídeos (ITRNN); Inibidores de protease (IP) e os inibidores de fusão (IF).

Os ITRN têm como princípio a atuação na enzima transcriptase reversa, os quais se ligam a cadeia de DNA sintetizada pelo vírus, causando mudanças estruturais na molécula de DNA tornando-a defeituosa, dessa forma impossibilitando a replicação viral (Zdanowicz, 2006).

Semelhante a classe de ARV descrita anteriormente, os ITRNN também agem na enzima transcriptase reversa, entretanto essa classe age diretamente na enzima impedindo dessa forma a sua função na replicação viral e consequentemente inviabilizando a multiplicação do vírus no organismo (Zdanowicz, 2006).

Os IP foram sintetizados com a finalidade de se ligarem ao sítio catalítico da enzima protease com alta afinidade, impossibilitando que essa enzima exerça a sua função. Essa ligação não inviabiliza a formação e liberação da partícula viral da célula hospedeira, entretanto essas partículas são imaturas e não infecciosas (Zdanowicz, 2006).

A fusão do HIV com a membrana da célula hospedeira é um passo fundamental para entrada do vírus na célula a ser infectada, nesse contexto que os IF agem,

bloqueando a fusão e a entrada do vírus na célula hospedeira. Essa classe de medicamentos são peptídeos sintéticos que se ligam especificamente a molécula gp41 do HIV, dessa forma impedindo que ocorram mudanças conformacionais nessa molécula, fato esse fundamental para o início da fusão do vírus a célula alvo (Zdanowicz, 2006).

Recentemente duas outras classes de antiretrovirais foram desenvolvidas, as quais têm como alvos de ação a integrase viral e os co-receptores (receptores de quimiocina) CCR5 (Marcelin *et al*., 2009).

A enzima integrase é responsável pela integração cromossômica entre a dupla fita de DNA viral recém sintetizada e o DNA genômico da célula hospedeira, processo esse de vital importância para a replicação viral, dessa forma os chamados Inibidores de Integrase (IIn) agem bloqueando a ação dessa enzima, consequentemente impedindo a replicação viral (Marcelin *et al*., 2009).

As moléculas de CCR5 presentes na membrana da célula hospedeira estão envolvidas no processo de entrada do vírus na célula através da interação desses co-receptores com as moléculas gp120 do HIV. Os chamados inibidores de CCR5 atuam nesse processo bloqueando a interação do vírus com a célula a ser infectada. A diferença dessa classe de ARV em relação às outras é a sua ação fora da célula, bloqueando a entrada do HIV (Marcelin *et al*., 2009). Abaixo veremos as características de cada classe (Quadro 3).

No presente estudo analisaram-se mutações de resistência a três classes desses medicamentos, os ITRN, ITRNN e aos IP.

Quadro 3 - Classes de ARV e suas características

Classe de antiretroviral	**Exemplos**	**Efeitos adversos**	**Mecanismo de ação**
ITRN	Zidovudina Didanosina Zalcitabina Lamivudina Abacavir Estavudina Emtricitabina Tenofovir	Acidose lática Náusea Diarréia	Inibidor competitivo da TR do HIV.
ITRNN	Nevirapina Efavirez Delavirdina	Prurido Hepatotoxidade Vertigem, insônia	Antagonista não competitivo inibe a ação da TR do HIV.
IP	Ritonavir Saquinavir Amprenavir Indinavir Nelfinavir Atazanavir Tipranavir Fosamprenavir	Dislipidemia Hiperglicemia Náusea Diarréia	Inibe a ação da enzima PR, a qual é responsável pela maturação viral.
IF	Enfuvirtida (T-20)	Reação no sítio de injeção do medicamento.	Impede a fusão do HIV com a célula alvo.

IIn	Raltegravir Elvitegravir (fase experimental) MK-2048 (fase experimental)		Inibição da enzima integrase.
Inibidor de CCR5	Maraviroc	Aumento dos níveis de bilirrubina, aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT), amilase e lipase	Bloqueio da entrada do HIV na célula alvo.

Fonte: Adaptado de Marcelin *et al*., 2009 e Zdanowicz, 2006.

1.8 RECOMENDAÇÕES PARA PROFILAXIA DA TRANSMISSÃO VERTICAL DO HIV E TARV EM GESTANTES

O Ministério da Saúde (MS), por meio do Programa Nacional de DST e AIDS reuniu o Comitê Assessor para Recomendações de Profilaxia da Transmissão Vertical do HIV e Terapia Antiretroviral em Gestantes, o qual revisou as Recomendações para a TARV e as demais condutas relacionadas à profilaxia da transmissão vertical do HIV (Ministério da Saúde, 2007).

Primeiramente, é preciso fazer a diferenciação entre a administração de ARV na gestante objetivando prevenir a transmissão vertical, caracterizando profilaxia com TARV e a administração dessa terapia devido haver indicação pelo estado clínico ou

imunológico comprometido da mulher, caracterizando tratamento com TARV. As mulheres as quais utilizam ARV na condição de profilaxia com TARV poderão ter essa terapia suspensa quando terminada a gestação (Ministério da Saúde, 2007).

Para utilização de TARV em gestantes, são analisados três parâmetros: os níveis de células T CD4+, a idade gestacional da parturiente e a sua carga viral. Dessa forma são recomendados dois esquemas de administração de ARV, em gestantes, visando à profilaxia da transmissão vertical do HIV, bem como tratamento ((Ministério da Saúde, 2007).

Os dois esquemas são direcionados a gestantes que não se encontram em uso de TARV, sendo que o primeiro é utilizado em mulheres assintomáticas que apresentam níveis de células T CD4+ > 200 células/mm^3, iniciando-se a profilaxia com TARV a partir da 14° semana de gestação e que apresentem carga viral <1.000 cópias/ml (Ministério da Saúde, 2007) (Quadro 4).

Quadro 4 - TARV profilaxia

Idade gestacional	A partir da 14° semana
Uso de TARV	Não
Situação clínica Contagem de linfócitos T-CD4+ Recomendação terapêutica	Assintomática >200 células/mm^3 Profilaxia com TARV (AZT+3TC+NFV ou NVP
Situação clínica Contagem de linfócitos T-CD4+ Carga viral Recomendação terapêutica	Assintomática >200 células/mm^3 <1000 cópias/ml Monoterapia com AZT

O segundo esquema é direcionado a gestantes sintomáticas que apresentam níveis de células T CD4+ $\leq$ 200 células/mm^3, sendo que a utilização da TARV é independente da idade gestacional, já que o adiamento da terapia poderá trazer prejuízos à mãe e ao feto (Ministério da Saúde, 2007) (Quadro 5).

Quadro 5 - TARV tratamento

Idade gestacional	Independente
Uso de TARV	Não
Situação clínica Contagem de lifócitos T CD4+ Recomendação terapêutica	Assintomática ≤200 células/mm^3 TARV-tratamento (AZT+3TC+NFV ou NVP)
Situação clínica Contagem de lifócitos T CD4+ Recomendação terapêutica	Sintomática Independente TARV-tratamento (AZT+3TC+NFV ou NVP)

1.9 RESISTÊNCIA A TARV EM GRÁVIDAS INFECTADAS PELO HIV

A TARV serve para dois propósitos em mulheres grávidas infectadas pelo HIV-1: tratamento maternal, assim como profilaxia para a transmissão materno-fetal (Eastman *et al*., 1998).

O tratamento com ARV já mostrou ser eficiente na prevenção ou diminuição do risco de transmissão vertical do HIV-1(Connor *et al*., 1994; Guay *et al*., 1999). Dessa forma, esse tipo de profilaxia tem sido adotado, em muitos países, como parte de uma rotina gestora de prevenção da infecção materno-fetal pelo HIV (CDC, 2005).

A intervenção terapêutica é focalizada na administração de ARV para suprimir a replicação viral, preservando a função imune e reduzindo o desenvolvimento de

cepas resistentes em caso de AIDS ou quando a carga viral está muito elevada havendo maior risco de transmissão fetal (Del bianco *et al*., 2005).

Entretanto, a resistência viral a essa terapêutica pode limitar a eficácia clínica da profilaxia por essas drogas, durante e mesmo em futuras gestações, assim como pode limitar a eficácia de futuras terapias, devido a esse fato, é importante a análise de mutações resistentes, entre mulheres grávidas com infecção pelo HIV-1, durante a gravidez e durante a administração da terapia para prevenção da transmissão vertical (Duran *et al*., 2007).

A prevalência de genótipos resistentes à TARV, entre mulheres grávidas, em nível mundial, tem sido estimada entre 2,3 a 25%, variação essa que depende se a mãe está sendo exposta pela primeira ou por mais de uma vez ao tratamento profilático, assim como o tipo de regime de profilaxia que está sendo usado. Essas taxas provavelmente refletem a resistência adquirida através de infecção primária ou superinfecção, ou através da seleção de vírus resistentes como resultado da utilização da terapia (Welles *et al*., 2000; Palumbo *et al*., 2001; Cunningham *et al*., 2002)

Welles *et al*. (2007), analisando mutações que conferem resistência ao TARV, em um grupo de 300 mulheres grávidas infectadas pelo HIV, nos EUA, de 1991 a 2001, mostrou haver um aumento na prevalência de resistência às drogas, incluindo as mulheres que estavam utilizando a medicação pela primeira vez.

1.10 OBJETIVOS

1.10.1 Objetivo Geral

Descrever a epidemiologia molecular e o perfil de susceptibilidade/resistência das cepas de HIV-1 identificadas em mulheres que fizeram, que fazem e/ou que ainda não iniciaram a TARV como medida profilática para a transmissão vertical do HIV-1 nos Estados do Acre e do Tocantins.

1.10.2 Objetivos Específicos

- Identificar os subtipos do HIV-1 circulantes nas mulheres, mães e grávidas, dos estados do Acre e Tocantins;
- Descrever a ocorrência de cepas do HIV-1 resistentes aos antiretrovirais utilizados correntemente nos estados estudados;
- Descrever o perfil de mutações (primárias e secundárias) no gene da protease e da transcriptase reversa, referente ao padrão de resistência aos antiretrovirais usados rotineiramente em mulheres que fizeram ou não o uso de TARV;
- Verificar as correlações existentes entre as variáveis epidemiológicas obtidas nos inquéritos das pacientes e o subtipo viral, a carga viral plasmática e o número de linfócitos T $CD4^{+}$.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 TIPO DE ESTUDO

O presente estudo foi do tipo transversal. As participantes residiam em vários municípios dos Estados do Acre e Tocantins e faziam parte da Rede Nacional de Carga Viral e $CD4^+$ do PN/DST/AIDS/MS, tendo acompanhamento clínico-laboratorial no Serviço de Assistência Especializada (SAE) de cada Estado.

2.2 CASUÍSTICA

Participou do estudo toda a população de mulheres grávidas e de mães (de crianças menores de dois anos) portadoras do HIV das cidades de Palmas (Tocantins) e Rio Branco (Acre) que procuraram o SAE destas cidades no período de abril de 2007 a outubro de 2008.

2.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Como critérios de inclusão, as grávidas participantes do estudo podem: a) estar em qualquer período de gestação; b) estar ou não fazendo terapia antiretroviral, seja como medida profilática para a transmissão vertical do vírus, seja como tratamento; c) já ter tido ou não outros filhos.

Além das grávidas, foram incluídas mulheres, portadoras do HIV, que tiveram filhos após o diagnóstico da infecção pelo vírus, incluindo as que realizaram a TARV.

2.4 ASPECTOS ÉTICOS

O presente trabalho foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário João de Barros Barreto, da Universidade Federal do Pará, e seguiu as diretrizes e as normas de regulamentação de pesquisa envolvendo seres humanos (Resolução 196/96 e 347/2005 do Conselho Nacional de Saúde) (Anexo 1).

Os indivíduos que aceitaram a participação no projeto assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 2) e responderam a um questionário epidemiológico (Anexo 3).

2.5 COLETA E CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

As amostras de sangue foram coletadas em um sistema de colheita a vácuo, em dois tubos de 5 mL, contendo EDTA como anticoagulante, onde o plasma foi separado por centrifugação a 3.000 rotações por minuto (rpm) e, juntamente com a porção celular do sangue, foi congelado à -20ºC, no Laboratório Central de Saúde Pública (LACEN) de cada Estado, até serem transportadas ao Laboratório de Virologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, para serem armazenadas até o momento de uso.

As informações de contagem de linfócitos T $CD4^+$ e de carga viral foram obtidas a partir do prontuário do paciente ou no próprio LACEN de cada Estado.

2.6 MÉTODOS LABORATORIAIS

2.6.1 Reação em Cadeia mediada pela Polimerase (PCR)

No presente trabalho a PCR foi efetuada em duas etapas, denominada de *Nested* PCR, para a amplificação de duas regiões genômicas (*pro* e *tr*) do DNA proviral do HIV, a partir do DNA dos indivíduos soropositivos, sendo que o material que foi utilizado na pesquisa foi obtido pelo método fenol-clorofórmio obtendo-se assim genoma nuclear (DNA viral integrado) para prosseguimento da análise. Está técnica resulta de modificações da PCR tradicional, em que há utilização de uma segunda etapa de amplificação utilizando um par de iniciadores internos aos que foram utilizados na primeira etapa, visando aumentar a sensibilidade e especificidade da técnica (Molina & Tobo, 2004). As amplificações de cada segmento gênico foram realizadas no equipamento termo-ciclador *Peltier thermal cycler, Biocycler termocicladores* (modelos MJ96+ / MJ96G).

2.6.2 Amplificação da região da protease do HIV-1

Uma região de 297 pb do gene *pol* foi amplificada seguindo a mistura dos reagentes, para ambas as etapas, em que adicionou-se 32,1 µl de H_2O; 5,0 µl de tampão 10x; 2,5 µl de Cloreto de magnésio ($MgCl_2$) à 50mM, 1,0 µl de cada iniciador à concentração de 10 pmol; 2 µl de dNTP (desoxinucleotídios) (*Amresco®, USA*) à concentração de 10 mM; 0,4 µl de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen, Brasil) à 5U/ µl e 6 µl de DNA da amostra extraída (500 ng), sendo que à reação de amplificação foi realizada para um volume final de 50 µl.

Em cada reação de amplificação, após a desnaturação inicial à 94 ºC por 5 minutos foram efetuados 35 ciclos de 30 segundos à 94 ºC, 30 segundos à 57 ºC e 30

segundos a 72 ºC. Os ciclos foram seguidos por extensão final de 10 minutos à 72 ºC. Posteriormente foi realizada uma segunda etapa da reação (*Nested* PCR) utilizando à mesma quantidade de produto da amplificação anterior (6 µl de DNA), considerando as mesmas condições de reação. Nessas reações foram utilizadas pares de iniciadores internos e externos à região alvo do estudo, cujas sequências são descritas no Quadro 6.

Quadro 6 - Iniciadores utilizados nas duas reações de *Nested* PCR para amplificação da região da protease do HIV-1.

PRIMERS	**GENE**	**SEQÜÊNCIA 5' – 3'**	**ETAPA**
DP10	*pro*	5' – TAACTCCCTCTCAGAAGCAGGAGCCG – 3'	PCR
DP11	*pro*	5' – CCATTCCTGGCTTTAATTTTACTGGTA – 3'	PCR
DP16	*pro*	5' – CCTCAAATCACTCTTTGGCAAC – 3'	NESTED
DP17	*pro*	5' – AAAATTTAAAGTGCAGCCAAT – 3'	NESTED

2.6.3 Amplificação da região da transcriptase reversa do HIV-1

Uma região de 647 pb do gene *pol* foi amplificada onde adicionou-se, em um eppendorf, 31,0 µl de H_2O; 5,0 µl de tampão 10x; 2,5 µl de Cloreto de magnésio ($MgCl_2$) à 50mM, 1,5µl de cada iniciador à concentração de 10 pmol; 2 µl de dNTP (desoxinucleotídios) (*Amresco®, USA*) à concentração de 10 mM; 0,5 µl de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen, Brasil) à 5U/ µl e 6 µl de DNA da amostra extraída (500 ng), sendo que a reação de amplificação foi realizada para um volume final de 50 µl.

Em cada reação de amplificação, após a desnaturação inicial à 94 ºC por 5 minutos, foram efetuados 40 ciclos de 30 segundos à 94 ºC, 30 segundos à 58 ºC e 30 segundos à 72 ºC. Os ciclos foram seguidos por extensão final de 10 minutos à 72 ºC. Posteriormente realizou-se uma segunda etapa da reação (*Nested* PCR) utilizando a mesma quantidade de produto da amplificação anterior (6µl de DNA), considerando as mesmas condições de reação. Nessas reações foram utilizadas pares de iniciadores internos e externos à região alvo do estudo, cujas sequências são descritas no Quadro 7.

Quadro 7 - Iniciadores utilizados nas duas reações de *Nested* PCR para amplificação da região da transcriptase reversa do HIV-1.

PRIMERS	**GENE**	**SEQUÊNCIAS 5' – 3'**	**ETAPAS**
RT9F	*tr*	5' – GTACAGTATTAGTAGGACCTACACCTGTC – 3'	PCR
RT12R	*tr*	5' – ATCAGGATGGAGTTCATAACCCATCCA – 3'	PCR
RT1F	*tr*	5' – CCAAAAGTTAAACAATGGCCATTGACAGA-3'	NESTED
RT4R	*tr*	5' – AGTTCATAACCCATCCAAAG – 3'	NESTED

2.7 ELETROFORESE

Os produtos das amplificações foram visualizados após eletroforese (90 V/45 minutos) em gel de agarose à 2%, em tampão TAE 1x (TAE 40x estoque – TrisBase 1,6 M, Acetato de Na 0,8 M e EDTA-Na_2 40 mM/1000 mL água deionizada), contendo 5 µL de brometo de etídio (10mg/mL), mediante a utilização de transiluminador com fonte de luz ultravioleta.

2.8 SEQUENCIAMENTO NUCLEOTÍDICO

Após reação o produto amplificado foi submetido ao sequenciamento automático. A metodologia utilizada foi baseada na síntese bioquímica da cadeia de DNA através do método de Sanger *et al.* (1977) pelo *kit* da *ABI PRISM™ 310 BigDye Terminator v3.1* (*Applied Biosystems*). As fitas de DNA foram sequenciadas em ambas as direções, usando-se o equipamento de sequeciamento automático *ABI PRISM 310 Genetic Analyzer* (*Applied Biosystems*). A técnica foi realizada de acordo com o protocolo que se segue:

Para cada reação, misturou-se os seguintes reagentes em um tubo marcado:

● *Terminator Ready Reaction Mix*	0,5 μL
● Tampão	1,0 μL
● DNA 10-30 ng (produto da PCR amplificado)	0,5 μL
● Iniciadores (10,0 pmol/μL)	1,0 μL
● H_2O deionizada	7,0 μL
● Total	10 μL

O *Terminator Ready Reaction Mix* é composto de *A-Dye Terminator, G-Dye Terminator, C-Dye Terminator, T-Dye Terminator,* dGTP, dATP, dCTP, dTTP, Tris-HCl pH 9,0, $MgCl_2$, Pirofosfato Termo-estável e *AmpliTaq* DNA Polimerase, Fs.

Colocou-se os tubos contendo a mistura no termociclador (termo-ciclador *Peltier thermal cycler, Biocycler termocicladores* (modelos MJ96+ / MJ96G) e realizou-se 35 ciclos de 10 segundos a 94 ºC, 5 segundos a 57 ºC e 4 minutos a 60 ºC. Ao final do processo, resfrio-se a mistura à 4 ºC.

2.8.1 Precipitação do DNA

Transferiu-se o material amplificado por PCR para um tubo de 0,5 ml. Adicionou-se ao tubo que continha o material amplificado (0,2 ml), 40 μl de isopropanol a 65% seguido da transferência desse conteúdo para o tubo de 0,5 ml, o qual continha o produto do PCR.

Homogenizou-se, brevemente, em agitador mecânico (vórtex), deixando em temperatura ambiente, não exposto à luz, durante 15 minutos. Após o tempo de repouso, centrifugou-se os tubos (alça da tampa voltada para fora) durante 25 minutos a 14.000 rpm, seguido da retirada e do desprezo do isopropanol a 65% (sobrenadante) o máximo possível (retirado sempre pelo lado oposto onde se localiza o pellet de DNA).

Adicionou-se 300 μL de etanol a 60% e centrifugou-se os tubos à 14.000 rpm, durante 5 minutos, seguido da retirada do etanol a 60% (sobrenadante). Por último, deixou-se secar os tubos protegidos da incidência de luz.

2.8.2 Desnaturação do DNA precipitado

Adicionou-se 15 μl de formamida em cada tubo contendo a amostra, homogenizou-se esse conteúdo, brevemente, em agitador mecânico (vórtex). Colocava-se os tubos no termociclador com a placa aquecida a 95 °C durante 3 minutos, terminado o tempo de aquecimento, resfriava-se os tubos colocando-os em uma placa de resfriamento.

Por último, as amostras foram colocadas no sequenciador automático *ABI PRISM 310 Genetic Analyzer* (*Applied Biosystems*).

2.8.3 Eletroforese do DNA sequenciado

O sistema de eletroforese utilizou o seqüenciador *ABI PRISM 310 Genetic Analyzer* (*Applied Biosystems*). A corrida foi realizada seguindo o protocolo do fabricante em um capilar de 61cm, nas seguintes condições: voltagem de corrida 12,2 kV, corrente 3-5 µA, temperatura 50 ºC e tempo de corrida de 2 horas e 45 minutos.

2.9 ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS NUCLEOTÍDICAS

2.9.1 Edição e Alinhamento das Sequências

A análise comparativa entre as sequências nucleotídicas requer um perfeito alinhamento das mesmas, considerando-se o pareamento de bases homólogas. O alinhamento foi realizado por meio do programa *Bioedit* (Hall, 1999) operado em Windows.

2.9.2 Análise Filogenética

As relações filogenéticas entre as variantes do HIV-1, isoladas neste estudo, com outras sequências previamente descritas na literatura e que estão disponíveis no *Genebank*, as quais foram avaliadas a título de comparação e discussão, com o auxílio do método de Agrupamento de Vizinhos (*Neighbor-Joining*) para reconstrução das análises filogenéticas.

2.9.2.1 Método de Agrupamento de Vizinhos (*Neighbor-Joining*) para a análise Filogenética

O método de Agrupamento de Vizinhos (*Neighbor-Joining*) refere-se à distância genética entre as amostras, agrupando-as de acordo com a maior similaridade (Saitou & Nei, 1987). De acordo com esse método, primeiramente estabelece-se os cálculos para o percentual de divergências entre todos os pares de sequência, corrigindo estes valores para múltiplas substituições ao usar o modelo de Kimura 2-parâmetros e as distâncias corrigidas são usadas para construir as árvores filogenéticas. Para a realização do mesmo, foi utilizado o programa MEGA-4 – *Molecular Evolutionary Genetics Analysis* versão 4.0 (Tamura *et al*., 2007). A sustentação estatística da árvore filogenética foi efetuada por meio da análise de *bootstrap* que gera 1.000 réplicas aleatórias do banco de dados.

3. RESULTADOS

No presente estudo foram coletadas amostras de 36 indivíduos (grávidas e mães) dos estados do Acre e Tocantins, sendo 10 grávidas e 26 mães (Tabela 1).

Tabela 1 - Distribuição das participantes do estudo nos devidos estados analisados.

Estado	**Grávidas**	**Mães**	**Total**
Tocantins	09	16	25
Acre	01	10	11
Total	10	26	36

Em relação ao estado do Acre, as mulheres participantes do estudo (n=11) eram provenientes dos municípios de Rio Branco, Feijó, Senador Guiomard, Brasiléia e Cruzeiro do Sul. A única grávida em acompanhamento era de Rio Branco, estava no sétimo mês de gravidez, tem 26 anos e já possui um filho de quatro anos não portador do HIV. A participante referiu possuir o ensino fundamental incompleto, ser casada, doméstica, com renda familiar de 1 a 3 salários e estar fazendo uso de TARV.

As mulheres que são mães possuem idade variando entre 22 e 31 anos (média de 25,5 anos), e a maioria (6/10; 60%) apresenta o ensino fundamental incompleto, são casadas (6/10; 60%) e também são domésticas (7/10; 70%). Em relação à renda familiar, três (30%) relataram ganhar menos de um salário por mês, enquanto as demais (7; 70%) recebem de 1 a 3 salários.

Todas as mulheres participantes do estudo já tiveram outros filhos (média de 2,8 filhos) e a maioria (9/11; 81,8%) amamentou seus filhos antes de descobrirem ser

portadoras do HIV. Quatro mulheres (36,4%) declararam já ter feito, pelo menos, um aborto e uma mãe possuía dois filhos portadores do vírus. Até 2004, foram registrados no Acre nove casos de transmissão vertical.

Quanto ao uso do preservativo, seis participantes (54,5%) afirmaram não o ter usado na última relação sexual e, em relação à TARV, todas as mulheres estavam fazendo uso no momento da coleta da amostra.

Em relação ao histórico de DST, quatro mulheres (36,3%) revelaram já ter tido algum tipo e o mesmo percentual de participantes referiu já ter se relacionado com parceiros de outro Estado, sendo que duas (18,2%) também relataram já ter tido parceiros de outros países. A maior parte das mulheres (6/11; 54,5%) relatou realizar a prática de sexo anal esporadicamente e o mesmo número de entrevistadas afirmou possuir parceiro portador do HIV. Todas as participantes relataram ter um único parceiro e nenhuma referiu fazer uso de drogas endovenosas.

Nenhuma relação estatística foi feita entre as informações epidemiológicas deste grupo estudado com o número de linfócitos T CD4+ e a carga viral plasmática do HIV, em virtude da não disponibilização desses dados para que fosse feita tal análise.

No estado do Tocantins, as mulheres participantes do estudo (n=25) são provenientes dos municípios de Palmas, Taquari, Rio Sono, Miranorte, Miracema e Dianópolis.

No que diz respeito às grávidas (n=9), a idade variou entre 23 e 32 anos (média de 26 anos), sendo que quatro (44,4%) já possuíam dois ou mais filhos. Todas estas referiram ter amamentado seus filhos antes de terem conhecimento de seu estado de portadora do HIV e uma das participantes (11,1%) referiu já ter realizado um aborto. O

período gestacional variou entre um e sete meses, sendo que duas grávidas (22,2%) estavam fazendo uso de TARV e as outras ainda não haviam começado.

No que se refere ao grau de escolaridade das grávidas, uma (11,1) era analfabeta, duas (22,2%) possuíam o ensino fundamental incompleto e uma (11,1%) afirmou já ter concluído o ensino médio. Em relação à renda familiar, todas as grávidas relataram o ganho de um a três salários mínimos mensais, sendo que três (33,3%) eram domésticas, uma (11,1%) era estudante e uma (11,1%) era dona de casa.

Quanto ao uso do preservativo, duas participantes (22,2%) afirmaram não o ter usado na última relação sexual. No que concerne ao histórico de DST, todas referiram nunca ter tido alguma doença, assim como nunca praticaram sexo anal. Três grávidas (33,3%) relataram já ter tido relações sexuais com parceiros de outros Estados, porém nenhuma relatou já ter tido parceiros de outros países. Nenhuma das entrevistadas referiu parceiro portador do HIV. Todas as participantes relataram ter um único parceiro e nenhuma referiu fazer uso de drogas endovenosas.

Em relação às mães (n=16), a idade variou entre 19 e 37 anos (média de 29,1 anos), sendo que a maioria é casada (10/16; 62,5%) e possui renda familiar de 1 a 3 salários mínimos mensais (12/16; 75%). Uma grande parte delas é doméstica (7/16; 43,7%) ou dona de casa (7/16; 43,7%), sendo seguido de lavadeira (1/16; 6,2%) e autônoma (1/16; 6,2%).

No que se refere ao grau de escolaridade, 12 mulheres (75%) referiram possuir somente o ensino fundamental completo ou incompleto, enquanto que quatro (25%) declararam possuir o ensino médio completo ou incompleto. Quinze mulheres (93,7%) já possuíam outros filhos antes da última gravidez, sendo que nove (56,2%) os amamentaram

antes de terem sido diagnosticadas como portadoras do HIV. Treze participantes (81,2%) estavam fazendo uso de TARV atualmente.

No que concerne ao histórico de DST, apenas duas mulheres (12,5%) referiram já ter tido algum tipo. Sete participantes (43,7%) disseram já ter tido relacionamento com parceiros de outro Estado e nenhuma referiu parceiro de outro país, sendo que nove (56,2%) possuíam parceiros portadores do HIV. A maioria das mulheres (60%) relatou nunca realizar a prática de sexo anal e uma das participantes (6,25%) referiu já ter feito uso de drogas endovenosas.

Quanto ao uso do preservativo, sete participantes (43,7%) afirmaram não o ter usado na última relação sexual, embora a maioria (12/16; 75%) tenha referido possuir um parceiro fixo. Duas mulheres (12,5%) já mantiveram relações sexuais com parceiros usuários de drogas endovenosas e nenhuma relatou ter feito transfusão sangüínea. As características epidemiológicas e comportamentais estão descritas nas Tabelas 2 e 3.

Tabela 2 - Características epidemiológicas das mulheres participantes do estudo residentes no Estado do Tocantins (n=25).

Característica sócio-demográfica		**Número**	**Percentual**
Faixa etária	19-29	15	60
	30-37	10	40
Estado civil	Casada	18	72
	Solteira	7	28
Escolaridade	Analfabeto	1	4
	Fundamental incompleto	13	52
	Fundamental completo	1	4
	Médio incompleto	3	12
	Médio completo	5	20
	Sem informação	2	8
Renda familiar	<1 salário mínimo	3	12
	1-3 salários mínimos	20	80
	4-6 salários mínimos	1	4
	Sem informação	1	4

Tabela 3 - Características comportamentais das mulheres participantes do estudo residentes no Estado do Tocantins (n=25).

Fatores de risco			**Número**	**Percentual**
Uso de preservativo	Sempre		3	12
	Nunca		10	40
	Ás vezes		10	40
	Sem informação		2	8
Sexo anal	Sempre		1	4
	Nunca		21	84
	Ás vezes		2	8
	Sem informação		1	4
Histórico de DST	Sim		5	20
	Não		20	80
Abortos	Sim		10	40
	Não		11	44
	Sem informação		4	16
Uso de drogas	UDE	Sim	1	4
		Não	24	96
	UDNE	Sim	4	16
		Não	21	84
Parceiros mês/semana	01		11	44
	02 a 19		11	44
	Sem informação		3	12
Parceiros de outros estados	Sim		11	44
	Não		11	44
	Sem informação		3	12
Comportamento sexual	Parceiro UDE		1	4
	Parceiro UDNE		2	8
	Parceiro HIV+		12	48

Em relação ao número de linfócitos T CD4+ e à carga viral plasmática do HIV, foi possível obter informações de 13 participantes (Tabela 4). Não houve correlação, estatisticamente significativa, entre o tempo de gravidez e o uso de TARV com o número de linfócitos T CD4+ e a carga viral plasmática do HIV.

Tabela 4 - Distribuição das contagens de linfócitos T CD4+ e da carga viral entre mulheres portadoras do HIV-1 de Tocantins participantes do estudo.

Variáveis	**Valor Absoluto**	**Frequência**	***p***
	274 |— 474	5	
Linfócitos T	474 |— 674	6	
$CD4^+$	674 |— 874	1	
(Células/mm^3)	874 |— 1074	1	0,30
	1,699 |— 2,699	4	
Carga viral	2,699 |— 3,699	1	
(log_{10})	3.699 |— 4,699	8	0,23

As Figuras 7, 8 e 9 mostram, graficamente, uma comparação entre as mulheres participantes do estudo nos dois estados, Acre e Tocantins, em relação ao estado civil, nível de escolaridade e renda familiar.

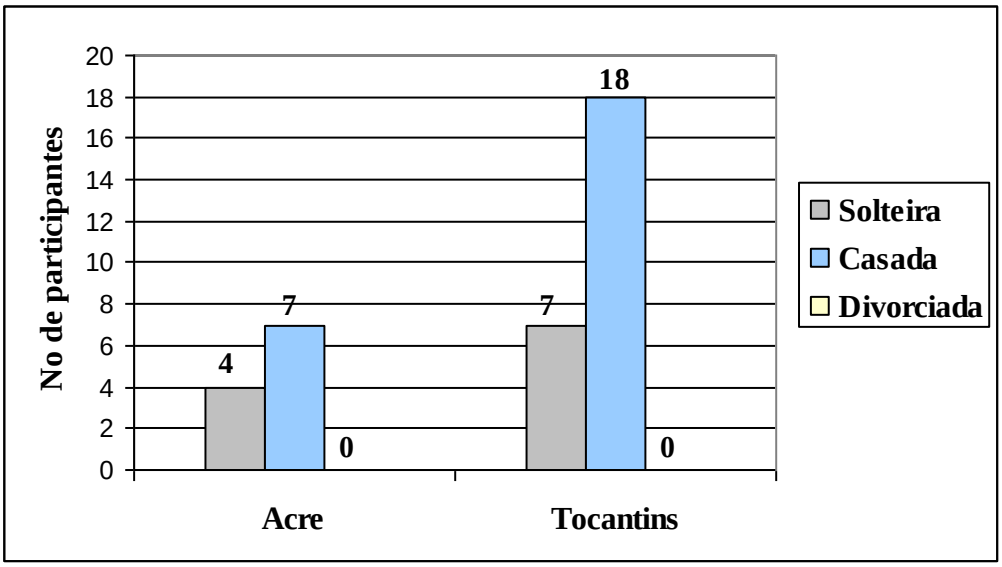

Figura 7 - Estado civil das mulheres participantes do estudo nos respectivos estados analisados.

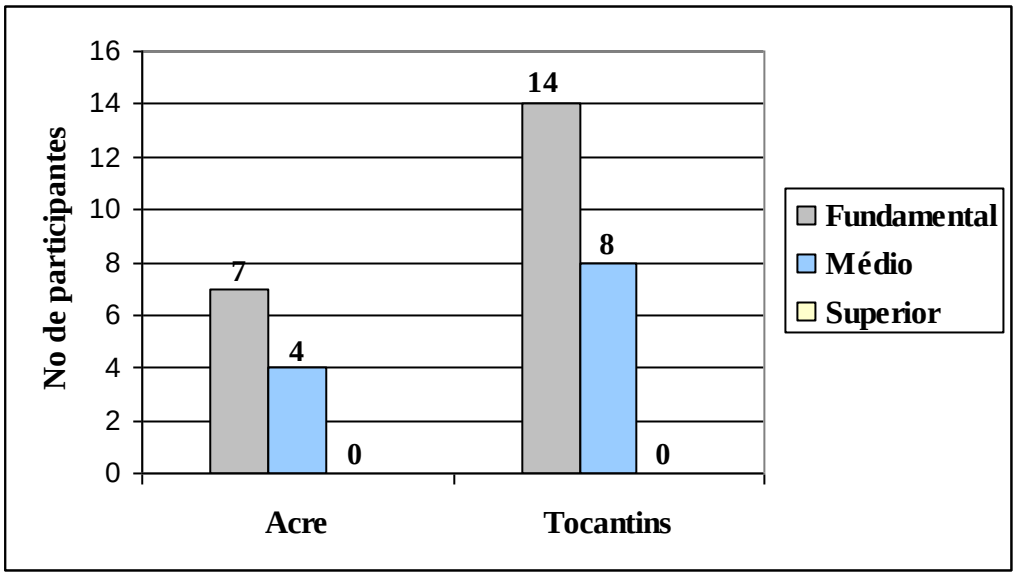

Figura 8 - Comparação do nível de escolaridade das mulheres participantes do estudo nos respectivos estados analisados.

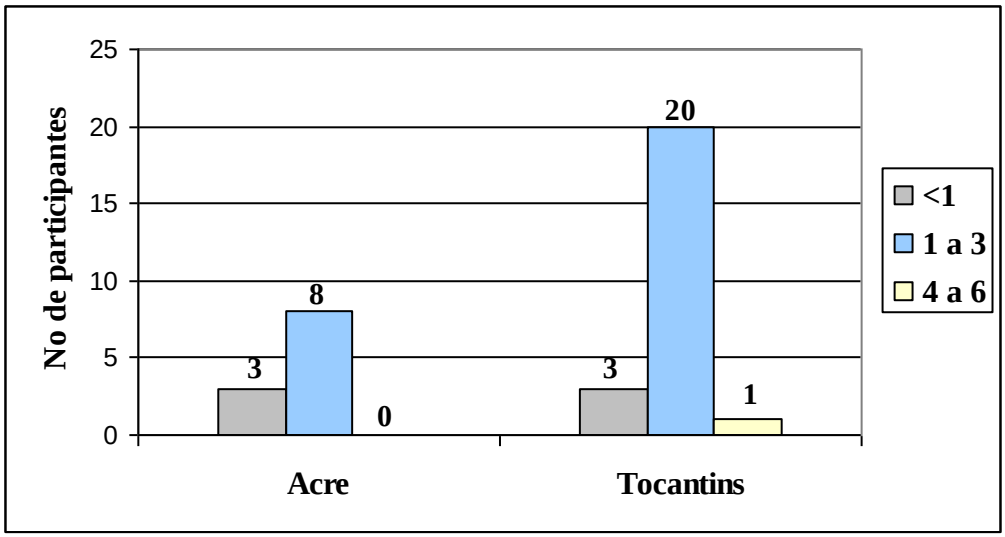

Figura 9 - Comparação da renda familiar (em salário mínimo) das mulheres participantes do projeto entre os Estados estudados.

3.1 IDENTIFICAÇÃO DOS SUBTIPOS DO HIV-1 CIRCULANTES NA POPULAÇÃO DE MULHERES GRÁVIDAS E DE MÃES PORTADORAS DO VÍRUS

No Acre, quanto ao segmento da protease, onze amostras foram amplificadas, sendo todas pertencentes ao subtipo B. O mesmo ocorreu em relação ao segmento da transcriptase reversa, em que das dez amostras amplificadas, todas são pertencentes ao subtipo B. Em Tocantins, quanto ao segmento da protease, foram amplificadas nove amostras, sendo todas pertencentes ao subtipo B, já em relação ao segmento da transcriptase reversa oito amostras foram amplificadas, sendo sete pertencentes ao subtipo B (87,5%; 7/8) e uma (12,5%; 1/8) pertencentes ao subtipo F (Figura 10 e 11).

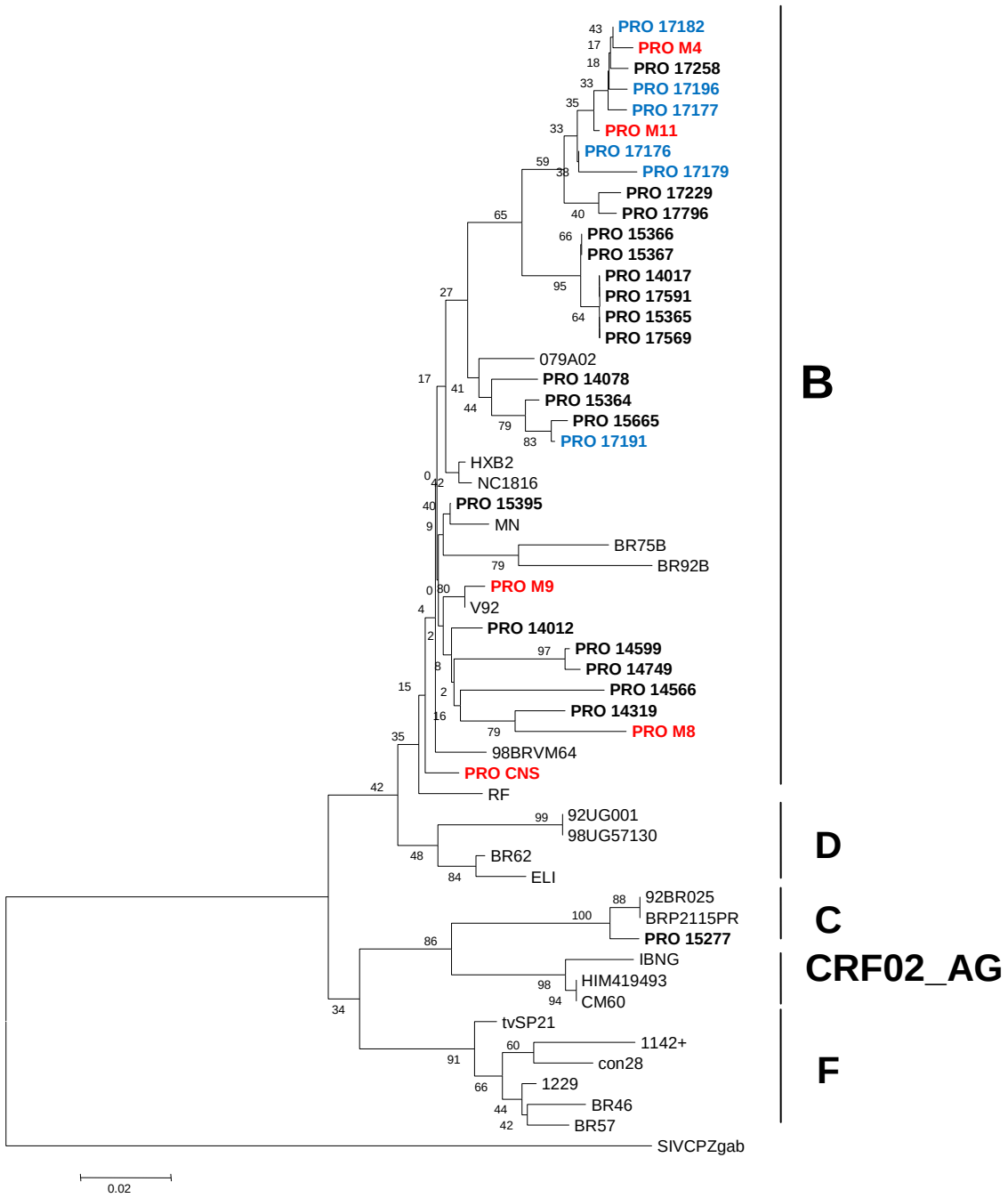

Figura 10 - Análise filogenética baseada no alinhamento de 249 nucleotídeos do gene *pro* de amostras do Acre (em vermelho) e Tocantins (em azul) com cepas referências retiradas do banco de dados *Los Alamos* (em preto). A sequência do SIV_{CPZGAB} foi usada como grupo externo. A árvore foi construída usando o método de agrupamento de vizinhos (NJ) utilizando-se o método de Kimura 2-parâmetros. Os números nos nós da árvore indicam o valor do *bootstrap*, obtidos usando-se 2.000 réplicas. A barra de escala representa uma divergência de 2%.

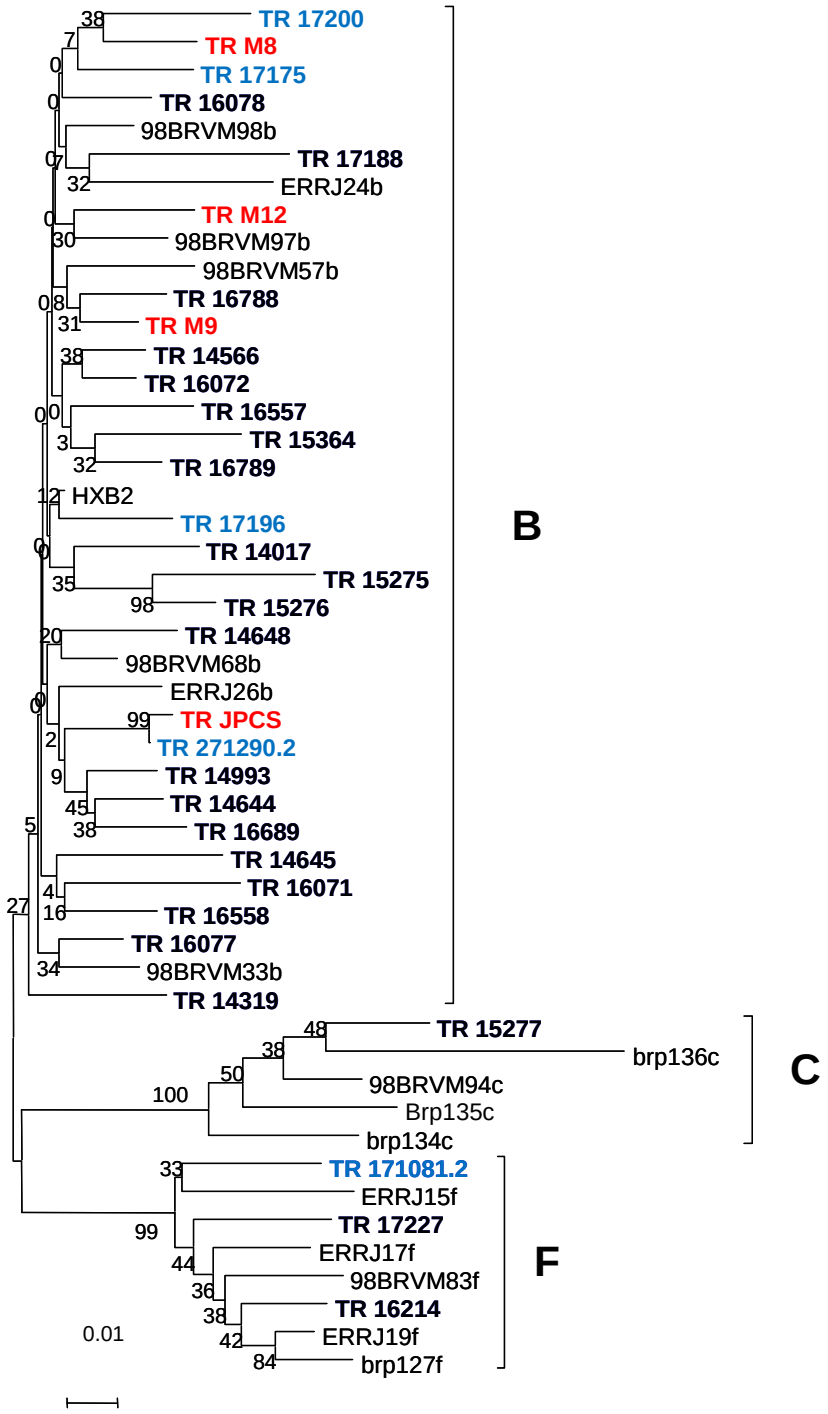

Figura 11 - Árvore filogenética baseada no alinhamento de 450 nucleotídeos do gene da trancriptase reversa de amostras do Acre (em vermelho) e Tocantins (em azul) e as cepas referências do banco de dados *Los Alamos* (em preto). A árvore foi construída usando o método de agrupamento de vizinhos (NJ) utilizando-se o método de Kimura 2-parâmetros. Os números nos nós da árvore indicam o valor do *bootstrap*, obtidos usando-se 2.000 réplicas. A barra de escala representa uma divergência de 1%.

3.2 CONHECIMENTO DO PERFIL DE RESISTÊNCIA/SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIRETROVIRAIS (ARV) UTILIZADOS ATUALMENTE DAS CEPAS DO HIV-1 IDENTIFICADAS NAS CIDADES ESTUDADAS

Quanto à resistência aos ARV, todas as cepas do HIV identificadas no Acre mostraram-se suscetíveis aos inibidores de protease. Apenas uma grávida de Tocantins (4,7%) apresentou cepa de HIV caracterizando alguma resistência aos inibidores de protease utilizados atualmente (Quadro 8).

Quadro 8 - Perfil de mutações em amostras que apresentaram algum nível de resistência aos inibidores de protease.

Amostra	**Local**	**Mutações**	**Perfil**
17175	TO	V32I, L90M, K43T	atazanavir (ATV) Resistência intermediária darunavir (DRV) Baixa resistência fosamprenavir (FPV) Resistência intermediária indinavir (IDV) Resistência intermediária lopinavir (LPV) Baixa resistência nelfinavir (NFV) Resistência intermediária saquinavir (SQV) Resistência intermediária tipranavir (TPV) Baixa resistência

Em relação à grávida de Tocantins, a mesma residia em Rio Sono, possuía 32 anos de idade, quatro filhos não portadores do HIV, usava TARV desde 1997 e referiu ter abandonado o tratamento em algum momento.

Quanto ao padrão de resistência aos ITRN, foram encontradas mutações de resistência em duas (2/25; 8%) mulheres provenientes do Tocantins e somente em uma (1/11; 9,1%) mulher pertencente ao estado do Acre observou-se baixa resistência ao AZT. Nesse mesmo estado encontrou-se a mutação M184K em uma das amostras, entretanto esta

é uma mutação atípica presente no códon 184, a qual não confere nenhum significado clínico quanto à resistência aos ITRN (http://hivdb.stanford.edu/pages/documentpage/drm.html). Quanto aos ITRNN foram encontradas mutações de resistência em cinco (5/25; 20%) mulheres de Tocantins (uma grávida e quatro mães) e em uma mãe do Acre (1/11; 9,1%), sendo que a presença de mutações que conferem resistência às três classes de medicamentos foi observada em uma grávida do estado de Tocantins (1/25; 4%) (Quadros 8 e 9).

Quadro 9 - Perfil de mutações em amostras que apresentaram algum nível de resistência aos inibidores de transcriptase reversa.

Amostra	**Local**	**Mutações**	**Perfil**	**Características Epidemiológicas**
17189	TO	V118I, K103N, E138D	**ITRNN** DLV Alta resistência EFV Alta resistência ETV Baixa resistência em potencial NVP Alta resistência	Grávida (5 meses); 23 anos; reside em Miranorte (interior); usava TARV desde 2005; doméstica; não tinha filhos; parceiro UDNE; Já teve parceiros de outros estados (MA, PA).
17602	TO	M184K, Y181S	**ITRNN** DLV Resistência intermediária EFV Baixa resistência em potencial ETV Baixa resistência em potencial NVP Resistência intermediária	Grávida (7 meses), reside em Palmas, não usava TARV, 27a, doméstica, 2 filhos, fez pré-natal dos dois.
17201	TO	K103N	**ITRNN** DLV Alta resistência EFV Alta resistência ETV Baixa resistência em potencial NVP Alta resistência	Mãe, reside em Palmas, usa TARV desde 2002, 37 anos, 3 filhos, fez pré de todos, amamentou, UDNE, parceiro HIV+, já abandonou o tratamento.

Quadro 9 (Continuação).

17175	TO	M41L D67N K101E	**ITRN** ABC Baixa resistência AZT Resistência intermediária D4T Baixa resistência DDI Baixa resistência TDF Baixa resistência **ITRNN** DLV Resistência intermediária EFV Baixa resistência ETV Baixa resistência NVP Resistência intermediária	Grávida, reside em Rio Sono (TO), usa TARV desde 1997, 32a, 4 filhos, analfabeta, já abandonou o tratamento.
17158	AC	K103N	**ITRNN** DLV Alta resistência EFV Alta resistência ETV Baixa resistência em potencial NVP Alta resistência	Mãe, reside em Rio Branco (AC), usa TARV desde 2004, 22 anos, 4 filhos, UDNE, parceiro HIV+, já abandonou o tratamento.
17200	TO	M41L, V75M, F77L, M184V, L100I, K103N	**ITRN** 3TC Alta resistência ABC Resistência intermediária AZT Baixa resistência D4T Resistência intermediária DDI Resistência intermediária FTC Alta resistência TDF Baixa resistência em potencial **ITRNN** DLV Alta resistência EFV Alta resistência ETV Resistência intermediária NVP Alta resistência	Mãe, reside em Palmas (TO), 36 anos, 3 filhos, 1 aborto, fez pré-natal de todos, usa TARV desde 1996, parceiro HIV+, já teve parceiro de MG, já teve parceiro UDI, já teve DST e já abandonou o tratamento.

ITRN: Inibidor de transcriptase reversa nucleosídico; ITRNN: Inibidor de transcriptase reversa não nucleosídico; 3TC: Lamivudina; ABC: Abacavir; AZT: Zidovudina; D4T: Estavudina; DDI: Didanosina; FTC: Entricitabina; TDF: Tenofovir; DLV: Delavirdina; EFV: Efavirenz; ETV: Etravirina; NVP: Nevirapina.

Os quadros 10, 11 e 12 mostram, respectivamente, os aminoácidos existentes, bem como suas funções biológicas e as substituições de aminoácidos encontradas em algumas posições críticas referentes à resistência aos inibidores de transcriptase reversa.

Quadro 10 - Aminoácidos e suas funções biológicas

Nome (essenciais[a])	**Símbolo**	**Abreviação**	**Função biológica**
Arginina	Arg	R	Divisão celular e vasodilatação.
Fenilalanina	Phe, Fen	F	Funciona como parte integral de todas as proteínas do nosso organismo.
Histidina	His	H	Importante na ligação dos sítios ativos das proteínas aos seus substratos.
Isoleucina	Ile	I	É importante no processo de incorporação em enzimas bem como em outras proteínas, possibilitando a formação da estrutura terciária e quaternária dessas macromoléculas.
Leucina	Leu	L	Aumento da síntese proteíca e atua como fonte de energia em exercícios físicos.
Lisina	Lys, Lis	K	Crescimento ósseo e formação do colágeno.
Metionina	Met	M	Fundamental para o ínicio da síntese protéica.
Treonina	Thr, The	T	Essencial para a função biológica das imunoglobulinas.
Triptofano	Trp, Tri	W	Antidepressivo natural e induz ao sono.
Valina	Val	V	Possui pouca função nas reações químicas do organismo, sendo de grande importância na determinação da estrutura tridimensional das proteínas.
Nome (não-essenciais[b])	**Símbolo**	**Abreviação**	**Função biológica**
Alanina	Ala	A	Atua no metabolismo do Triptofano e no processo de gliconeogênese.
Asparagina	Asn	N	É importante na biosíntese de glicoproteínas, bem como de outras proteínas.

Aspartato	Asp	D	Neurotransmissor excitatório do cérebro e confere resistência a fadiga.
Cisteína	Cys, Cis	C	Importante como suplemento alimentar.
Glicina	Gly, Gli	G	Precurssora de diversas espécies químicas e funciona como neurotransmissor inibitório do Sistema Nervoso Central.
Glutamato	Glu	E	Participa da produção de metabólitos essenciais em várias vias metabólicas e atua também como neurotransmissor excitatório do Sistema Nervoso.
Glutamina	Gln	Q	Manutenção do sistema imunológico, controle do pH sanguíneo, desintoxicação corporal do nitrogênio e da amônia e importante na síntese de nucleotídeos.
Prolina	Pro	P	Funciona como elemento primário na formação do colágeno.
Serina	Ser	S	É importante na composição da maioria dos glicolipídeos presentes nas células.
Tirosina	Tyr, Tir	Y	É um derivado da fenialanina e quando hidroxilado participa da síntese de diversas substâncias bioquímicas importantes como hormônios da tireóide, dos pigmentos da melanina e das catecolaminas.

a: aminoácidos obtidos por meio da alimentação;
b: aminoácidos sintetizados pelo organismo.
Fonte: http://www.gerbras.com.br/acervo/amino_principais.asp

Quadro 11 - Substituições de aminoácidos nas sequências de TR de cepas do HIV-1 provenientes das cidades estudadas nas posições chaves associadas com a resistência às drogas ITRNN disponíveis.

	Mutações no gene *TR* baseando-se nas posições dos aminoácidos da sequência consenso										
Subtipo											
Consenso	98A	100L	101K	103K	106V	108V	138E	179V	181Y	188Y	190G
	-*	**I**[1]**	E[1]	N[4]	-	-	D[2]	-	S[1]	-	-
							V[1]				

* Ausência de mutações na posição.
**As letras representam as substituições de aminoácidos e os números indicam o número de amostras que apresentam a mutação. As mutações em negrito estão associadas com altos níveis de resistência fenotípica ou evidência clínica de resposta virológica reduzida a alguns antiretrovirais (http://hivdb.stanford.edu/cgi-bin/NNRTIResiNote.cgi).

Quadro 12 - Substituições de aminoácidos nas sequências de TR de cepas do HIV-1 das cidades estudadas nas posições chaves associadas com a resistência às drogas ITRN disponíveis atualmente.

	Mutações no gene *TR* baseando-se nas posições dos aminoácidos da sequência consenso													
Subtipo	41M	62A	65K	67D	69T	70K	74L	75V	77F	115Y	118V	I51Q	184M	219K
Consenso	**L[2]****	**-***	**-**	N[1]	-	-	-	M[1]	L[1]	-	I[3]	-	**K[1]**	R[1]
													V[1]	

* Ausência de mutações na posição.
** As letras representam as substituições de aminoácidos e os números indicam o número de amostras que apresentam a mutação. As mutações em negrito estão associadas com altos níveis de resistência fenotípica ou evidência clínica de resposta virológica reduzida a alguns antiretrovirais (http://hivdb.stanford.edu/cgi-bin/NRTIResiNote.cgi).

4 DISCUSSÃO

4.1 DADOS EPIDEMIOLÓGICOS

A falta de informação, associada à baixa escolaridade e à baixa renda familiar são fatores que conferem risco de exposição à infecção pelo HIV em nosso país (Moura & Praça, 2006) e não difere do encontrado no presente estudo, uma vez que a maioria das mulheres participantes apresentava baixa escolaridade (primeiro grau incompleto), baixa renda familiar (1 a 3 salários mínimos) e eram donas de casa, o que reflete a parcela da população mais atingida pelo HIV.

Desde a sua introdução, a TARV reduziu, consideravelmente, a morbidade e a mortalidade associada à infecção pelo HIV no Brasil, diminuindo, desta forma, o risco de transmissão vertical do vírus (Soto-Ramirez *et al*., 2008). No presente trabalho, foi verificado que a única grávida de Rio Branco, Acre, fazia uso de TARV no momento da coleta da amostra, o que garantia assim uma diminuição no risco de transmissão do vírus para a criança, estando dessa forma de acordo com as recomendações para prevenção da transmissão vertical (Coovadia, 2009). Em contrapartida, no estado do Tocantins, 77,7% das grávidas inseridas no trabalho não estavam fazendo uso da TARV como forma de tratamento e prevenção da transmissão do HIV para seu bebê, em virtude da idade gestacional ou da procura tardia da realização do pré-natal.

Em relação às mães, todas participantes do trabalho provenientes do Acre e a maioria do estado do Tocantins relataram a utilização da TARV, entretanto uma das mães do Acre já possuía dois filhos portadores do HIV, o que podemos inferir ter ocorrido uma falha na prevenção da transmissão vertical do HIV.

Como o HIV está presente no leite materno, a amamentação acaba conferindo um fator de risco para a transmissão do vírus, sendo que esse risco aumenta de forma diretamente proporcional de acordo com o tempo de amamentação (Petropoulou *et al*., 2006; John-Stewart *et al*,. 2004). No presente estudo vimos que o ato de amamentar não é uma rotina entre mães infectadas pelo HIV, já que em nosso trabalho a maioria das mães, (9/10) no Acre e (9/16) no Tocantins, relatou que amamentou seus filhos somente antes do conhecimento da infecção pelo vírus, diminuindo, dessa forma, o risco de transmissão do vírus.

Alguns estudos mostram evidências de que há uma diminuição na contagem de linfócitos T CD4+ em mulheres portadoras do HIV, todavia as consequências imunológicas dessas mudanças ainda não são bem conhecidas (Burns *et al*., 1996; Newell *et al*., 1997). No entanto, no presente trabalho, não houve correlação, estatisticamente significativa, entre o tempo de gravidez e o uso de TARV com o número de linfócitos T CD4+ e a carga viral plasmática do HIV, provavelmente devido à influência da TARV no curso natural da infecção pelo HIV (Burns *et al*., 1998). Além desse fato, outros estudos demonstram que a gravidez não parece acelerar a progressão para a AIDS, o aparecimento de imunossupressão severa (contagem de linfócitos T CD4+ < 100 cels/µL) ou de infecções oportunistas (Alliegro *et al*., 1997; Saada *et al*., 2000; Weisser *et al*., 1998). No entanto, Stratton *et al*. (1999) demonstraram uma associação estatisticamente significativa entre a presença de imunossupressão durante a gravidez (células T CD4+ < 14%) e o nascimento de crianças prematuras.

4.2 EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DO HIV-1

Vários estudos de epidemiologia molecular do HIV-1 no Brasil revelaram que o subtipo B é a cepa mais prevalente no país, sendo que também já foi descrita a presença dos subtipos C, D, F e diversas formas recombinantes (Cerqueira *et al*., 2004; Cabral *et al*., 2006; Medeiros *et al*., 2006). No presente trabalho, verificou-se que o subtipo B também foi o mais prevalente nos dois estados estudados, sendo que o segundo subtipo mais prevalente foi o F, a qual era proveniente do estado de Tocantins. Esses achados estão de acordo com o encontrado por Vicente *et al*. (2000) em estudo realizado em Manaus, onde foi descrita a prevalência de 38,7% do subtipo B e 16% pelo subtipo F, bem como em estudo mais recente desenvolvido por Machado *et al*. (2004) nas cidades de Belém e Macapá, também região Norte do Brasil, o qual foi identificado à circulação dos dois subtipos.

Os achados descritos no presente estudo também estão de acordo com o que foi encontrado em outras regiões do Brasil, como demonstrado em estudos realizados no Rio Grande do Sul (região Sul) (Bello *et al*., 2008); São Paulo (Molina *et al*., 2009), Espírito Santo (Cabral *et al*., 2006) e Rio de Janeiro (região Sudeste) (Eyer-Silva *et al*., 2007); Brasília, Goiás, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul (região Centro-Oeste) (Stefani *et al*., 2007) e, finalmente, na região Nordeste, nos estados da Bahia (Monteiro *et al*., 2009), Ceará (Gadelha *et al*., 2003) e Pernambuco (Medeiros *et al*., 2006).

O presente estudo também esta de acordo com o que é descrito na América do Sul, onde vemos a predominância dos subtipos B, F e das formas recombinantes formadas por esses dois subtipos (www.hiv.lanl.gov/components/sequence/HIV/geo). A não identificação de outros subtipos ou de formas recombinantes no presente trabalho pode

ser atribuída ao número amostral reduzido, já que os presentes resultados foram obtidos de um grupo amostral bem específico. Diante desse fato faz-se necessário a realização de estudos mais extensos que envolvam outros grupos amostrais, garantindo assim uma cobertura maior na área estudada.

4.3 RESISTÊNCIA AOS INIBIDORES DE PROTEASE

A elevada taxa de mutação gênica do HIV-1 tem como consequência o desenvolvimento de cepas virais mutantes, as quais são mais eficazmente selecionadas sob condições de pressão seletiva exercida ou pelo sistema imunológico ou pela administração de ARV (Martinez-Picado & Martínez, 2008).

As mutações no gene da protease do HIV podem ser classificadas como primárias ou secundárias, somente para a região da protease. As mutações primárias acabam alterando a ligação do ARV utilizado ao seu sítio de ligação, dessa forma levam a um aumento constante na quantidade de droga a ser utilizada para inibir a enzima alvo. Diferentemente das primárias, as mutações secundárias não são capazes, na ausência das mutações primárias, de atribuir resistência ao ARV utilizado, entretanto, quando presentes, contribuem para o restabelecimento da capacidade replicativa do HIV quando associadas às mutações primárias (Johnson *et al*., 2005).

No presente estudo verificou-se que somente uma grávida, residente no estado de Tocantins, possui mutações na região da protease (V32I, L90M e K43T) que estão associadas à resistência aos IP. A não presença de mutações primárias, bem como de outras mutações secundárias, pode ser atribuída devido ao pequeno número amostral do presente estudo ou mesmo devido a pouca variabilidade de mutações de resistência,

presentes na população estudada. A baixa prevalência de cepas do HIV que apresentam resistência a esta classe de medicamentos reflete a baixa circulação de vírus com resistência aos IP na região Norte do país.

Alguns estudos revelaram que dentro de um espectro de várias mutações de resistência associadas aos IP, para que uma cepa seja considerada resistente, faz-se necessária a presença de oito ou mais mutações, sendo que uma resistência parcial pode ser observada a pelo menos cinco a sete dessas mutações (Kempf *et al*., 2001; Sabino, 2006). Esse fato sugere que o desenvolvimento de resistência a um ARV é algo mais complexo, exigindo a acumulação de várias mutações, algo não observado no presente estudo, em que houve a identificação de apenas duas mutações de resistência ao TPV na amostra analisada, as mutações V32I e K43T.

Recente estudo realizado no Ceará, Nordeste do Brasil, que avaliou perfis de resistência a ARV em portadores do HIV que já haviam utilizado outros medicamentos, obteve a L90M como principal mutação de resistência aos IP, sendo que o lopinavir mostrou ser o melhor medicamento a ser utilizado como tratamento, já que para o desenvolvimento de resistência a esse IP é preciso que haja uma grande acumulação de mutações (Medeiros *et al*., 2007). Esse fato acaba contribuindo como sendo o lopinavir o medicamento de sugestão a ser utilizado na população do presente trabalho, já que o único paciente com resistência a IP apresentou apenas três mutações de resistência, V32I, K43T e L90M.

4.4 RESISTÊNCIA AOS INIBIDORES DE TRANSCRIPTASE REVERSA

Os ITRN utilizados inicialmente como TARV são esquemas compostos por tenofovir/emtricitabina, zidovudina/lamivudina e abacavir/lamivudina por combinações de doses (Shafer, 2009). As mutações M41L e D67N conferem resistência a zidovudina e a estavudina (Hammer, 2006; Johnson *et al*., 2008). Já a mutação M184V confere resistência a lamivudina por meio da diminuição da incorporação de trifosfato a molécula desse ARV, bem como ao abacavir e a emtricitabina (Hammer, 2006; Johnson *et al*., 2008). No presente estudo, identificou-se a presença das mutações M41L, D67N, F77L e M184V que são relacionadas à resistência aos ITRN e as mutações K101E, K103N e L100I que estão relacionadas à resistência aos ITRNN.

Após a avaliação da susceptibilidade antiretroviral das amostras utilizadas no presente estudo, observou-se que a mutação mais prevalente associada à resistência a classe dos ITRN foi a V118I. Entretanto, tal mutação ocorre em, aproximadamente, 2% de pessoas não tratadas com TARV, sendo que sua freqüência aumenta em pessoas que já utilizam vários ITRN como tratamento e causa baixa resistência a 3TC (http://hivdb.stanford.edu/pages/documentpage/drm.html). No presente trabalho, encontrou-se uma prevalência maior que o encontrado em Recife, Nordeste do Brasil (5,9%) (Medeiros *et al*., 2006). Outro trabalho realizado por Medeiros *et al*. (2007), no estado do Ceará, também Nordeste do Brasil, verificou a prevalência de 8,8% dessa mutação. Tal diferença nas referidas prevalências pode ser atribuída à grande discrepância em relação ao número de amostras analisadas nos trabalhos.

Estudo realizado em grávidas, que utilizavam monoterapia com o AZT, apresentou a mutação M184V, a qual isoladamente foi suficiente para gerar diminuição de

susceptibilidade a D4T (Clarke *et al*., 1999). No presente estudo observou-se a presença da mutação M184V em uma amostra analisada, sendo observada uma resistência intermediária a D4T. Estudo feito por Medeiros *et al*. (2007), no estado do Ceará, revelou a presença da mutação M184V, semelhante ao encontrado nos estados do Acre e Tocantins.

Outras mutações de grande relevância são aquelas selecionadas por análogos de timidina (TAM), como a M41L e a D67N, estas mutações conferem resistência para todos os ITRN, sendo que o grau de resistência cruzada a estes medicamentos é dependente da presença de mutações específicas ou do número de mutações envolvidas (Johnson *et al*., 2008). No presente estudo, houve a combinação das mutações M41L e D67N, apresentando baixa resistência a ABC, D4T, DDI e TDF e resistência intermediária ao AZT, semelhante ao encontrado em recente estudo feito no Nordeste do Brasil (Medeiros *et al*., 2007). Neste, a presença da mutação M184V conferiu resistência apenas a 3TC e FTC, enquanto que na presença de outra mutação, a M41L, houve uma diminuição na susceptibilidade a todos os outros ITRN, fato semelhante ocorreu no presente estudo em que a presença das duas mutações conferiu resistência a todos os ITRN utilizados, em diferentes graus.

Outras mutações relacionadas à resistência aos ITRN foram identificadas no presente trabalho, entretanto suas contribuições para tal processo ainda não é bem conhecida, como é o caso das mutações V75M, F77L e K219R ou mesmo é uma mutação atípica de um códon específico, como é o caso da mutação M184K (http://hivdb.stanford.edu/pages/documentpage/ drm.html).

Recente estudo feito na Costa do Marfim, África Ocidental, tendo como objetivo analisar a resposta à TARV entre mulheres expostas a dose simples de NVP e/ou AZT, com ou sem a presença de 3TC, como forma de prevenção da transmissão vertical do

HIV-1, revelou que 17,1% das mulheres desenvolveram mutações de resistência após exposição ao inibidor de transcriptase reversa não nucleosídico NVP, sendo que destas mutações 16,2% foi a K103N (Arrivé *et al*., 2007), semelhante ao encontrado no presente estudo, onde a mutação K103N foi a mais prevalente. Assim como foi encontrado também em recente estudo feito no Brasil, o qual verificou-se que a mutação K103N foi a mais presente em uma população de crianças que já utilizavam TARV (Shafer, 2009). No presente trabalho, verificou-se uma baixa freqüência quanto à resistência as três classes de ARV, o que está de acordo com o observado por Machado *et al*. (2005), nas cidades de Belém e Macapá.

5. CONCLUSÕES

i) Nos dois estados estudados, a maioria das mulheres possuía baixo nível de escolaridade, eram casadas, domésticas de pouco poder aquisitivo;

ii) Muitas mulheres relataram não terem feito o uso do preservativo em suas últimas relações sexuais, o que pode contribuir para a transmissão do HIV e a ocorrência de nova gravidez;

iii) A maioria das cepas de HIV encontrada nos estados do Acre e Tocantins pertence ao subtipo B, embora tenha sido identificada uma amostra sendo como do subtipo F, no Tocantins, que parece estar se disseminando para a região Norte do Brasil;

iv) A maioria das cepas de HIV isoladas mostrou ser susceptível aos antiretrovirais utilizados, indicando que ainda é baixa a circulação de cepas do HIV resistentes a estes medicamentos, havendo também uma baixa freqüência de mutações primárias às drogas antiretrovirais utilizadas atualmente nos dois estados estudados;

v) Não houve correlação entre o tempo de gravidez e o uso de TARV com o número de linfócitos T CD4+ e a carga viral plasmática do HIV da população estudada no estado de Tocantins, não sendo possível inferir tal correlação estatística para o estado do Acre, já que não houve disponibilização desses dados para que fosse feita tal análise.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLIEGRO, M. B.; DORRUCCI, M.; PHILLIPS, A. N.; PEZZOTTI, P.; BOROS, S.; ZACCARELLI, M.; PRISTERÀ, R.; REZZA, G. Incidence and consequences of pregnancy in women with known duration of HIV infection. Italian Seroconversion Study Group. **Archives of Internal Medicine, 157:** 2585-2590, 1997.

APETREI, C.; DESCAMPS, D.; COLLIN, G.; LOUSSERT-AJAKA, I.; DAMOND, F.; DUCA, M.; SIMON, F.; BRUN-VÉZINET, F. Human Immunodeficiency Virus Type 1 Subtype F Reverse Transcriptase Sequence and Drug Susceptibility. **Journal of Virology, 72:** 3534–3538, 1998.

ARORA, V. K.; FREDERICKSEN, B. L.; GARCIA, J. V. Nef: agent of cell subversion. **Microbes and Infection, 4:** 189–199, 2002.

ARRIVÉ, E.; NEWELL, M. L.; EKOUEVI, D. K.; CHAIX, M. L.; THIEBAUT, R.; MASQUELIER, B.; LEROY, V.; VAN DE PERRE, P.; ROUZIOUX, C.; DABIS, F. Prevalence of resistance to nevirapine in mothers and children after single-dose exposure to prevent vertical transmission of HIV-1: a meta-analysis. **International Journal of Epidemiology, 36:** 1009–1021, 2007.

ARTHUR, L. O.; BESS, J. W.; SOWDER, R. C. I.; BENVENISTE, R. E.; MANN, D. L.; CHERMANN, J. C.; HENDERSON, L. E. Cellular proteins bound to immunodeficiency virus: implications for pathogenesis and vaccines. **Science, 258:** 1935-1938, 1992.

AYOUBA, A.; SOUQUIÈRES, S.; NJINKU, B.; MARTIN, P. M.; MULLER-TRUTWIN, M. C.; ROQUES, P. HIV-1 group N among HIV-1-seropositive individuals in Cameroon. **AIDS, 14:** 2623-2625, 2000.

BARBOUR, J. D.; GRANT, R. M. The role of viral fitness in HIV pathogenesis. **Current HIV/AIDS Reports, 2:** 29-34, 2005.

BARIN, F. M.; BOUP, S.; DENIS, F.; KANKI, P.; ALLA, J. S.; LEE, T. H. Serological evidence for virus related to simian T-lymphotropic retrovirus III in residents of West Africa. **Lancet, 2:** 1387-1389, 1985.

BARRE-SINOUSSI, F.; CHERMANN, J. C.; REY, F.; NUGEYRE, M. T.; CHAMARET, S.; GRUEST, J.; DAUGUET, C.; AXLER-BLIN, C.; VEZINET-BRUN, F.; ROUZIOUX, C.; ROZENBAUM, W.; MONTAGNIER, L. Isolation of a t-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). **Science, 220:** 868–871, 1983.

BASAVAPATHRUNI, A.; ANDERSON, K. S. Reverse transcription of the HIV-1 pandemic. **The FASEB Journal, 21:** 1-15, 2007.

BELLO, G.; PASSAES, C. P. B.; GUIMARÃES, M. L.; LORETE, R. S.; ALMEIDA, S. E. M.; MEDEIROS, R. M.; ALENCASTRO, P. R.; MORGADO, M. G. Origin and evolutionary history of HIV-1 subtype C in Brazil. **AIDS, 22:** 1993–2000, 2008.

BOUR, S.; GELEZIUNAS, R.; WAINBERG, M. A. The human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) CD4 receptor and its central role in the promotion of HIV-1 infection. **Microbiological Reviews, 59:** 63–93, 1995.

BOUR, S.; STREBEL, K. The HIV-1 Vpu protein: a multifunctional enhancer of viral particle release. **Microbes and Infection, 5:** 1029–1039, 2003.

BRÍGIDO, L.F.M.; FRANCO, H.M.; CUSTODIO, R.M.; OLIVEIRA, C.A.F.; PEREIRA, J.L.P.; EIRA, M.; BERGEL, F.; ARAÚJO, F.; CARVALHEIRO, J.R.; RODRIGUES,

R. Molecular characteristics of HIV type 1 circulating in São Paulo, Brazil. **AIDS Research and Human Retroviruses, 21**: 673-682, 2005.

BURGESS, T. Determinants of transmission of HIV from mother to child. **Clinical and Experimental Obstetrics and Gynecology, 44 (2):** 198-209, 2001.

BURNS, D. N.; NOURJAH, P.; MINKOFF, H.; KORELITZ, J.; BIGGAR, R. J.; LANDESMAN, S.; RUBINSTEIN, A.; WRIGHT, D.; NUGENT, R. P. Changes in CD4+ and CD8+ cell levels during pregnancy and post partum in women and seronegative for human immunodeficiency virus-1. **American Journal of Obstetrics Gynecology, 174:** 1461-1468, 1996.

BURNS, D. N.; LANDESMAN, S.; MINKOFF, H.; WRIGHT, D. J.; WATERS, D.; MITCHELL, R. M.; RUBINSTEIN, A.; WILLOUGHBY, A.; GOEDERT, J. J. The influence of pregnancy on human immunodeficiency virus type 1 infection: antepartum and postpartum changes in human immunodeficiency virus type 1 viral load. **American Journal Obstetrics Gynecology, 178:** 355-359, 1998.

CABRAL, V. P.; CUNHA, C. B.; MAGALHAES, E. F. L.; PINTO-NETO, L. F., COUTO-FERNANDEZ, J. C.; DIETZE, R.; MORGADO, M. G.; RIBEIRO-RODRIGUES, RODRIGO. Human immunodeficiency virus type-1 subtypes of infected patients in Espírito Santo, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 101(8):** 881-885, 2006.

CARR, J. K.; SALMINEN, M. O.; ALBERT, J.; SANDERS-BUELL, E.; GOTTE, D.; MCCUTCHAN, F. E. Full genome sequences of human immunodeficiency virus type 1 subtype G and A/G inter-subtype recombinants. **Virology, 247:** 22-31, 1998.

CARRETO, R.; KASHIMA, S.; COVAS, D.T. Molecular characterization the isolates of the HIV-1 in the region of Ribeirão Preto. **XVI National Meeting of Virology, 10**: p310, 2005.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. US Public Health Service Task Force. Recommendations for use of antiretroviral drugs in pregnant HIV-infected women for maternal health and Interventions to reduce perinatal HIV-1 transmission in the United States. **Morbidity and Mortality Weekly Report, 47:** 1-30, 2005.

CERQUEIRA, D. M.; AMORIM, R. M. S.; SILVA, R. R.; CAMARA, G. N. L.; BRÍGIDO, M. M.; MARTINS, C. R. F. Antiretroviral Resistance and Genetic Diversity of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Isolates from the Federal District,Central Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 99(8):** 877-882, 2004.

CHAKRABARTI, S.; PANDA, S.; CHATTERJEE, A.; SARKAR, S.; MANNA, B.; SINGH, N. B. HIV-1 subtypes in injecting drug users & their non-injecting wives in Manipur, India**. Indian Journal of Medical Research**, **111:** 189-94, 2000.

CLARKE, J. R.; BRAGANZA, R.; MIRZA, A.; STAINSBY, C.; AIT-KHALED, M.; WRIGHT, A.; LYALL, H.; PARKER, D.; MCCLURE, M. O.; WEBER, J. N.; TAYLOR, G. P. Rapid development of genotypic resistance to lamivudine when combined with zidovudine in pregnancy. **Journal of Medicine Virology, 59(3):** 364-368, 1999.

CLAVEL, F.; GUYADER, M.; GUETARD, D.; SALLE, M.; MONTANGNIER, L.; ALIZON, M. Molecular cloning and polymorphism of the human immune deficiency virus type 2. **Nature**, **324**: 691-695, 1986.

COHAN, D. Perinatal HIV: Special Considerations. **Topics in HIV Medicine, 11:** 200-212, 2003.

COFFIN, J.; HAASE, A.; LEVY, J. A.; MONTAGNIER, L.; OROSSLAN, S.; TEICH, N.; TEMIN, H. What to call the AIDS virus? **Nature, 321:** 10, 1986.

COLL, O.; FIORE, S.; FLORIDIA, M. Pregnancy and HIV infection. A European consensus on management. **AIDS, 16(Suppl 2):** S1- S18, 2002.

CONNOR, E. M.; SPERLING, R. S.; GELBER, R.; KISELEV, P.; SCOTT, G.; O'SULLIVAN, M. J.; VANDYKE, R.; BEY, M.; SHEARER, W.; JACOBSON, R. L.; JIMENEZ, E.; O'NEILL, E.; BAZIN, B.; DELFRAISSY, J. F.; CULNANE, M.; COOMBS, R.; ELKINS, M.; MOYE, J.; STRATTON, P.; BALSLEY, J. Reduction of maternal-infant transmission of human immunodeficiency virus type 1 with zidovudine treatment. Pediatric AIDS Clinical Trials Group Protocol 076 Study Group. **New England Journal of Medicine, 331:** 1173-1180, 1994.

COOLEY, L. A.; LEWIN, S. R. HIV-1 cell entry and advances in viral entry inhibitor therapy. **Journal of Clinical Virology, 26:** 121-132, 2003.

COOVADIA, H. Current issues in prevention of mother-to-child transmission of HIV-1. **Current Opinion in HIV and AIDS, 4:** 319–324, 2009.

COURGNAUD, V.; SALEMI, M.; POURRUT, X.; MPOUDI-NGOLE, E.; ABELA, B.; AUZEL, P.; BIBOLLET-RUCHE, F.; HAHN, B.; VANDAMME, A. M.; DELAPORTE, E.; PEETERS, M. Characterization of a novel simian immunodeficiency virus with a *vpu* gene from greater spot-nosed monkeys (*CERCOPITHECUS NICTITANS*) provides new insights into simian/human immunodeficiency virus phylogeny. **Journal of Virology, 76:** 8298–8309, 2002.

COUTO-FERNANDEZ, J. C.; SIVA-DE JESUS, C.; VELOSO, V. G.; RACHID, M.; GRACIE, R. S. G.; CHEQUER-FERNANSEZ, S. L.; OLIVEIRA, S. M.; ARAKAKI-SANCHEZ, D.; CHEQUER, P. N. J.; MORGADO, M. G. Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) genotyping in Rio de Janeiro, Brazil: assessing subtype and drug-resistance associated mutations in HIV infected individuals failing highly active antiretroviral therapy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 100**: 73-78, 2005.

CRISE, B.; BUONOCORE, L.; ROSE, J. K. CD4 is retained in the endoplasmic reticulum by the human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein precursor. **Journal of Virology, 64:** 5585–5593, 1990.

CUNNINGHAM, C. K.; CHAIX, M. L.; REKACEWICZ, C. Development of resistance mutations in women receiving standard antiretroviral therapy who received intrapartum nevirapine to prevent perinatal human immunodeficiency virus type 1 transmission: a substudy of pediatric AIDS clinical trials group protocol 316. **Journal of Infectious Diseases, 186:** 181–188, 2002.

DAVIDSON, F.; YIRRELL, D. L.; LYCETT, C.; PETRIK, J.; DOW, B. C. Human immunodeficiency virus 1 subtypes detected in Scottish blood donors. **Vox Sanguinis, 96:** 160–162, 2009.

DEL BIANCO, R.; KUSCHNAROFF, T. M.; SANTOS, N. J. S. Prevenção da transmissão vertical do HIV em cinco maternidades do município de São Paulo. **Jornal Brasileiro de AIDS, 6:** 189-236, 2005.

DEORA, A.; RATNER, L. Viral Protein U (Vpu)-Mediated Enhancement of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Particle Release Depends on the Rate of Cellular Proliferation. **Journal of Virology, 75:** 6714–6718, 2001.

DOURADO, I.; MILROY, C. A.; MELLO, M. A. G.; FERRARO, G. A.; FILHO, H. C. L.; GUIMARÃES, M. L.; MORGADO, M. G.; TEIXEIRA, M. G.; BARRETO, M. L.; GALVÃO-CASTRO, B. HIV-1 seroprevalence in the general population of Salvador, Bahia State, Northeast Brazil. **Cadernos de Saúde Pública, 23:** 25-32, 2007.

DRAGIC, T.; LITWIN, V.; ALLAWAY, G. P. HIV-1 entry into CD4þ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. **Nature, 381:** 667-673, 1996.

DURAN, A. S.; LOSSO, M. H.; SALOMÓN, H.; HARRIS, D. R.; PAMPURO, S.; SOTO-RAMIREZ, L. E.; DUARTE, G.; SOUZA, R. S.; READ, J. S. Drug resistance among HIV-infected pregnant women receiving antiretrovirals for prophylaxis. **AIDS, 21:** 199–205, 2007.

EASTMAN, P. S.; SHAPIRO, D. E.; COOMBS, R. W. Maternal viral genotypic zidovudine resistance and infrequent failure of zidovudine therapy to prevent perinatal transmission of human immunodeficiency virus type 1 in pediatric AIDS Clinical Trials Group Protocol 076. **Journal of Infectious Diseases, 177:** 557–564, 1998.

EYER-SILVA, W. A.; COUTO-FERNANDEZ, J. C.; MORGADO, M. G. Molecular Epidemiology of HIV Type 1 in Inner Rio de Janeiro State, Brazil. **AIDS Research and Human Retroviruses, 23(2):** 303–308, 2007.

FERNANDEZ, J. C. C.; OLIVEIRA, S. M.; JESUS, C. S.; VELOSO, V.; RACHID, M.; MORGADO, M. G. Epidemiology of HIV-1 subtypes and drug resistance in Rio de Janeiro, Brazil. **XVI National Meeting of Virology, 10**: p301, 2005.

FILHO, D. J. S.; SUCUPIRA, M. C. A.; CASIERO, M. M.; SABINO, E. C.; DIAZ, R. S.; JANINI, L. M. Identification of two HIV type 1 circulation recombinant forms in Brazil. **AIDS Research and Human Retroviruses, 22**: 1-3, 2006.

FOWLER, M. G.; LAMPE, M. A.; JAMIESON, D. J.; KOURTIS, A. P.; ROGERS, M. F. Reducing the risk of mother-to-child human immunodeficiency virus transmission: past successes, current progress and challenges, and future directions. **American Journal of Obstetrics & Gynecology (supplement**): S1-S7, 2007.

FRANKEL, A. D.; YOUNG, J. A. T. HIV-1: Fifteen Proteins and an RNA. **Annual Review of Biochemistry, 67:** 1–25, 1998.

FREED, E. O; MARTIN, M. A. The role of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoproteins in virus infection. **Journal of Biological Chemistry, 270:** 23883-23886, 1995.

FREED, E. O. HIV-1 Gag proteins: diverse functions in the virus life cycle. **Virology, 251:** 1–15, 1998.

FREED, E. O. HIV-1 replication. **Somatic Cell and Molecular Genetics, 26:** 13-33, 2002.

GADDIS, N. C.; CHERTOVA, E.; SHEEHY, A. M.; HENDERSON, L. E.; MALIM, M. H. Comprehensive investigation of the molecular defect in *vif*-deficient human immunodeficiency virus type 1 virions. **Journal of Virology, 77:** 5810-5820, 2003.

GADELHA, S. R.; SHINDO, N.; CRUZ, J. N. M. Molecular epidemiology of Human Immunodeficiency Virus-1 in the state of Ceará, Northeast, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 98:** 461-464, 2003.

GALLO, R. C.; SARIN, P. S.; GELMANN, E. P.; ROBERT-GUROFF, M.; RICHARDSON, E.; KALYANARAMAN, V. S.; MANN, D.; SIDHU, G. D.; STAHL, R. E.; ZOLLA-PAZNER, S.; LEIBOWITCH, J.; POPOVIC, M. Isolation of human t-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). **Science, 220:** 865–867, 1983.

GAO, F.; BAILES, E.; ROBERTSON, D. L.; CHEN, Y.; RODENBURG, C. M.; MICHAEL, S. F.; CUMMINS, L. B.; ARTHUR, L. O.; PEETERS, M; SHAW G. M.; SHARP, P. M.; HAHN; B. H. Origin of HIV-1 in the chimpanzee pan troglodytes troglodytes. **Nature, 397:** 436–441, 1999.

GERETTI, A. M. HIV-1 subtypes: epidemiology and significance for HIV management. **Current Opinion in Infectious Diseases, 19:** 1–7, 2006.

GERGERFELT, A. S. V.; LISKA, V.; LI, P. L.; McCLURE, H. M.; HORIE, K.; NAPPI, F.; MONTEFIORI, D. C.; PAVLAKIS, G. N.; MARTHAS, M. L.; RUPRECHT, R. M.; FELBER, B. K. Rev-independent simian immunodeficiency vírus strain are nonpathogenic in neonatal macaques. **Journal of Virology, 76:** 96-104, 2002.

GONZÁLEZ-LAHOZ, J.; SORIANO, V. Prevalence of darunavir resistance mutations in HIV-1-infected patients failing other protease inhibitors. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 60:** 885–888, 2007.

GOODNOUGH, L. T. Risks of Blood Transfusion. **Anesthesiology Clinics of North America, 23:** 241-252, 2005.

GÖTTE, M.; LI, X.; WAINBERG, M. A. HIV-1 Reverse Transcription: A brief overview focused on structure-function relationships among molecules involved in initiation of the reaction. **Archives of Biochemistry and Biophysics, 365:** 199-210, 1999.

GOTTLIEB, M. S.; SCHROFF, R.; SCHANKER, H. M.; WEISMAN, J. D.; FAN, P. T.; WOLF, R. A Pneumocystis pneumonia — los angeles centers for disease control. **MMWR Morbidity and Mortality Weekly Report, 30:** 250–252, 1981.

GREENE, W. C. Regulation of HIV-1 gene expression. **Annual Review Immunology, 8:** 453-75, 1990.

GREENWAY, A. L.; HOLLOWAY, G.; MCPHEE, D. A.; ELLIS, P.; CORNALL, A.; LIDMAN, M. HIV-1 Nef control of cell signalling molecules: multiple strategies to promote virus replication. **Journal of Biological Sciences, 28:** 323-335, 2003.

GUAY, L. A.; MUSOKE, P.; FLEMING, T.; BAGENDA, D.; ALLEN, M.; NAKABIITO, C. Intrapartum and neonatal single-dose NVP compared with zidovudine for prevention of mother-to-infant transmission of HIV-1 in Kampala, Uganda: HIVNET-012 randomised trial. **Lancet, 354:** 795–802, 1999.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series 41:** 95-98, 1999.

HAMMER S. M. Nucleoside Analogue Reverse Transcriptase Inhibitor Options: A Re-examination of the Class. **Topics in HIV Medicine, 14(4):** 140-143, 2006.

HERRING, B. L.; GE, Y. C.; WANG, B.; RATNAMOHAN, M.; ZHENG, F.; CUNNINGHAM, F. Segregation of human immunodeficiency virus type 1 subtypes by risk factor in Australia. **Journal Clinical Microbiology, 41:** 4600-4604, 2003.

HOPE, T. J.; TRONO, D. Structure, expression and regulation of the HIV genome. **Science, 550:** 1123-1127, 2000.

HOXIE, J. A.; ALPERS, J. D.; RACKOWSKI, J. L.; HUEBNER, K.; HAGGARTY, B. S.; CEDARBAUM, A. J.; REED, J. C. Alterations in T4 (CD4) protein and mRNA synthesis in cells infected with HIV. **Science, 234:** 1123-1127, 1986.

HU, W. S., TEMIN, H. M. Retroviral recombination and reverse transcription. **Science, 250:** 1227-1233, 1990.

HUET, T.; CHEYNIER, R.; MEYERHANS, A.; ROELANTS, G.; HOBSON, S. W. Genetic organization of a chimpanzee lentivirus related to HIV-1. **Nature, 345:** 356–359, 1990.

INUBUSHI, R.; ADACHI, A. Cell-dependent function of HIV-1 Vif for virus replication. **International Journal of Molecular Medicine, 3:** 473-476, 1999.

JABBAR, M. A.; NAYAK, D. P. Intracellular interaction of human immunodeficiency virus type 1 (ARV-2) envelope glycoprotein gp160 with CD4 blocks the movement and maturation of CD4 to the plasma membrane. **Journal of Virology, 64:** 6297–6304, 1990.

JANEWAY, C. A.; TRAVERS P.; WALPORT M.; SHLOMCHIK, M. O sistema imune na saúde e na doença. In: **Imunobiologia**. 5° ed. Artmed, 2002.

JERE, A.; TRIPATHY, S.; AGNIHOTRI, K.; JADHAV, S.; PARANJAPE, R. Genetic analysis of indian HIV-1 *NEF*: subtyping, variability and implications. **Microbes and Infection, 6:** 279–289, 2004.

JOHNSON, V. A.; BRUN-VÉZINET, F.; CLOTET, B.; CONWAY, B.; KURITZKES, D. R.; PILLAY, D.; SCHAPIRO, J. M.; TELENTI, A.; RICHMAN, D. D. Update of the drug resistance mutations in HIV-1: fall 2005. **Topics in HIV Medicine, 13(4):** 125-131, 2005.

JOHNSON, V. A.; BRUN-VÉZINET, F.; CLOTET, B.; CONWAY, B.; KURITZKES, D. R.; PILLAY, D.; SCHAPIRO, J. M.; TELENTI, A.; RICHMAN, D. D. Update of the drug resistance mutations in HIV-1: fall 2005. **Topics in HIV Medicine, 16(5):** 138-145, 2008

JOHN-STEWART, G.; MBORI-NGACHA, D.; EKPINI. R. JANOFF, E. N.; NKENGASONG, J.; READ, J. S.; VAN DE PERRE, P.; NEWELL, M. L. Breast-feeding and transmission of HIV-1. **Journal Acquired Immune Deficiency Syndrome, 35:** 196- 202, 2004.

JOHNSON, V. A.; BRUN-VÉZINET, F.; CLOTET, B.; GÜNTHARD, H. F.; KURITZKES, D. R.; PILLAY, D.; SCHAPIRO, J. M.; RICHMAN, D. D. Update of the drug resistance mutations in HIV-1: December 2008. **Topics in HIV Medicine, 16(5):** 138-145, 2008.

JONASSEN, T. O.; STENE-JOHANSEN, K.; BERG, E. S.; HUNGNES, O.; FROLAND, S. S.; GRINDE, B. Sequence analysis of HIV-1 group O from norvegian patients infected in the 1960s. **Virology, 231(1):** 43-47, 1997.

KEMPF, D. J.; ISAACSON, J. D.; KING, M. S.; BRUN, S. C.; XU, Y.; REAL, K.; BERNSTEIN, B. M.; JAPOUR, A. J.; SUN, E.; RODE, R. A. Identification of Genotypic Changes in Human Immunodeficiency Virus Protease That Correlate with Reduced Susceptibility to the Protease Inhibitor Lopinavir among Viral Isolates from Protease Inhibitor-Experienced Patients. **Journal of Virology, 75(16):** 2001.

KITSUTANI, P. T.; NAGANAWA, S.; SHIINO, T.; MATSUDA, M.; HONDA, M.; YAMADA, K. HIV type 1 subtypes of nonhemophiliac patients in Japan. **AIDS Research and Human Retroviruses, 14:** 1099-103, 1998.

LAKE, J. A.; CARR, J.; FENG, F.; MUNDY, L.; BURRELL, C.; LI, P. The role of VIF during HIV-1 infection: interaction with novel host cellular factors. **Journal of Clinical Virology, 26:** 143-152, 2003.

LARDER, B.; RICHMAN, D.; VELLA, S. HIV resistance and implications for therapy, (2 ed.) **MEDICOM INC.**, ATLANTA, 2001.

LAUKKANEN, T.; LIITSOLA, K.; SALMINEN, M.; LEINIKKI, P. HIV-1 D subtype viruses in Finland. **Clinical and Diagnostic Virology, 5:** 205-210, 1996.

LEE, J. C.; BELL, D. C.; GUINNESS, R. M.; AHMAD, T. Pneumocystis jiroveci pneumonia and pneumomediastinum in an anti-TNFα naive patient with ulcerative colitis. **World Journal of Gastroenterology, 15(15):** 1897-1900, 2009.

LEVER, A. M. L. HIV: the virus. **Medicine, 33:** 1-3, 2005.

LEVY, J. A.; HOFFMAN, A. D.; KRAMER, S. M.; LANDIS, J. A.; SHIMABUKURO, J. M.; OSHIRO, L. S. Isolation of lymphocytopathic retroviruses from San Francisco patients with aids. **Science, 225:** 840–842, 1984.

LIANG, C.; WAINBERG, M. A. The role of tat in HIV-1 replication: an activator and/or a suppressor? **AIDS Review, 4:** 41-49, 2002.

LIITSOLA, K.; TASHKINOVA, I.; LAUKKANEN, T.; KOROVINA, G.; SMOLSKAJA, T.; MOMOT, O.; MASHKILLEYSON, N.; CHAPLINSKAS, S.; BRUMMER-KORVENKONTIO, H.; VANHATALO, J.; LEINIKKI, P.; SALMINEN, M. O. HIV-1 genetic subtype A/B recombinant strain causing an explosive epidemic in injecting drug users in Kaliningrad. **AIDS, 12:** 1907-1919, 1998.

LOCATELI, D.; STOCO, P. H.; QUEIROZ, A. T. L.; ALCÂNTARA, L. C. J.; FERREIRA, L. G.; ZANETTI, C. R.; RODRIGUES, R.; GRISARD, E. C.; PINTO, A. R. Molecular Epidemiology of HIV-1 in Santa Catarina State Confirms Increases of Subtype C in Southern Brazil. **Journal of Medical Virology 79:** 1455–1463, 2007.

LOLE, K. S.; BOLLINGER, R. C.; PARANJAPE, R. S. Full-length human immunodeficiency virus type 1 genomes from subtype Cinfected seroconverters in India, with evidence of intersubtype recombination. **Journal of Virology, 73:** 152–160, 1999.

LOUWAGIE, J.; DELWART, E. L.; MULLINS, J. I.; MCCUTCHAN, F. E.; EDDY, G.; BURKE, D. S. Genetic analysis of HIV-1 isolates from Brazil reveals the presence of two distinct genotypes. **AIDS Research and Human Retroviruses, 10:** 561-567, 1994.

MACHADO, L. F. A.; MOREIRA, M. R. C.; SOUSA, M. I.; FERNANDES, L. M.; SILVA, R. F. P.; AZEVEDO, V. N.; LOBATO, L.; VALLINOTO, A. C. R.; ISHAK, M. O. G.; ISHAK, R. Epidemiologia molecular da infecção pelo vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1) nas cidades de Belém (Pará) e Macapá (Amapá), Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 36**: suplemento I, 450, 2004.

MACHADO, D. M.; FERNANDES, S. C.; SUCCI, R. C. M.; FREIRE, W. S.; PANNUTI, C. S.; GOUVEIA, A. B.; LEVI, J. E.; DIAZ, R. S. Analysis of HIV- type 1 protease and reverse transcriptase in Brazilian children failing highly active antiretroviral therapy (HAART). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, 47(1):** 1-5, 2005.

MANAVI, K. A review on infection with human immunodeficiency virus. **Best practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology, 20:** 923-940, 2006.

MARCELIN, A. G.; CECCHERINI-SILBERSTEIN, F.; PERNO, C. F.; CALVEZ, V. Resistance to novel drug classes. **Current Opinion in HIV and AIDS**, **4(6):** 531-537, 2009.

MARKOWITZ, M.; LOUIE, M.; HURLEY, A.; SUN, E.; MASCIO, M. D.; PERELSON, A. S. A novel antiviral intervention results in more accurate assessment of human immunodeficiency virus type 1 replication dynamics and T-cell decay in vivo. **Journal of Virology, 77:** 5037-5038, 2003.

MARTINEZ-PICADO, J.; MARTÍNEZ, M. A. HIV-1 reverse transcriptase inhibitor resistance mutations and fitness: A view from the clinic and *ex vivo.* **Virus Research,** 1-20, 2008.

MARX, P. A.; APETREI, C.; DRUCKER, E. AIDS as a zoonosis? Confusion over the origin of the virus and the origin of the epidemics. **Journal of Medical Primatology, 33:** 220–226, 2004.

McCUTCHAN, F. E. Understanding the genetic diversity of HIV-1. **AIDS, 14:** 31–44, 2000.

MEDEIROS, L. B.; LACERDA, H. R.; CAVALCANTI, A. M. S.; ALBURQUERQUE, M. F. P. M. Primary resistance of human immunodeficiency virus type 1 in a reference center in Recife, Pernambuco, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 101**: 845-849, 2006.

MEDEIROS, M. S.; ARRUDA, E. A. G.; GUERRANT, R. L.; BROWN, C.; HAMMARSKJOLD, M. L.; REKOSH, D.; LIMA A. Â. M. Genotype Testing and Antiretroviral Resistance Profiles from HIV-1 Patients Experiencing Therapeutic Failure in Northeast Brazil. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases, 11(4):** 390-394, 2007.

M.S. **Boletim Epidemiológico:** Dezembro 2007, Ministério da Saúde, Brasil. Disponível em http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/aids_2006.pdf/. Acesso em: 12 de janeiro de 2008.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Recomendações para profilaxia da transmissão vertical do HIV e terapia anti-retroviralem gestantes / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde**. –** Brasília : **Ministério da Saúde,** 1-176, 2007.

MOLINA, R. M.; TORINA, A. G.; BIFFI, K.; BISMARA, B. A. P.; ALBUQUERQUE, D. M.; ANDRADE, P. D.; ANJOS, E. B. V.; TORO, A. D. C.; NOLASCO, M. T.; VILELA, M. M. S.; COSTA, S. C. B. Prevalence of HIV-1 Subtypes in Brazilian Children With Perinatally Acquired Infection. **Journal of The International Association of Physicians in AIDS Care, 8(2):** 106-112, 2009.

MONTEIRO, J. P.; FERRARO, G. A.; OLIVEIRA, T.; GOLDANI, L. Z.; KASHIMA, S; ALCANTARA, L. C. J.; MORGADO, M. G.; BOU-HABIB, D. C.; CASTRO, B. G. Genetic and Biologic Characterization of HIV Type 1 Subtype C Isolates from South Brazil. **AIDS Research and Human Retroviruses, 23(1):** 135–143, 2007.

MONTEIRO, J. P.; ALCANTARA L. C. J.; OLIVEIRA, T.; OLIVEIRA, A. M.; MELO, M. A. G.; BRITES, C.; GALVÃO-CASTRO, B. Genetic Variability of Human Immunodeficiency Virus-1 in Bahia State, Northeast, Brazil: High Diversity of HIV Genotypes. **Journal of Medical Virology, 81:** 391–399, 2009.

MORGADO, M. G.; GUIMARÃES, M. L.; GALVÃO-CASTRO, B. HIV-1 Polymorphism: a challenge for vaccine development - A review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 97:** 143-150, 2002.

MOTOMURA, K.; KUSAGAWA, S.; KATO, K. Emergence of new forms of human immunodeficiency virus type 1 intersubtype recombinants in central Myanmar. **AIDS Research and Human Retroviruses, 16:** 1831–1843, 2000.

MOURA, E. L.; PRAÇA, N. S. Transmissão vertical: expectativas e ações da gestante soropositiva. **Revista Latino – Americana de Enfermagem, 14(3):** 405-413, 2006.

MWANYUMBA, F.; GAILLARD, P.; INION, I.; VERHOFSTEDE, C.; CLAEYS, P.; CHOHAN, V. Placental inflammation and perinatal transmission of HIV-1. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes, 29:** 262-269, 2002.

NAZARI, R.; JOSHI, S. CCR5 as target for HIV-1 gene therapy. **Current Gene Therapy, 8(4)**: 264-72, 2008

NEWELL, M. L. Mechanisms and timing of mother-to-child transmission of HIV-1. **AIDS, 12:** 831-837, 1998.

NEWELL, M. L.; RUDIN, C.; DUNN, D.; PECKHAM, C. Immunological markers in HIV-infected pregnant women. **AIDS, 11:** 1859-1865, 1997.

OHNO, M.; FORNEROD, M.; MATTAJ, I. W. Nucleocytoplasmic transport: the last 200 nanometers. **Cell, 92:** 327-336, 1998.

OKIE, S. Fighting HIV—lessons from Brazil. **New England Journal of Medicine, 354:** 1977–1981, 2006.

OU, C. Y.; TAKEBE, Y.; LUO, C. C. Wide distribution of two subtypes of HIV-1 in Thailand. **AIDS Research and Human Retroviruses, 8:** 1471–1472, 1992.

OVERBAUGH, J.; BANGHAM, C. R. M. Selection forces and constrains on retroviral sequence variation. **Science, 292:** 1106-1109, 2001.

PALUMBO, P.; HOLLAND, B.; DOBBS, T. Antiretroviral resistance mutations among pregnant human immunodeficiency virus type 1-infected women and their newborns in the United States: vertical transmission and clades. **Journal of Infectious Diseases, 184:** 1120–1126, 2001.

PAPATHANASOPOULOS, M. A.; HUNT, G. M.; TIEMESSEN, C. T. Evolution and diversity of HIV-1in África- a review. **Virus Genes, 26:** 151-163, 2003.

PEETERS, M.; SHARP, P. M. Genetic diversity of HIV-1: the moving target. **AIDS, 3:** 129-240, 2000.

PETROPOULOU, H.; STRATIGOS, A. J.; KATSAMBAS, A. D. Human immunodeficiency virus infection and pregnancy. **Clinics in Dermatology, 24:** 536–542, 2006.

PINTO, M. E.; STRUCHINER, C. J. A diversidade do HIV-1: uma ferramenta para o estudo da pandemia. **Cadernos de Saúde Pública, 22:** 473-484, 2006.

POON, B.; FERBAS, K. G.; STEWART, S. A.; CHEN, I. S. Y. Cell cycle arrest by Vpr in HIV-1 virions and insensitivity to antiretroviral agents. **Science, 281:** 266-269, 1998.

REINKE, R.; STEFFEN, N. R.; JR, E. R. Natural selection results in conservation of HIV-1 integrase activity despite sequence variability. **AIDS, 15:** 823-830, 2001.

REQUEJO, H. I. Z. Worldwide molecular epidemiology of HIV. **Revista de Saúde Pública, 40:** 331-345, 2006.

ROBERTSON, D. L.; ANDERSON, J. P.; BRADAC, J. A. HIV-1 Nomenclature Proposal. **Science, 288:** 55–57, 2000.

ROGERS, M.; SHAFFER, N. Reducing the risk of maternal-infant transmission of HIV by attacking the vírus. **New England Journal of Medicine, 341:** 441-443, 1999.

ROSS, E. K.; BUCKLER-WHITE, A. J.; RABSON, A. B. Contribution of NF-kB and Sp1 binding motifs to the replicative capacity of human immunodeficiency virus type 1: Distinct patterns of viral growth are determined by T-cell types. **Journal of Virology, 65:** 4350-4358, 1991.

SAADA, M.; LE CHENADEC, J.; BERREBI, A.; BONGAIN, A.; DELFRAISSY, J. F., MAYAUX, M. J.; MEYER, L. Pregnancy and progression to AIDS: results of the French prospective cohorts. SEROGEST and SEROCO Study Groups. **AIDS, 14:** 2355- 2360, 2000.

SABINO, E. C. Tipranavir e *cut-off* clÍnico no teste de fenotipagem. **Tendências em HIV/AIDS, 1(2):** 4-6, 2006.

SAITOU, N., NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenic trees. **Molecular Biology and Evolution, 4:** 406-425, 1987.

SANGER, F.; NICHLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequences with chain termination inhibitors. **Proceedings of The National Academy of Science of the USA, 74**: 5463 – 5468, 1977.

SE-THOE, S. Y.; FOLEY, B. T.; CHAN, S. Y.; LIN, R. V.; OH, H. M.; LING, A. E. Analysis of sequence diversity in the C2V3 regions of the external glycoproteins of HIV type 1 in Singapore. **AIDS Research and Human Retroviruses, 14:** 1601-1604, 1998.

SHAFER, R. W. The challenge of antiretroviral drug resistance in HIV-1-infected children. **Jornal de Pediatria, 85(2):** 91-94, 2009.

SHERMAN, M. P.; GREENE, W. C. Slipping through the door: HIV entry into the nucleus. **Microbes and Infection, 4:** 67-73, 2002.

SIMON, F.; MAUCLÈRE, P.; ROQUES, P.; LOUSSERT-AJAKA, I.; MÜLLER-TRUTWIN, M. C.; SARAGOSTI, S. Identification of a new human immunodeficiency virus type 1 distinct from group M and group O. **Nature Medicine, 4:** 1032-1037, 1998.

SLEASMAN, J. W., GOODENOW, M. M. HIV-1 infection. **Journal of Allergy and Clinical Immunology, 111:** 582-592, 2003.

SOARES, M. A.; OLIVEIRA, T.; BRINDEIRO, R. M.; DIAZ, R. S.; SABINO, E. C.; BRIGIDO, L.; PIRES, I. L.; MORGADO, M. G.; DANTAS, M. C.; BARREIRA, D.; TEIXEIRA, P. R.; SHARON, C.; TANURIA, A. A specific subtype C of human immunodeficiency vírus type 1 circulates in Brazil. **AIDS, 17:** 11-21, 2003.

SOTO-RAMIREZ, L. E.; DIAZ, R. R.; DURÁN, A. S.; LOSSO, M. H.; SALOMÓN, H.; CARRILLO, M. G.; PAMPURO, S.; HARRIS, D. R.; DUARTE, G.; SOUZA, R. S.; READ, J. S. Antiretroviral Resistance among HIV Type 1-Infected Women First Exposed to Antiretrovirals during Pregnancy: Plasma versus PBMCs. **AIDS Research and Human Retroviruses, 24 (6):** 797-804, 2008.

SOUZA, A. C. M. F.; OLIVEIRA, C. M.; RODRIGUES, C. L. L.; SILVA, S. A. A.; LEVI, J. E. Molecular Characterization of HIV Type 1 BF Pol Recombinants from São Paulo, Brazil. **AIDS Research and Human Retroviruses, 24(12):** 1521-1525, 2008.

STEFANI, M. M. A.; PEREIRA, G. A. S.; LINS, J. A. B.; ALCANTARA, K. C.; SILVEIRA, A. A.; VIEGAS, A. A.; MAYA, N. C.; MUSSI, A. H. Molecular screening shows extensive HIV-1 genetic diversity in Central West Brazil. **Journal of Clinical Virology, 39:** 205–209, 2007.

STRATTON, P.; TUOMALA, R. E.; ABBOUD, R.; RODRIGUEZ, E.; RICH, K.; PITT, J.; DIAZ, C.; HAMMILL, H.; MINKOFF, H. Obstetric and newborn outcomes in a cohort of HIV-infected pregnant women: a report of the women and infants transmission study. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes Human Retrovirology, 20:** 179-186, 1999.

TAKEBE, Y.; KUSAGAWA, S.; MOTOMURA, K. Molecular epidemiology of HIV: Tracking AIDS pandemic. **Pediatrics International, 46:** 236-244, 2004.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution, 24:** 1596-1599, 2007.

TANURI, A.; VICENTE, A. C. P.; OTSUKI, K.; RAMOS, C. A.; FERREIRA O. C.; SCHECHTER, M.; JANINI, L. M.; PIENIAZEK, D.; RAYFIELD, M. A. Genetic variation and susceptibilities to protease inhibitors among subtype b and f isolates in brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 43:** 253-258, 1999.

TATT, I. D.; BARLOW, K. L.; NICOLL, A.; CLEWLEY, J. P. The public health significance of HIV-1 subtypes. **AIDS, 15 (Suppl 5):** S59-S 1, 2001.

TELESNITSKY, A.; GOFF, S. P. Reverse transcriptase and the generation of retroviral DNA. **Retroviruses.** Coffin, J. M., Hughes, S. H. & Varmus, H. E. (eds). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1997. p.121-160.

THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D. G. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research, 25(24):** 4876-4882, 1997.

THOMSON, M. M.; ÁLVAREZ, L. P.; NÁJERA, R. Molecular epidemiology of HIV-1 genetic forms and its significance for vaccine development and therapy. **The Lancet Infectious Diseases, 2:** 461 – 471, 2002.

TURNER, B. G.; SUMMERS, M. F. Structural biology of HIV. **Journal of Molecular Biology, 285:** 1-32, 1999.

UNAIDS/WHO. **AIDS epidemic update:** December 2006, World Health Organization. Disponível em <http://www.unaids.org/en/HIV_data/epi2006/>. Acesso em: 5 de março de 2008.

UNAIDS/WHO. **AIDS epidemic update:** December 2009, World Health Organization. Disponível em <http://www.unaids.org/en/HIV_data/epi2006/>. Acesso em: 5 de março de 2010.

URNOVITZ, H. B.; MURPHY, W. H. Human Endogenous Retroviruses: Nature, Occurrence, and Clinical Implications in Human Disease. **Clinical Microbiology Reviews, 9**: 72 – 99, 1996.

VERAS, V. S. **Caracterização da variabilidade antigênica do gene do envelope (*env*) em amostras de HIV-1 circulantes no Distrito Federal**. Dissertação (Mestrado em Biologia molecular) – Distrito Federal, Universidade de Brasília, 2006. 32-33p.

VICENTE, A. C. P.; OTSUKI, K.; SILVA, N. B.; CASTILHO, M. C. The HIV epidemic in the Amazon basin is driven by prototypic and recombinant HIV-1 subtypes B e F. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes, 23:** 327-331, 2000.

VIDAL, N.; PEETERS, M.; MULANGA-KABEYA, C. Unprecedented degree of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) group M genetic diversity in the Democratic

Republic of Congo suggests that the HIV-1 pandemic originated in Central Africa. **Journal of Virology, 74:** 10498–10507, 2000.

VIDAL, N.; KOYALTA, D.; RICHARD, V.; LECHICHE C.; NDINAROMTAN, T.; DJIMASNGAR, A.; DELAPORTE, E.; PEETERS, M. High Genetic Diversity of HIV-1 Strains in Chad, West Central Africa. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes, 33:** 239–246, 2003.

VODICKA, M. A.; KOEPP, D. M.; SILVER, P. A.; EMERMAN, M. HIV-1 Vpr interacts with the nuclear transport pathway to promote macrophage infection. **Genes and Development, 12:** 175-185, 1998.

WEISSER, M.; RUDIN, C.; BATTEGAY, M.; PFLUGER, D.; KULLY, C.; EGGER, M. Does pregnancy influence the course of HIV infection? Evidence from two large Swiss cohort studies. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes Human Retrovirology, 17:** 404-410, 1998.

WELLES, S. L.; PITT, J.; COLGROVE, R. HIV-1 genotypic zidovudine drug resistance and the risk of maternal-infant transmission in the Women and Infants Transmission Study. The Women and Infants Transmission Study Group. **AIDS, 14:** 263–271, 2000.

WELLES, S. L.; BAUER, G. R.; LARUSSA, P. S.; COLGROVE, R. C.; PITT, J. Time Trends for HIV-1 Antiretroviral Resistance Among Antiretroviral-Experienced and Naive PregnantWomenin New York City During 1991 to Early 2001. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes, 44 (3):** 329-335, 2007.

WILLEY, R. L.; MALDARELLI, F.; MARTIN, M. A.; STREBEL, K. Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein regulates the formation of intracellular gp160-CD4 complexes. **Journal of Virology, 66:** 226–234, 1992.

WU, X.; LIU, H. XIAO, H.; CONWAY, J. A.; HEHL, E.; KALPANA, G. V.; PRASAD, V.; KAPPES, J. C. Human Immunodeficiency Virus Type 1 Integrase Protein Promotes Reverse Transcription through Specific Interactions with the Nucleoprotein Reverse Transcription Complex. **Journal of Virology, 73:** 2126-2135, 1999.

YUNTAO, W. U.; MARSH, J. W. Gene transcription in HIV infection. **Microbes and Infection, 5:** 1023-1027, 2003.

ZDANOWICZ, M. M. The Pharmacology of HIV Drug Resistance. **American Journal of Pharmaceutical Education**, **70 (5):** 1-9, 2006.

ZHANG, H.; POMERANTZ, R. J.; DORNADULA, G.; SUN, Y. Human immunodeficiency virus type 1 Vif protein is an integral component of an mRNP complex of viral RNA and could be involved in the viral RNA folding and packaging process. **Journal of Virology, 74:** 8252-8261, 2000.

SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
LABORATÓRIO DE VIROLOGIA

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Estou sendo convidado(a) a participar de uma pesquisa sobre Perfil de susceptibilidade/resistência das cepas de HIV-1 identificadas em mulheres que fizeram ou fazem a terapia anti-retroviral como medida profilática para a transmissão vertical do HIV-1 nos Estados do Pará, do Amapá e do Acre, que está sendo desenvolvida no Laboratório de Virologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará.

1. Para que eu decida em participar ou não da pesquisa me foram prestadas as seguintes informações:

- O título do projeto é*:* Perfil de susceptibilidade/resistência das cepas de HIV-1 identificadas em mulheres que fizeram ou fazem a terapia anti-retroviral como medida profilática para a transmissão vertical do HIV-1 nos Estados do Pará, do Amapá e do Acre.
- O pesquisador responsável é o Prof. Dr. Luiz Fernando Almeida Machado, Biomédico, Professor Adjunto da Universidade Federal do Pará.
- O objetivo da pesquisa é descrever a ocorrência de subtipos do HIV-1 e o conhecimento do perfil de resistência/susceptibilidade das cepas virais circulantes na Região Norte do Brasil.
- Essa pesquisa não oferece riscos, porque as práticas são de uso rotineiro. Uma pequena quantidade de sangue (5mL) será coletada e, posteriormente, estocada a -20ºC no Laboratório de Virologia da UFPA para pesquisas futuras.
- Toda nova pesquisa a ser feita com o material estocado será submetida para aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Instituição.
- Serão utilizados materiais esterilizados descartáveis, como agulhas e seringas, não oferecendo risco para a pessoa.
- Ninguém é obrigado a participar da pesquisa, assim como qualquer pessoa poderá deixar a pesquisa no momento que quiser, pois não haverá prejuízo pessoal por esta causa.
- Não haverá nenhum tipo de despesas para participação da pesquisa, assim como não haverá nenhuma forma de pagamento para participação.
- O grande benefício desta pesquisa para todos os que participam, é possibilitar um melhor entendimento sobre a epidemiologia molecular do HIV-1 e a prevalência de cepas do HIV-1 resistentes aos anti-retrovirais usados atualmente.
- A participação na pesquisa é sigilosa, isto significa que, somente os pesquisadores ficarão sabendo de sua participação. Os dados utilizados na pesquisa terão uso exclusivo neste trabalho, sem a identificação individual do participante.

_____

Assinatura do Pesquisador Responsável

CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Declaro que li as informações acima sobre a pesquisa, que me sinto perfeitamente esclarecido(a) acerca do conteúdo da mesma, assim como seus riscos e benefícios. Declaro ainda que, por minha livre vontade, aceito participar da pesquisa cooperando com a coleta de material para exame, permitindo que o mesmo seja armazenado para pesquisas futuras.

Belém, ____ / _____ / _____ _____

Assinatura da participante

SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
LABORATÓRIO DE VIROLOGIA

QUESTIONÁRIO EPIDEMIOLÓGICO

1. Prontuário n°: Protocolo n°: Data da coleta de dados:
2. Iniciais do Paciente:
3. Data da coleta de amostra - 1ª coleta: 2ª coleta: 3ª coleta:

Dados epidemiológicos

4. Data de nascimento: ___ / ____/ ____ Idade anos
5. Estado Civil: 1. Casada 2. Solteira 3. Separada 4. Viúva
6. Filhos? a) Sim b) Não Quantos?_____
7. Amamentou? a) Sim b) Não
8. Fez pré-natal de quantos?
9. Abortos? a) Sim b) Não Quantos?_____
10. Tempo de gestação? _____ semanas Profissão: _____
11. Endereço com bairro e telefone:
12. Município: 11. Naturalidade:
13. Município de residência anterior (se reside há menos de 05 anos no endereço atual):
14. Data da última sorologia negativa: ____/____/____ Data da primeira sorologia positiva:___/____/___
15. Idade da 1ª relação sexual:
16. Escolaridade
    1. Não alfabetizado
    2. Alfabetizado
    3. 1° grau incompleto
    4. 1° grau completo
    5. 2° grau incompleto
    6. 2° grau completo
    7. 3º grau incompleto
    8. 3º grau completo
17. Renda familiar (salários): a) < 1 b) 1-3 c) 4-6 d) 7-10 e) > 10
18. Categoria de exposição:
    1. Homossexual
    2. Bissexual
    3. Heterossexual
    4. Usuários de drogas EV Local:
    5. Usuário de droga não-EV
    6. Hemofílico
    7. Transfusão de sangue (após 1980)
    8. Outros, quais _____
19. Uso de drogas não endovenosas? 1. Álcool 2. Cigarro 3. Maconha 4. Outra: _____
20. Uso de droga endovenosa alguma vez
    1. Sim, mas não quer comentar 2. Sim 3. Não 4. Não quer comentar

21. Há quanto tempo faz uso de drogas endovenosas _____ Anos
22. Parou? ☐ Sim ☐ Não _____ Ano do último uso:

20. Como você costumava fazer uso de seringa e agulha (antes do diagnóstico de HIV)
    1. sempre sozinho 2. dividia com uma pessoa fixa 3. dividia com mais de uma pessoa

21. Você já fez uso de drogas injetáveis com seringas ou agulhas compartilhadas com:

    A) pessoas que são de, ou, normalmente viajam para outros estados?
    1. Sim 2. Não 3. Não sabe Se sim, quais estados:_____
    pessoas que são de, ou, normalmente viajam para outros países?
    1. Sim 2. Não 3. Não sabe Se sim, de onde: _____

22. Comportamento sexual
    1. com parceiro(a) heterossexual
    2. com parceiro bissexual
    3. com parceiro(a) homossexual
    4. com parceiro(a) usuário de drogas não-injetáveis
    5. com parceiro(a) usuário de drogas EV
    6. com múltiplos(a) parceiros(a)
    7. com parceiro(a) transfundido
    8. com parceiro hemofílico
    9. com parceiro(a) com múltiplos parceiros (promíscuo)
    10. com parceiro(a) portador de HIV
    11. com parceiro(a) portador de SIDA/AIDS

23. Números de parceiros: por semana ☐
    por mês ☐

    0. Nenhump arceiro(a)
    1. Parceiro(a) único(a)
    2. Um parceiro(a)
    3. Dois a 19 paceiros(as)
    4. 20 ou mais parceiros(as)
    5. Não quer comentar

24. Parceiro(s) de (ou em) outro(s) estado(s)?
    1. Sim 2. Não 3. Não sabe Se sim, quais Estados:_____
25. Parceiro(s) de (ou em) outro(s) país(es)?
    1. Sim 2. Não 3. Não sabe Se sim, quais países:_____
26. Sexo anal:
    1. Sempre
    2. Às vezes
    3. Nunca
    4. Não quer comentar
    5. Não se aplica
27. Sexo com trabalhador(a) comercial do sexo 1.Sim 2. Não
28. Uso de preservativo 1. Sempre 2. Nunca 3. Às vezes
29. Preservativo na última relação sexual? 1.Sim 2. Não
30. Preservativo em relação sexual eventual? 1.Sim 2. Não

31. História de DST: Sim Não
Freqüência: 01 01 a 05 Mais de 05
Quais lembra: _____
Diagnóstico clínico: Sim Não
Diagnóstico laboratorial: Sim Não
32. Foi vacinado contra hepatite B? 1.Sim 2. Não 3. Não sabe
33. Já teve hepatite? 1.Sim 2. Não Qual? 1.HAV 2.HBV 3.HCV 4. Não sabe
34. Diagnóstico clínico? 1.Sim 2. Não Diagnóstico Laboratorial? 1.Sim 2. Não

Uso de antiretroviral: 1. Não 2. Sim

Quais:_____

Data de início da terapia:
Alguma vez abandonou o tratamento? a) Sim b) Não Quantas vezes? _____