



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA
E SAÚDE



SARA NUNES VAZ

DIVERSIDADE GENÉTICA DO VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA
HUMANA TIPO 1 (HIV-1) APÓS TRANSMISSÃO VERTICAL EM
SALVADOR-BAHIA.

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Salvador
2014

SARA NUNES VAZ

**DIVERSIDADE GENÉTICA DO VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA
HUMANA TIPO 1 (HIV-1) APÓS TRANSMISSÃO VERTICAL EM
SALVADOR-BAHIA.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Medicina e Saúde, da Faculdade de Medicina da Bahia, Universidade Federal da Bahia, como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Medicina e Saúde.

Orientador:

Prof. Dr. Carlos Roberto Brites Alves

Hospital Universitário Professor Edgard Santos – UFBA

Co-orientador:

Prof. Dr. Luiz Carlos Junior Alcântara

Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz – FIOCRUZ

Salvador
2014

V393 Vaz, Sara Nunes

Diversidade genética do vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1) após transmissão vertical em Salvador-Bahia / Sara Nunes Vaz. – Salvador, 2014.

88 f.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Roberto Brites.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia. Faculdade de Medicina da Bahia, 2014.

1. HIV-1. 2. Transmissão Vertical. 3. Diversidade Genética. I. Brites, Carlos Roberto. II. Universidade Federal da Bahia. III. Título.

CDU 616.98

COMISSÃO EXAMINADORA

Dr. André Castro Lyra

Professor adjunto do Departamento de Medicina da Faculdade de Medicina da Bahia da Universidade Federal da Bahia; professor permanente do Curso de Pós-Graduação em Medicina e Saúde da UFBA e membro do colegiado do Curso de Pós-Graduação em Medicina e Saúde da UFBA; doutorado em Gastroenterologia Clínica pela Universidade de São Paulo (2003).

Dra. Fabianna Márcia Maranhão Bahia

Médica infectologista; mestrado e doutorado em Medicina e Saúde pela Universidade Federal da Bahia (2004 e 2010).

Dr. Luciano Kalabric Silva

Professor assistente da União Metropolitana de Educação e Cultura e professor permanente e membro do colegiado da Pós-graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa do IGM/FIOCRUZ, Salvador-BA; mestrado e doutorado em Patologia Humana e Experimental pela Universidade Federal da Bahia (1998 e 2003).

SUPLENTE

Dr. Carlos Roberto Brites Alves

Professor Associado de Infectologia da Faculdade de Medicina e coordenador do Programa de pós-graduação em Medicina e Saúde, da Universidade Federal da Bahia; doutorado em Medicina pela Universidade Federal da Bahia (1997). Pós-doutorado pela Harvard School of Public Health.

DEDICATÓRIA

Este trabalho é dedicado às crianças e adolescentes infectados pelo HIV no mundo e aos seus pais e cuidadores que, bravamente, buscam torná-los adultos saudáveis.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Carlos Brites pela orientação deste trabalho e os valiosos ensinamentos.

Ao Dr. Luiz Carlos Junior Alcântara pelo acolhimento em seu laboratório e constante incentivo pela busca do conhecimento.

À Dra. Maria Luiza Gonçalves pelo importante apoio na captação dos pacientes para este trabalho.

Ao Dr. Eduardo Netto pelos questionamentos e colaboração, principalmente ao lidar com o programa estatístico.

À Dra. Rosângela Castro (Rosa), por sempre responder com muito entusiasmo às minhas infundáveis perguntas e me incentivar a não desistir nunca.

Aos colaboradores do Laboratório de Pesquisa em Infectologia, pela disponibilidade e preciosa ajuda no contato com pacientes, processamento das amostras e experimentos laboratoriais.

Aos colegas da Fiocruz e do Laboratório de Genética, Hematologia e Biologia Computacional que carinhosamente me acolheram durante parte do desenvolvimento deste trabalho, em especial Jaqueline Góes e Filipe Rego.

À Silvana Paz, responsável pela Plataforma de Sequenciamento do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, pelo enorme apoio.

À minha amiga e parceira de trabalhos, Juliana Abreu, por estar sempre junto dividindo as alegrias e compartilhando os momentos de estresse.

À minha mãe Neide e ao meu esposo Fábio por estarem sempre ao meu lado, me dando força, suporte e muito amor.

Aos Espíritos de Luz....

Muito obrigada a todos!!!!

“Aprenda como se você fosse viver para sempre. Viva como se você fosse morrer amanhã”.

Mahatma Ghandi

RESUMO NA LÍNGUA VERNÁCULA

Introdução: Cerca de 35,3 milhões de pessoas em todo o mundo estão infectadas com o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) e destas, 2,7 milhões são crianças com menos de 15 anos de idade. A transmissão vertical (TV) do HIV-1 é responsável por 90% de todas as infecções em crianças, podendo ocorrer durante a gravidez, no momento do parto e através do leite materno. Apesar das grandes conquistas na prevenção da TV no Brasil, crianças ainda vêm sendo infectadas. **Objetivo:** Avaliar a diversidade genética do vírus HIV-1 em crianças/ adolescentes infectados por via vertical em comparação ao vírus materno. **Materiais e métodos:** Amostras de sangue total de 41 sujeitos infectados pelo HIV-1 (22 crianças e 19 mães) foram coletadas. DNA genômico foi extraído e fragmentos de *gag*, *pol* e *env* amplificados através de PCR e sequenciados. Reconstruções filogenéticas foram utilizadas para subtipar as sequências e identificar recombinantes. Sequências de aminoácidos dos pares de mães e filhos virgens de terapia antirretroviral (TARV) foram analisadas quanto ao número de mutações não sinônimas. A região da alça V3 das sequências de *env* foram analisadas para identificação de assinaturas e predição *in silico* do coreceptor viral. Mutações de resistência associadas aos inibidores de protease, transcriptase reversa e fusão foram identificadas nas sequências de *pol* e *env*. **Resultados:** A prevalência de subtipo B puro nesta população foi de 82,1% e de recombinantes BF 17,9%. A maior frequência de mutação não sinônima foi encontrada em Env (9.9%), seguida de Gag (2.7%) e Pol (1.9%). Análises na alça V3 da região do envelope revelaram 19,5% de subtipo B' (GWGR); 46,4% de B (GPGR) e 34,1% de outras variantes (GXPX). Com relação à predição de coreceptor, 46,3% das sequências eram de vírus X4 (CXCR4) e destas, dez (52,6%) eram sequências de mães. Uma prevalência de 43,9% de mutações associadas às drogas antirretrovirais (DRAM) nas sequências de *pol* foi identificada. Dentre as crianças/adolescentes virgens de tratamento, 33,3% apresentaram pelo menos uma mutação associada aos inibidores de protease e/ou transcriptase reversa. Mutações de resistência transmitida (tDRM) foram detectadas numa prevalência de 4,9%. Encontramos uma baixa prevalência de mutações no gene *env*, associadas à resistência ao inibidor de fusão: 4,9% de HR1 e 14,6% de HR2. **Conclusões:** Os resultados ressaltam a importância de testar as gestantes e mantê-las em TARV para supressão do vírus, evitando assim a TV. Para dar melhor suporte às políticas públicas de saúde na eliminação da TV do HIV-1 e na seleção de regimes de TARV ativa para mães e bebês, é essencial entender a epidemiologia molecular do vírus.

Palavras-chaves: HIV-1; transmissão vertical; diversidade genética.

RESUMO EM LÍNGUA ESTRANGEIRA

Introduction: Around 35.3 million people worldwide are infected with Human Immunodeficiency Virus (HIV) around 2.7 million of whom are children under 15 years. Mother-to-child-transmission (MTCT) of HIV-1 accounts for 90% of all HIV-1 infections in children and can occur during pregnancy, delivery and through breast-feeding. Despite great advances in the prevention of MTCT in Brazil, children are still becoming infected. **Objective:** Characterize the genetic diversity of HIV-1 isolates in infected children by the vertical route in relation to the maternal virus, in a population from Salvador, the capital of Bahia State, Brazil. **Methods:** Samples from 41 HIV-1 infected individuals from 19 families were collected. Genomic DNA was extracted; fragments from *gag*, *pol* and *env* were amplified and sequenced directly. Phylogenetic reconstruction was performed to subtype the sequences and find recombinants. The V3 loop from *env* sequences was analyzed and coreceptor usage was predicted. Drug resistance analyses were performed in *pol* and *env* sequences. **Results:** We found 82.1% of subtype B and 17.9% of BF recombinants. The highest frequency of non-synonymous mutations was found in Env (9.9%), followed by Gag (2.7%) and Pol (1.9%). Based on V3 characterization, 8 (19.5%) Brazilian B' (GWGR), 19 (46.4%) European/ EUA B (GPGR) and 14 (34.1%) GXGX variants were found. With regard to coreceptor usage, 19 (46.3%) V3 sequences were predicted to use the CXCR4 coreceptor (X4 virus) and 10 (52.6%) of them were mothers. A prevalence of 43.9% drug resistance-associated mutations in the *pol* sequences was identified. 33.3% of the drug-naïve children/adolescents presented at least 1 mutation related to PI/NRTI/NNRTI resistance. The prevalence of transmitted drug resistance mutations was 4.9%. On the *env* we found a low prevalence of HR1 (4.9%) and HR2 (14.6%) mutations. **Conclusion:** This study thus highlights the importance of increasing antenatal testing and maintaining mothers on suppressed ART. To better support public health policies to eliminate MTCT and select active regimens for mothers and babies, it is essential to understand the molecular epidemiology of the virus.

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

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Artigo de Revisão

Figura 1 – Estrutura do HIV	21
Figura 2 – Genoma do HIV-1. Cepa padrão HXB2	21
Figura 3 – Distribuição mundial dos subtipos e recombinantes do HIV-1	23
Figura 4 – Replicação viral do HIV-1	25
Figura 5 – Curso da infecção pelo HIV-1	26
Figura 6 – Rotas de infecção vertical do HIV-1	27
Figura 7 – Resistência múltipla às drogas antirretrovirais	34
Figura 8 – Proteção dos antirretrovirais contra a TV do HIV-1	35

Artigo original

Figura 1 – Árvore NJ <i>gag</i> , <i>pol</i> e <i>env</i> concatenados.....	55
Figura 2 – Árvore NJ <i>gag</i>	56
Figura 3 – Árvore NJ <i>pol</i>	57
Figura 4 – Árvore NJ <i>env</i>	58
Figura 5 – Árvore NJ recombinantes <i>gag</i>	61
Figura 6 – Árvore NJ recombinantes <i>pol</i>	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características Clínicas, Epidemiológicas e Laboratoriais dos indivíduos infectados pelo HIV-1 em Salvador-Bahia-Brasil.....	53
Tabela 2 – Sequências subtipadas através da ferramenta “Rega HIV-1 Subtyping Tool V3”.....	60
Tabela 3 – Discordância de aminoácidos em pares de mães e filhos virgens de terapia antirretroviral	63
Tabela 4 – Características clínicas, epidemiológicas e genotípicas dos indivíduos que apresentaram mutações associadas à resistência às drogas	65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3TC – Lamivudina

ABC – Abacavir

AIDS – *Acquired Immune Deficiency Syndrome* (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida)

APOBEC3G – *apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like* (Enzima indura da deaminação das citidinas em uridinas)

ARV – Antirretroviral

ART – *Antiretroviral therapy* (Terapia antirretroviral)

ATZ – Atazanavir

AZT– Zidovudina

B^o – subtipo B brasileiro do HIV-1

C1 – Primeira região constante da gp120 do envelope do HIV-1

C2 – Segunda região constante da gp120 do envelope do HIV-1

C3 – Terceira região constante da gp120 do envelope do HIV-1

C4 – Quarta região constante da gp120 do envelope do HIV-1

C5 – Quinta região constante da gp120 do envelope do HIV-1

CCR5 – *C-C chemokine receptor type 5* (Receptor celular para β quimiocina)

CD4 – *Cluster of Differentiation 4* (Grupamento de diferenciação 4)

CD8 – *Cluster of Differentiation 8* (Grupamento de diferenciação 8)

CDC – *Centers for Disease Control and Prevention* (Centro de Controle e Prevenção de Doenças)

CEDAP – Centro Especializado em Diagnóstico, Apoio e Pesquisa

cDNA – DNA complementar

CPqGM – Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz

CRFs – *Circulating Recombinant Forms* (Formas Recombinantes Circulantes)

Cpx – *complex* (complexo)

CTL – *Cytotoxic t-lymphocyte* (Linfócitos T citotóxicos)

CV – Carga viral

CXCR4 – *C-X-C chemokine receptor type 4* (Receptor para α quimiocinas)

D4t – Estavudina

DC-SIGN – *Dendritic cell-specific ICAM-3-grabbing non-integrin*

ddl – Didanosina

DNA – *Desoxiribonucleic Acid* (Ácido desoxiribonucléico)

DRAM – *Drug Resistance Associated Mutations* (Mutações associadas à resistência)

DRM – *Drug Resistance Mutations* (Mutações de resistência)

DRV – Darunavir

EFV – Efavirenz

Env – Gene do envelope do HIV

ETV – Etravirina

FI – *Fusion Inhibitor* (inibidor de fusão)

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz

FPV – Fosamprenavir

FTC – Entricitabina

(G) – Distribuição gama

Gag – Gene do grupo antígeno do HIV

gp120 – Glicoproteína do envelope do HIV-1 com massa molecular de 120kD

gp160 – Glicoproteína do envelope do HIV-1 com massa molecular de 160kD

gp41 – Glicoproteína do envelope do HIV-1 com massa molecular de 41kD

GTR – *General Time-Reversible*

HAART – *Highly Active Antirretroviral Therapy* (Terapia antirretroviral altamente potente)

HC – *Hofbauer Cell* (Célula de Hofbauer)

HIV-1 – *Human Immunodeficiency Virus type 1* (Vírus da Imunodeficiência Humana tipo 1)

HIV-2 – *Human Immunodeficiency Virus type 2* (Vírus da Imunodeficiência Humana tipo 2)

HUPES – Hospital Universitário Professor Edgard Santos

(I) – Proporção de sítios invariáveis

IDV – Indinavir

IP/r – Inibidor de protease potencializado com Ritonavir

IQR – *Interquartile Range* (Intervalo interquartil)

Kb – Kilobase

LHGB – Laboratório de Hematologia, Genética e Biologia Computacional

LPV – Lopinavir

LTR – *Long Terminal Repeats* (Repetições Terminais Longas)

MCTC – *Mother-to-child-transmission* (transmissão de mãe para filho)

MHC – *Major Histocompatibility Complex* (Complexo de Histocompatibilidade Principal)

ML – *Maximum Likelihood* (Máxima Verossimilhança)

Nef – *Negative Factor* (efetor negativo)

NFV – Nelfinavir

nm – nanômetros

NNRTI – *Nonnucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor* (Inibidor Não-nucleosídeos da Transcriptase Reversa)

NRTI – *Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor* (Inibidor Nucleosídeo da Transcriptase Reversa)

NVP – Nevirapina

OMS – Organização Mundial da Saúde

pb – Pares de base

PI – *Protease Inhibitor* (Inibidor de Protease)

PBMC – *Peripheral blood mononuclear cell* (Células Mononucleares de Sangue Periférico)

PCR – *Polymerase Chain Reaction* (Reação em cadeia da polimerase)

pol – Gene da polimerase do HIV

PR – Protease

RNA – *Ribonucleic Acid* (Ácido ribonucléico)

RNA_m – RNA mensageiro

RT – *Reverse transcriptase* (Transcriptase Reversa)

RTV – Ritonavir

SINAN – Sistema de Informação de Agravos de Notificação

SIV – *Simian Immunodeficiency Virus* (Vírus da Imunodeficiência Símia)

SQV – Saquinavir

SUS – Sistema Único de Saúde

T20 – Enfuvirtida

TARV – Terapia Antirretroviral

Tat – ativador da transcrição

TCD4+ – Linfócitos T expressando o receptor CD4

TCD8+ – Linfócitos T expressando o receptor CD8

TDF – Tenofovir

TPV – Tipranavir

TV – Transmissão vertical

TVM – *Transversion Model* (modelo de transversão)

UNAIDS – *Joint United Nations Program on HIV/AIDS* (Programa Conjunto das Nações Unidas sobre HIV/AIDS)

URFs – *Unique Recombinant Forms* (Formas Recombinantes Únicas)

V1 – Primeira região variável da gp120 do envelope do HIV-1

V2 – Segunda região variável da gp120 do envelope do HIV-1

V3 – Terceira região variável da gp120 do envelope do HIV-1

V4 – Quarta região variável da gp120 do envelope do HIV-1

V5 – Quinta região variável da gp120 do envelope do HIV-1

Vif – *Virion Infectivity Factor* (fator de infectividade viral)

Vpr – *Viral Protein R* (proteína viral R)

Vpu – *Viral Protein U* (proteína viral U)

Vpx – *Viral Protein X* (proteína viral x)

VT – *Vertical transmission* (transmissão vertical)

Sumário

1 Introdução	17
2 Objetivos	18
3 Artigo de revisão	19
4 Resultados (artigo original).....	48
5 Conclusões.....	75
6 Limitações do estudo	76
7 Considerações finais.....	77
8 Perspectivas futuras.....	78
Apêndices.....	79
Apêndice A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	80
Apêndice B – Questionário de coleta de dados.....	82
Apêndice C – <i>Primers</i> utilizados nas reações de PCR.....	83
Apêndice D – Análise de bootscan através do programa SIMPLOT	84
Anexos	85
Anexo A – Parecer do Comitê de Ética	86
Anexo B – Resumo publicado em anais de congresso	87
Anexo C – E-mail de confirmação de envio do manuscrito a Revista PlosOne ...	88

1 INTRODUÇÃO

A epidemia de AIDS no Brasil tem se mantido estável nos últimos cinco anos e, segundo dados do Ministério da Saúde, cerca de 40 mil casos foram notificados em 2012. Porém, ainda é difícil dimensionar a magnitude da infecção pelo HIV no país, uma vez que, somente a partir do final do ano de 2013 a notificação de todos os casos de infecção pelo HIV se tornou obrigatória em nível nacional. Na população jovem, a taxa de prevalência da infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana Tipo um (HIV-1) apresenta tendência de aumento e dentro deste grupo, encontram-se mulheres em idade reprodutiva.

A transmissão vertical (TV) do HIV-1 é a principal rota de infecção entre crianças e, apesar dos esforços para ser erradicada, ainda é alarmante o número de casos, sobretudo em áreas com recursos limitados. Diversos fatores podem influenciar e aumentar o risco da transmissão do vírus de mãe para filho, sendo importante a identificação precoce da gestante infectada, o conhecimento das características do vírus que ela carrega e seu tratamento adequado.

O HIV-1 é um retrovírus cuja principal característica é sua enorme variabilidade genética. Tal fato pode levar a uma grande diversidade de comportamentos biológicos das cepas virais, que pode influenciar diretamente no eficiente funcionamento do sistema imune do hospedeiro, assim como na otimização da terapia antirretroviral (TARV) e desenvolvimento de vacinas.

A epidemiologia do HIV no Brasil é dinâmica, com a participação dos subtipos B, F, e em menor escala, dos tipos C, D e A. A circulação desses genótipos gera eventos de co-infecção além de recombinação inter-subtipos, podendo não ser detectadas nos testes sorológicos e não responder às terapias antirretrovirais existentes.

O presente estudo justifica-se pela necessidade de melhor entender o perfil genético de isolados de HIV-1 que circulam em crianças e adolescentes na cidade de Salvador, infectados por via vertical. Estudos como este, que buscam mapear as características moleculares de cepas de HIV-1 são de grande importância para a caracterização de cepas virais circulantes no Brasil, podendo contribuir para o desenho de uma vacina e melhor manejo de pacientes infectados pelo vírus. Os resultados obtidos neste trabalho, certamente contribuirão com a literatura, uma vez que dados sobre crianças/adolescentes ainda são escassos em nosso meio.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a diversidade genética do HIV-1 em crianças/ adolescentes infectados por via vertical em comparação ao vírus materno.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar os subtipos do HIV-1 circulantes através de análise filogenética das regiões genômicas *gag*, *pol* e *env*;
- Verificar a presença de recombinações inter-subtipos e caracterizá-las;
- Caracterizar a alça V3 do gene *env* quanto à presença de assinaturas (motifs) e predição de correceptores;
- Comparar sequências do HIV-1 em nível de aminoácidos de isolados das mães e filhos e identificar mutações não-sinônimas;
- Avaliar a prevalência de mutações associadas à resistência aos inibidores de protease, transcriptase reversa e fusão.

3 ARTIGO DE REVISÃO DE LITERATURA

Transmissão vertical do HIV-1 e diversidade viral

1 Aspectos epidemiológicos da AIDS

O primeiro alerta para a AIDS - Síndrome da Imunodeficiência Adquirida - foi relatado em 1981, nos Estados Unidos, seguindo um aumento na incidência de doenças oportunistas raras (como a pneumonia por *Pneumocystis carinii*) e comprometimento do sistema imune de homens adultos com comportamento homossexual. Em 1983 o vírus imunodeficiência humana (HIV) foi primeiramente isolado e identificado como o agente causador da AIDS¹.

A partir de então, AIDS foi se alastrando por todo o mundo, sendo hoje uma das mais sérias doenças infecciosas relatadas na história. De acordo com os últimos dados epidemiológicos divulgados pela Organização Mundial de Saúde (OMS), em 2013, o número estimado de pessoas infectadas pelo HIV no mundo chegou a 35,3 milhões, dentre elas, cerca de 3,3 milhões são crianças abaixo de 15 anos de idade. A África Subsaariana se destaca no cenário mundial, sendo detentora de 71% de todos os soropositivos no mundo².

No Brasil, considerando os dados acumulados de 1980 a junho de 2013, um total de 686.478 casos de AIDS foi notificado, dos quais 445.197 (64,9%) correspondiam ao sexo masculino e 241.223 (35,1%) ao sexo feminino. Os óbitos acumulados no mesmo período somam 379.045. Nos últimos 10 anos, observa-se uma diminuição de 6% na taxa de incidência de casos de AIDS no país como um todo, porém em 10 das 27 Unidades Federadas, a taxa de incidência da doença supera a média nacional que é de 20,2/100.000 habitantes. São elas: Amazonas (29,4%), Roraima (27,6%), Rondônia (21,4%) e Amapá (20,3%) na Região Norte; Rio de Janeiro (31,5%), São Paulo (20,6%) e Espírito Santo (20,3%) na Região Sudeste; Rio Grande do Sul (40,2%) e Santa Catarina (36,4%) na Região Sul; e Mato Grosso (21,5%) na Região Centro-Oeste³.

Em relação aos grupos populacionais, acima de 18 anos e sob maior risco, estudos realizados em 10 municípios brasileiros entre 2008 e 2009 estimaram taxas

de prevalência do HIV, de 4,9% em profissionais do sexo feminino, de 5,9% em usuários de drogas e de 10,5% entre homens que fazem sexo com homens⁴⁻⁶.

O número de casos está aumentando entre as mulheres em todo o mundo, fato característico da feminilização da AIDS, e o Brasil também vem seguindo esta tendência. A evolução da epidemia no país foi marcada pela queda na razão entre os sexos masculino e feminino, passando de 9:1 em 1987 para dois casos em homens para cada caso em mulheres, em 2012. Apesar do aumento do número de mulheres infectadas ao longo dos anos, sobretudo em idade reprodutiva, observa-se uma diminuição de 25% na incidência de casos de AIDS em menores de cinco anos, nos últimos 10 anos. Esta taxa de incidência é o indicador utilizado no país para monitorar a redução da TV do HIV, que em 2012 foi de 3,4/100.000 habitantes²⁻³.

Com relação à infecção pelo HIV em gestantes, no último estudo sentinela em parturientes de 2010, observou-se uma prevalência de 0,38%, que corresponde a um total estimado de 10.303 gestantes soropositivas para esse ano. Comparando o dado estimado de 2010 com o número de casos de gestantes com HIV notificados em 2011 (6.540 gestantes HIV positivas), estima-se que a vigilância de HIV em gestantes alcançou 63,5% dos casos esperados³.

2 Características estruturais e genômicas do HIV-1

O HIV é um vírus da família *Retroviridae*, gênero *Lentivirinae*. Este grupo de retrovírus é capaz de causar uma infecção latente em longo prazo, efeitos citopáticos em curto prazo, além de doenças fatais de lenta ou rápida progressão⁷.

Uma partícula infecciosa do vírus (virion) é esférica, com diâmetro médio de 100nm, sendo constituída externamente pelo envelope e internamente, por um nucleocapsídeo que acondiciona o material genético viral, composto de duas fitas idênticas de RNA, com polaridade positiva, além de enzimas associadas: transcriptase reversa, integrase e protease⁸ (Figura 1).

O genoma do HIV-1 possui aproximadamente 9.800 nucleotídeos (9,8 Kb), sendo constituído de três genes estruturais, essenciais para a replicação viral: *gag* (grupo antígeno), *pol* (polimerase) e *env* (envelope), além de seis genes acessórios e regulatórios: *vif*, *vpr*, *tat*, *rev*, *vpu* e *nef*⁸ (Figura 2).

pol codifica as enzimas envolvidas no processo de replicação e integração do genoma viral: protease (p11), transcriptase reversa (p66/p51) e integrase (p31). As proteínas dos genes *gag* e *pol* são traduzidas como precursores poliprotéicos que devem ser clivados pela protease em subunidades distintas. O gene *env* codifica a gp160, uma glicoproteína precursora, que depois de clivada dá origem a duas glicoproteínas extensivamente glicosiladas: a gp120, que se localiza externamente, e a gp41, com localização transmembranar. A gp120 é formada por cinco regiões variáveis (V1-V5) intercaladas por cinco regiões conservadas (C1-C5). A região hipervariável, conhecida como V3, é imunodominante e contra ela são produzidos anticorpos neutralizantes. A V3 é formada por uma alça composta de 35 aminoácidos e unida por pontes dissulfeto. O envelope viral é derivado da membrana celular do hospedeiro e tem natureza lipoprotéica⁹⁻¹¹.

Os genes regulatórios e acessórios codificam as seguintes proteínas: *vif*, importante para os mecanismos intracelulares de transporte dos componentes virais, além de se ligar ao inibidor antiviral APOBEC3G¹²; *vpr*, que aumenta a replicação viral¹³; *tat*, que atua no alongamento do tamanho dos transcritos virais¹⁴; *ver*, que promove a exportação nuclear de partículas de RNA mensageiro¹⁵; *vpu*, que se relaciona, sobretudo com a etapa de produção e brotamento das partículas virais¹⁶ e *nef*, que atua na inibição da expressão das moléculas CD4 e MHC nas células hospedeiras aumentando a liberação de partículas virais¹⁷.

As LTRs não codificam proteínas, mas são essenciais para a regulação da expressão viral. Fatores transcricionais do hospedeiro e outros codificados pelo vírus ligam-se a regiões específicas da LTR e promovem a expressão dos genes do HIV¹⁸.

3 Epidemiologia molecular

O HIV é classificado em tipo 1 (HIV-1) e tipo 2 (HIV-2). Cepas do HIV-1 se dividem em quatro grupos filogenéticos distintos: M, N e O, que surgiram a partir de transmissões independentes do Vírus da Imunodeficiência Símia (SIV) de chimpanzés¹⁹⁻²⁰; e o grupo P, oriundo de cepas de gorilas²¹. O grupo pandêmico M (“major”, principal) é classificado em nove subtipos²²: A-D, F-H, J e K, e recombinações entre estes subtipos geram formas recombinantes únicas (URFs) e formas recombinantes circulantes (CRFs). Atualmente 55 CRFs já foram

identificadas sendo estas responsáveis por mais de 20% das infecções pelo HIV no mundo²³. Os grupos O (“outlier”, atípico)²⁴ e N (“new”, novo, não-M e não-O)²⁵ foram descritos circulando no oeste africano. Mais recentemente, o grupo P foi identificado na França em uma mulher de origem africana²¹.

Os subtipos do HIV-1 são distribuídos de maneira não uniforme pelas diversas regiões do mundo (Figura 3). De acordo com um estudo recente de Hemelaar e colaboradores (2011), o subtipo C é o responsável pelo maior número de infecções mundiais (com maior prevalência nas regiões no sul da África e Índia, e leste africano), seguido do subtipo A, B e dos CRF 02_AG e CRF02_AE. As infecções pelo subtipo B são mais amplas e uniformemente distribuídas do que as infecções pelos outros subtipos. Aproximadamente 95% das infecções pelo subtipo B encontram-se distribuídas por sete regiões do mundo, enquanto os outros subtipos e CRFs juntos são encontrados em apenas três regiões ou menos²³. No Brasil, a distribuição dos subtipos é complexa e dinâmica, com prevalência do subtipo B; co-circulação dos subtipos F e C (principalmente no sul do país), D e A²⁶⁻²⁸.

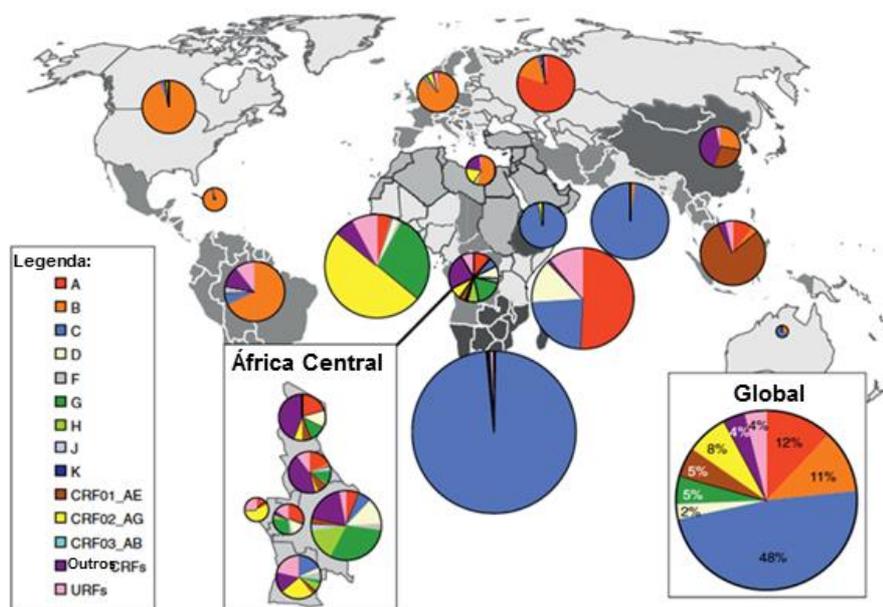


Figura 3: Distribuição mundial dos subtipos e recombinantes virais do HIV-1.
Fonte: Adaptado de Hemelaar et al, 2011.

O surgimento de recombinação inter-subtipos como BF e BC vem sendo relatado²⁹⁻³¹ e até o momento, seis CRFs já foram descritas circulando pelo país, cada uma apresentando diferentes padrões de recombinação: CRF02_AG,

CRF28_BF, CRF29_BF, CRF31_BC, CRF39_BF, CRF40_BF e CRF46_BF³²⁻³⁸. Na Bahia, os genótipos inter-subtipos BF encontrados são CRF12, CRF28, CRF29, CRF39 e CRF40³⁹⁻⁴¹.

Além destes genótipos, foi descrita dentro do grupo do subtipo B uma variação na alça V3 do gene *env*, caracterizada por uma substituição do aminoácido prolina por triptofano (GPGR-GWGR). Esta variante foi então chamada de B' (B brasileiro)⁴². Dos vírus do subtipo B circulantes na região Sudeste, aproximadamente metade foi descrito como correspondentes à variante B', e em Salvador, cerca de 18,2%⁴³.

O HIV-2 foi identificado em países do oeste africano, onde se concentra o maior número de indivíduos infectados por este vírus. Está dividido em sete subtipos e assemelha-se ao HIV-1 em alguns aspectos como a via de infecção, tropismo por células do sistema imunológico e capacidade de causar doenças que resultam da deficiência deste sistema. Porém, quanto ao potencial de patogenicidade, o HIV-2 tem uma progressão mais lenta para AIDS quando comparado ao HIV-1⁴⁴⁻⁴⁶.

4 Replicação viral

O ciclo replicativo do HIV (Figura 4) se inicia com a entrada do vírus na célula hospedeira através da ligação da gp120 ao receptor celular CD4, que está presente na superfície de linfócitos T auxiliares, monócitos/macrófagos, células dendríticas, células de langerhans e microgliais⁴⁷. Interações adicionais com receptores de quimiocinas, também conhecidos como correceptores (CXCR4 e CCR5 são os mais utilizados pelo HIV-1) ativam uma mudança conformacional na gp41 que resulta na fusão das membranas do vírus e da célula alvo. Esta fusão promove a liberação do conteúdo viral⁴⁸.

No citoplasma da célula hospedeira ocorre a transcrição reversa, ou seja, a transcrição do RNA viral em DNA complementar (cDNA), catalisada pela enzima transcriptase reversa. Depois de sintetizado, o cDNA viral é transportado para o núcleo da célula e a enzima integrase promove sua integração ao genoma hospedeiro, onde é chamado de provírus¹⁵. O provírus pode permanecer em estado de dormência ou ser transcrito em RNA mensageiro (RNAm), que é transportado para o citoplasma, para a tradução das proteínas que constituirão novas partículas virais. Os novos virions são montados próximo à membrana celular na forma de

partículas imaturas. Somente após o brotamento ocorre a maturação viral, que consiste na clivagem das proteínas Gag e Gag-pol pela enzima protease, completando assim o ciclo replicativo. Os virions maduros são então capazes de infectar novas células⁴⁸⁻⁴⁹.

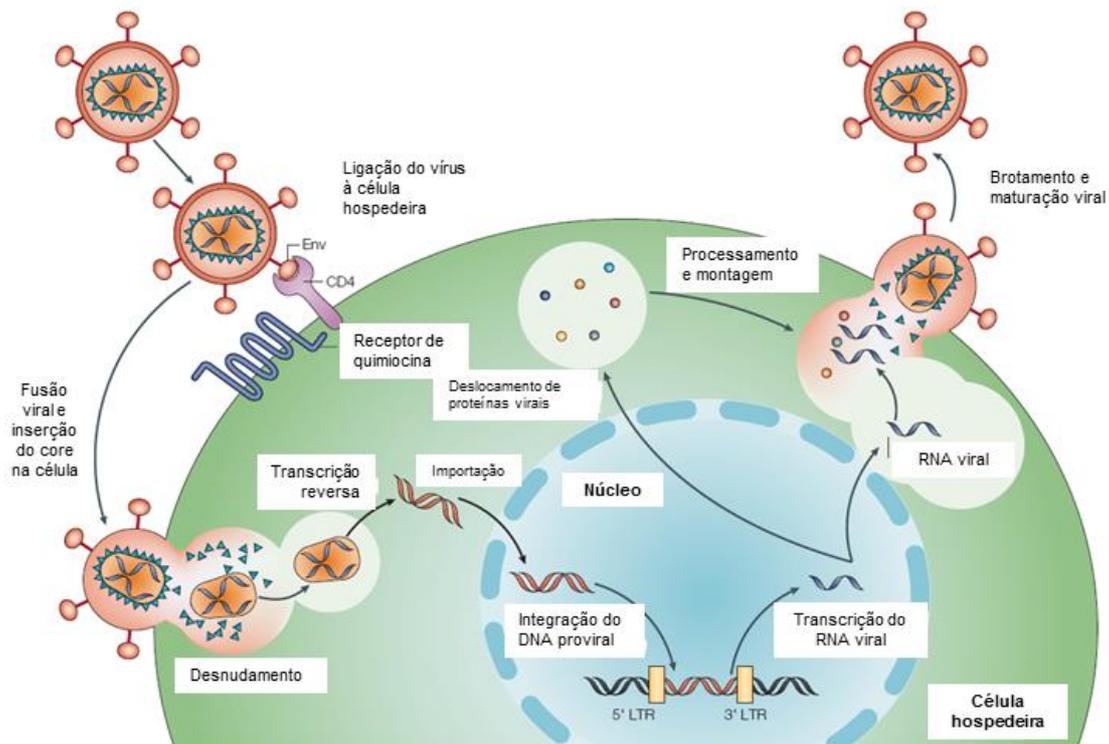


Figura 4: Replicação do HIV-1.
Fonte: Adaptado de Rambaut et al, 2004.

5 Evolução da infecção pelo HIV

A infecção pelo HIV ocorre através do contato com sangue, sêmen e fluidos corpóreos de uma pessoa infectada para outra não infectada. A progressão da infecção pode ser dividida em três fases (Figura 5): a primeira é a fase aguda, que compreende o período entre a terceira e sexta semanas após a infecção, momento em que o vírus atinge altos níveis de replicação (mais do que 10^7 cópias de RNA viral por mililitro de sangue), havendo queda nas taxas de células T CD4 e aumento significativo de células T CD8+ no sangue periférico para tentar controlar a viremia. Também nesta fase surgem as primeiras manifestações clínicas⁵⁰⁻⁵².

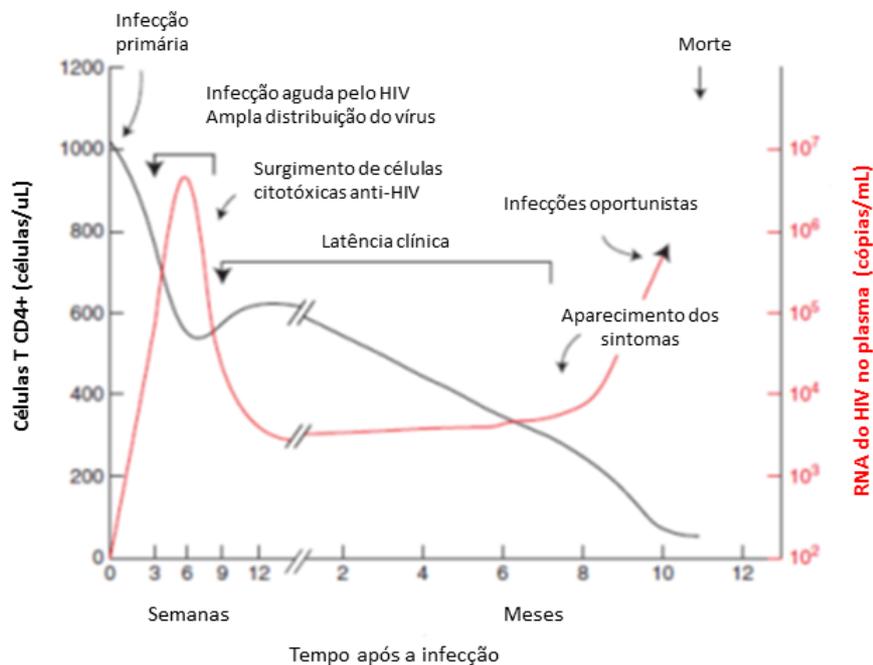


Figura 5: Curso da infecção pelo HIV.
Fonte: Adaptado de Coffin e Swanstrom, 2013.

Em seguida, vem a fase assintomática ou de latência clínica, caracterizada por uma resposta imune ativa frente ao vírus e conseqüente queda viral plasmática, que se mantém em níveis estáveis, podendo durar meses e até anos. A última fase é conhecida como período sintomático, com o aparecimento de infecções oportunistas que caracterizam um quadro clínico de AIDS⁵⁰⁻⁵².

A patogênese da infecção pelo HIV-1 em crianças, nascidas de mães soropositivas, difere em vários aspectos dos adultos no geral e de suas próprias mães, sendo em geral mais grave e mais rápida, marcada por altas taxas de replicação viral, e com importante impacto na evolução clínica e no progresso para sintomas de AIDS. Pelo fato do sistema imune do bebê ser imaturo, estando ainda em desenvolvimento, as respostas imunes contra o HIV-1 não são eficazes na contenção do vírus. Estas crianças são comumente acometidas por diversas infecções oportunistas, sendo a pneumonia por *Pneumocystis carinii* ou *jiroveci* a mais comum. Deficiências no desenvolvimento físico e desordens no sistema nervoso central também são relatadas em maior frequência nas crianças. No entanto, em alguns casos, a doença progride mais lentamente, podendo um pequeno grupo permanecer clinicamente assintomático por vários anos⁵³⁻⁵⁵.

A história natural da infecção pelo HIV-1 começou a ser alterada a partir de 1995, com o surgimento da terapia antirretroviral altamente ativa (HAART), revertendo quadros clínicos sintomáticos em pacientes com AIDS. Nos indivíduos assintomáticos, a HAART pode impedir a progressão da doença, aumentando a sobrevida e reduzindo as taxas de morbimortalidade destes pacientes⁵⁶.

6 Transmissão vertical do HIV-1

A TV ou transmissão de mãe para filho do HIV ocorre, sem nenhuma intervenção, em uma taxa estimada de 30% e ainda é a principal rota de infecção entre crianças. O uso da TARV em gestantes infectadas reduziu consideravelmente a taxa de TV em países desenvolvidos, porém a infecção infantil pelo HIV-1 ainda é preocupante, uma vez que cerca de 210 mil crianças já nascem infectadas em todo o mundo⁵⁷⁻⁵⁹.

6.1 Momento da infecção

A TV do HIV é um processo complexo e multifatorial que ainda permanece não totalmente elucidado, podendo ocorrer em três momentos distintos (Figura 6): durante a gravidez, durante o parto e no pós-parto⁶⁰. É difícil determinar com precisão o momento em que o vírus é transmitido, assim como calcular as taxas de transmissão.

		Recente	Pós parto tardio	
Gestação ~15-20%	Trabalho de parto e parto ~45-50%	Amamentação ~30-40%		
		0-1 mês	1-6 meses	6-24 meses

Figura 6: Rotas de Infecção vertical do HIV-1.
Fonte: Adaptado de Cavarelli e Scarlatti, 2011.

A infecção intra-útero pode ser confirmada por testes baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR), através da detecção de RNA viral ou DNA proviral em amostras obtidas nas primeiras 72 horas após o nascimento. Bebês com PCR negativa no nascimento e positiva entre duas e seis semanas podem ser considerados infectados nos últimos momentos da gestação, no parto ou nos primeiros dias de vida, através da amamentação. Quando a infecção só é detectada depois da oitava semana pós-nascimento, considera-se infecção pós-parto, provavelmente ocorrida através da amamentação⁶¹⁻⁶². Um melhor entendimento quanto ao momento e mecanismos da TV é importante para o desenvolvimento de estratégias de intervenção⁶³.

6.1.1 Infecção durante a gestação

A infecção intra-útero é responsável por menos de 7% dos casos de TV do HIV, o que pode ser explicado pelo eficiente papel desempenhado pela placenta como barreira viral. Mesmo na ausência de supressão viral através da TARV materna, 90% dos recém-nascidos expostos são “naturalmente” protegidos da infecção viral no útero através da placenta. A membrana trofoblástica quando íntegra regula a passagem de células sanguíneas maternas para o feto, porém quando o tecido é lesionado (através de infecção corioamniótica, infecção aguda por citomegalovírus e/ou toxoplasmose, por exemplo), sua permeabilidade é alterada favorecendo a transposição de células infectadas e vírus livres pela barreira, disseminando assim a infecção para o feto⁶⁴⁻⁶⁵.

Os vírus livres cruzam a placenta através de transporte passivo ou ativo, ou por infecção de células trofoblásticas. Estudos *in vitro* sugerem que o HIV-1 pode transitar entre os trofoblastos, ou células infectadas podem rapidamente se fundir com trofoblastos e transmitir o vírus para células receptoras subjacentes⁶⁶. As células de Hofbauer (HC), também conhecidos como macrófagos placentários, que teoricamente constituem uma defesa contra a infecção através da fagocitose de partículas virais, podem também servir de carreadores do vírus para a circulação fetal. As HC expressam em sua superfície (co) receptores do HIV-1 como CD4, CCR5, CXCR4 e DC-SIGN. Este último desempenha papel importante uma vez que possui afinidade maior com a gp120 do que o próprio CD4⁶⁴.

Estudos sugerem que a infecção pelo HIV-1 durante a gravidez ocorre, na maioria dos casos, na fase final do período gestacional, possivelmente nos dias que antecedem o nascimento, quando a placenta começa a se separar da parede uterina. Poucos casos parecem ocorrer no primeiro trimestre da gestação⁶¹⁻⁶².

6.1.2 Infecção durante o parto

A infecção periparto ocorre através do contato mucoso-cutâneo do bebê com o sangue, fluido amniótico e secreções cervico-vaginais da mãe. O vírus HIV-1 já foi detectado em aspirados gástricos de neonatos, o que suporta a evidência de deglutição de fluidos corpóreos da mãe⁶⁷⁻⁶⁸. O risco de transmissão aumenta quando há o rompimento das membranas amnióticas por mais de quatro horas antes do parto, ou, quando o trabalho de parto é prolongado, a contratilidade uterina desencadeia microtransfusões placentárias, levando a um maior contato do feto com o sangue materno. Dessa maneira, a escolha pelo parto cesáreo pode conferir grande proteção ao bebê reduzindo assim a TV⁶⁹⁻⁷⁰.

6.1.3 Infecção pós-parto

Após o nascimento, o bebê ainda está exposto ao HIV-1, podendo ser infectado no período da amamentação. Acredita-se que a TV neste período é maior nos primeiros dias de lactação por causa do aumento da carga viral (CV) no colostro, no entanto o risco continua após os momentos iniciais, estando associado a baixas taxas de contagem de células T CD4 e alta CV da mãe, ocorrência de mastite e longos períodos de amamentação⁷¹⁻⁷².

Alguns estudos apontam que as diferentes práticas de alimentação adotadas para os neonatos/crianças desempenham um papel importante na TV do HIV-1. O aleitamento materno exclusivo (nenhum outro alimento além do leite materno) nos seis primeiros meses de vida foi associado a taxas mais baixas de transmissão quando comparado à alimentação mista (leite materno associado a outras fontes de alimentação)⁷³⁻⁷⁴. Sugere-se que a alimentação mista pode comprometer a superfície da mucosa do trato gastrointestinal do bebê, facilitando assim a transmissão do vírus, possivelmente através do aumento da permeabilidade intestinal, inflamação e recrutamento de células-alvo do HIV-1⁷⁵.

Sem dúvida, a suspensão da amamentação seria a melhor alternativa para diminuir as taxas de TV no pós-parto, porém tal prática deve ser ponderada, uma vez que a sobrevivência infantil vai além da sobrevivência livre do vírus. Mesmo em países com alta prevalência de infecções pelo HIV, a amamentação pode prevenir 13% das mortes em crianças com menos de cinco anos de idade. Em países com baixa prevalência de infecções pelo vírus, 15% das mortes em crianças nesta faixa etária pode ser evitada se estas forem amamentadas. As diretrizes da OMS/UNAIDS sobre substituição de alimentação, diz que: “onde a substituição da alimentação é aceitável, factível, acessível, sustentável e segura, é recomendável evitar a amamentação, caso contrário, a amamentação exclusiva é recomendada durante os primeiros meses de vida”^{74; 76}. A promoção do aleitamento materno exclusivo durante os seis primeiros meses de vida, seguido de um rápido desmame, tem se revelado uma boa estratégia para o decréscimo das taxas de TV quando comparado à alimentação mista entre 12-24 meses⁶¹.

No Brasil, as puérperas são orientadas a não amamentar e têm o direito garantido pelo governo de receber fórmula láctea infantil pelo menos até seu bebê completar seis meses de vida⁶⁹.

6.2 Fatores envolvidos na transmissão vertical

Diversos fatores podem influenciar e aumentar o risco de TV do HIV. Kourtis e colaboradores (2010) sugerem uma divisão destes fatores em três grandes grupos: (1) fatores virológicos, como a carga viral no plasma, trato genito-urinário e leite materno; (2) fatores diretamente relacionados ao hospedeiro, como os imunológicos e genéticos, e a integridade de tecidos e mucosas; (3) fatores obstétricos, como o tipo e o momento do parto, procedimentos obstétricos invasivos e duração da ruptura da bolsa⁶⁷.

Vários parâmetros maternos têm sido associados ao aumento do risco de TV do HIV-1: estágio clínico avançado da doença, baixo número de contagem de células T CD4 e resposta imune materna. Diversos estudos indicam a CV plasmática elevada da mãe como um dos principais fatores que levam à TV⁷⁷.

Além dos fatores acima apresentados, as coinfeções maternas e infantis, que têm como alvo a placenta, membranas fetais, trato genital e tecidos mamários,

também podem aumentar o risco da TV. Elas estimulam a liberação de citocinas e agentes inflamatórios que aumentam a replicação do HIV e favorecem a permeabilidade dos tecidos, enfraquecendo as defesas naturais e facilitando a TV. Infecções do trato genital como as causadas pelo *Herpes simplex* vírus e o *Treponema pallidum* (agente causador da sífilis), ou infecções sistêmicas, como a hepatite B, hepatite C e malária podem ter um impacto substancial sobre a TV ⁷⁸. Assim, não há como avaliar o risco absoluto da TV do HIV-1 em um caso isolado. Os valores preditivos de uma combinação de fatores podem ser mais relevantes do que se cada fator for considerado isoladamente ⁶³.

6.3 Seleção de cepas virais e efeito gargalo na transmissão do HIV-1

Os casos de TV representam uma grande oportunidade de identificar características virológicas associadas à transmissão do HIV-1. Diversos estudos analisaram a diversidade de quasispécies do vírus, comparando a gama de diversidade viral em amostras de mães e seus filhos, e sugerem que a infecção no neonato se inicia comumente através de uma cepa materna única ou por um número limitado delas, indicando a presença de um efeito gargalo na TV do HIV-1 ⁷⁹⁻⁸⁰.

É provável que as cepas transmitidas, quando comparadas às variantes não transmitidas, possuam vantagens ao cruzar as barreiras da mucosa, ao infectar ou se replicar nas células alvo, ou evadir as respostas imunes. A TV pode resultar na transmissão de um menor subconjunto de vírus maternos com uma subsequente limitação na diversidade viral de sequências do filho, quando comparado às sequências maternas. No entanto, a transmissão de múltiplas variantes de mãe para filho também já foi descrita. Há evidências que a infecção no útero pode envolver a transmissão de um maior número de variantes virais quando comparado à transmissão no parto ⁸¹⁻⁸⁵.

Diferenças entre aspectos imunogenéticos do bebê e da mãe, particularmente a especificidade do HLA no reconhecimento de epítomos de linfócitos T citotóxicos pela resposta imune materna e infantil, provavelmente desempenham um papel importante na seleção. Também, algumas cepas virais transmitidas podem ter vantagens replicativas nos neonatos, podendo assim ser naturalmente selecionados, o que não exclui a possibilidade de efeitos não relativos à seleção favorecerem o

sucesso de uma variante viral⁸⁶⁻⁸⁷. Através de análises filogenéticas, Ceballos e colaboradores (2008) analisaram sequências virais de mãe e filho e observaram que durante os primeiros meses de gestação, uma única cepa minoritária foi transmitida ao bebê, seguida de uma subsequente evolução, sugerindo a ocorrência de um processo seletivo ou um evento estocástico. No entanto, na infecção durante os meses finais da gestação ou durante a amamentação, sequências virais da mãe e do filho se agruparam de maneira intercalada na árvore filogenética, sugerindo transmissões repetidas de múltiplas variantes virais⁸⁷.

6.4 Diversidade genética do HIV-1, recombinação e seus efeitos na transmissão vertical.

A principal característica do HIV é a sua excepcional diversidade genética, que pode ser explicada por pelo menos quatro fatores: altas taxas de substituição de nucleotídeos; tamanho pequeno do seu genoma; curto tempo de geração; alta frequência de recombinação⁸⁸.

Estima-se que a taxa de substituição do HIV-1 seja de 2×10^{-3} substituições/sítio/ano, sendo considerada alta⁸⁹, e aproximadamente 0,2 mutações/genoma/geração, que é cerca de 33 vezes mais do que a encontrada em *Neurospora crassa*^a.

Assim como a maioria dos vírus de RNA, o genoma do HIV é pequeno. A limitação de tamanho pode ser relacionada à máquina replicativa viral que é naturalmente propensa a erros, ou seja, na ausência de um mecanismo de reparo do genoma durante a replicação, quanto maior fosse o genoma, maior seria o número de mutações, dentre estas, mutações deletérias⁹⁰. O tamanho reduzido do genoma impacta diretamente no tempo de cada geração do HIV-1, que é de 1,2 dias, com a produção de aproximadamente 10^{10} virions por dia em um indivíduo infectado⁹¹.

A frequência de recombinação no HIV-1 é de $2,4 \times 10^{-4}$ por nucleotídeo e por ciclo de replicação, o que equivale a 2-3 eventos de recombinação por genoma e por

^a Espécie importante de fungo devido ao seu uso intensivo na ciência como organismo modelo, com genoma composto por 10 mil genes e cerca de 43 milhões de bases [Froehlich AC, Noh B, Vierstra, RD, Dunlap JC. Genetic and Molecular analysis of Phytochromes from the filamentous fungus *Neurospora crassa*. Eukaryot Cell. 2005; 4(12):2140-52].

ciclo de replicação, e ocorre ao longo de todo o genoma⁹². Isto significa que a recombinação é um mecanismo mais importante para a geração de diversidade no HIV-1 do que as mutações pontuais. Ela pode também representar um mecanismo importante de reparação genômica, quando ocorrem mutações ou alterações muito drásticas numa das cadeias de RNA viral que tornem o vírus incapaz de se replicar²⁶. Também, pode acelerar a progressão para AIDS e promover, juntamente com mutações, um mecanismo efetivo para driblar a TARV, tratamento com vacinas e pressão imunológica²⁷.

Todas essas variações no genoma do HIV-1 levam a diferentes padrões de diversidade e evolução, tanto em níveis populacionais, como dentro de um mesmo hospedeiro, com consequências na transmissão do vírus, progressão da doença, seleção natural e resistência aos ARVs⁸⁸.

Diversos estudos tentaram estabelecer uma relação entre o subtipo do HIV-1 e sua transmissibilidade materno-fetal, através da análise comparativa de sequências de diferentes regiões do genoma, de mães que transmitiram o vírus e mães que não transmitiram. Na África, Blackard e colaboradores (2001) analisaram sequências da região LTR e identificaram uma maior transmissão dos subtipos C e A em relação ao subtipo D⁹³; Yang e colaboradores (2003) verificaram maiores taxas de TV entre mulheres do subtipo D comparado com o vírus tipo A, em *p24gag* e *gp41env*, e recombinantes A/D e D/A ainda mais transmissíveis do que os A/A⁹⁴; Renjifo e colaboradores (2004) associaram maiores taxas de transmissão ao subtipo C quando comparados ao A e ao D juntos, após análises da região *env*⁹⁵. Nos Estados Unidos, Krogstad e colaboradores (2002) amplificaram sequências de *gag*, *pol* e *env* e verificaram a presença e transmissão de subtipos não-B, além do CRF02_AG⁹⁶.

Na França, numa coorte de pacientes de origem africana, não foi verificada diferença nas taxas de transmissão dos subtipos e recombinantes após análise de LTR e *gag*⁹⁷. No Brasil, Martinez e colaboradores (2006) não identificaram diferença na transmissibilidade dos subtipos B e C, a partir da análise de sequências de *gp41env*⁹⁸. Em Portugal, Pádua e colaboradores (2009), identificaram uma grande diversidade genética de cepas virais, inclusive recombinações em *env* e *nef*, porém não foi possível correlacioná-las com a TV⁹⁹.

Percebe-se que existe pouca evidência de que um padrão específico de genótipo viral está associado à TV do HIV-1, não sendo detectada até o momento, a

transmissão preferencial de um genótipo em comparação ao outro. Contudo, vem sendo sugerido que diferenças geográficas nas taxas de TV podem estar associadas à diversidade viral nestes locais^{63;100}. O fato de estes trabalhos terem analisado apenas uma pequena parte do genoma viral, pode ter dificultado a conclusão de se as cepas virais transmitidas consistiam em subtipos puros ou recombinantes, ou ainda avaliar o grau de recombinação.

As implicações biológicas e epidemiológicas da variabilidade genética do HIV-1 ainda não foram elucidadas. Alguns estudos sugerem que diferentes subtipos podem apresentar características biológicas distintas que podem interferir na transmissibilidade viral e progressão da doença dos pacientes infectados⁹⁸. Quanto aos recombinantes, é possível que apresentem algumas vantagens sobre cepas parenterais no que diz respeito a eventuais modificações no tropismo e no *fitness* viral, tornando-os possivelmente mais virulentos e mais eficientes na transmissão. Sob pressões seletivas impostas por ARVs, a recombinação entre cepas com diferentes níveis de sensibilidade pode ocorrer, resultando em uma variante ainda mais resistente¹⁰¹.

Na Figura 7, um exemplo hipotético mostra como a recombinação do HIV-1 pode ser um importante mecanismo para gerar resistência às drogas: duas diferentes cepas de HIV que são resistentes à droga A (em vermelho) e à droga B (em azul) recombinam e produzem uma nova cepa que é resistente às duas drogas.

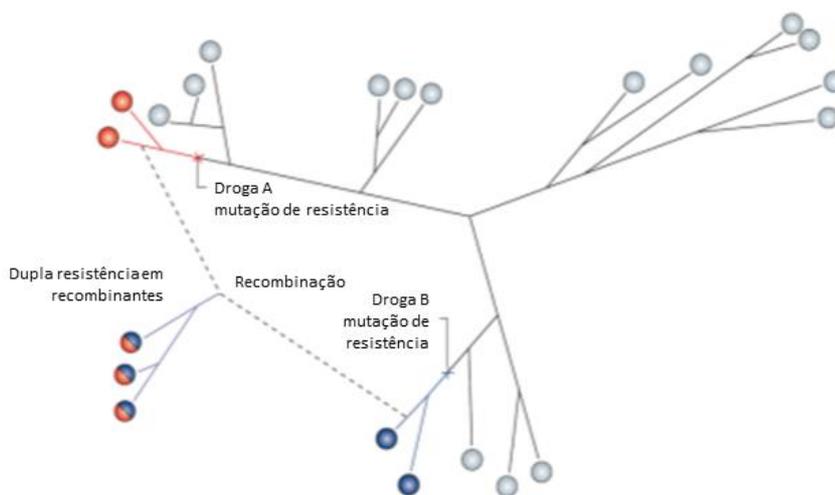
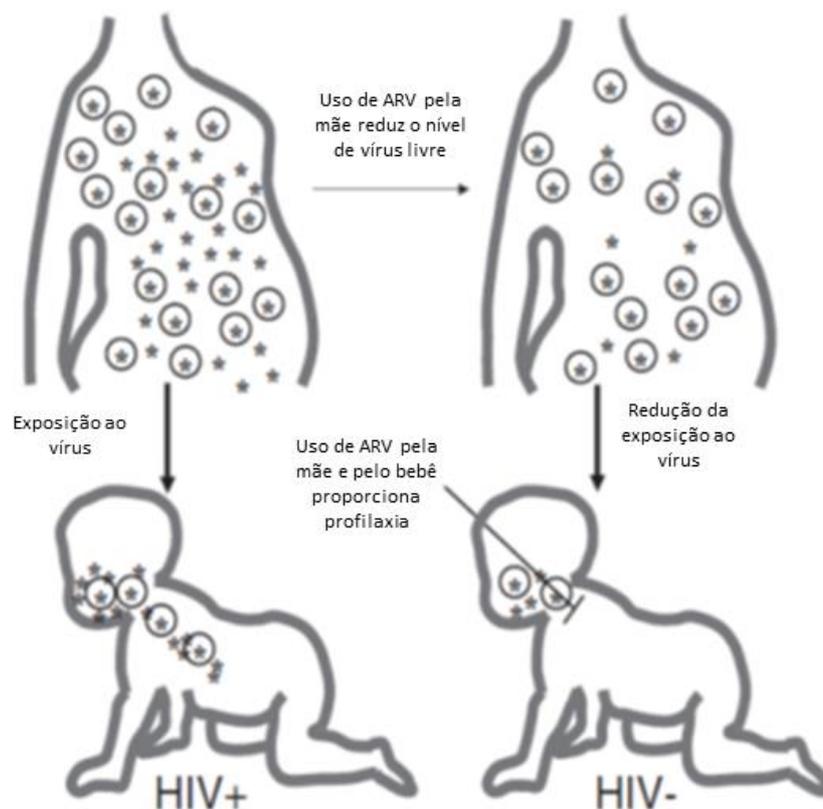


Figura 7: Resistência múltipla às drogas antirretrovirais.
Fonte: Adaptado de Rambaut et al, 2004.

6.5 Profilaxia de gestantes e recém-nascidos

A concepção de que a redução das taxas de transmissão do HIV poderia ser alcançada através da TARV foi estabelecida em 1994, a partir do primeiro ensaio clínico realizado para a TV (ACTG076). A administração de Zidovudina (AZT) pela gestante a partir do segundo trimestre da gestação e pelo bebê por até um mês, reduziu a transmissão em aproximadamente dois terços quando comparado com o grupo placebo¹⁰². O curto uso do AZT em doses diárias vem sendo associado à redução da carga viral materna no momento do parto, tanto no plasma como nas secreções vaginais⁶², além de promover a profilaxia do neonato contra o vírus no momento do parto¹⁰³ (Figura 8).



* Vírus livre/ (*) Vírus associado à célula. Do lado esquerdo: na ausência de ARVs o vírus pode causar infecção. Do lado direito, o uso de ARV pela mãe promove a redução dos vírus livres reduzindo a exposição do bebê; e o uso de ARV pelo bebê bloqueia o estabelecimento da infecção.

Figura 8: Proteção dos ARVs contra a TV do HIV-1.

Fonte: Adaptado de Lehman e Farguhar, 2007.

Desde então outros estudos foram realizados propondo esquemas únicos, como por exemplo, com dose única de Nevirapina (NVP) e esquemas combinados com a associação de inibidores da transcriptase reversa¹⁰⁴⁻¹⁰⁶.

O tratamento para gestantes preconizado pelo Ministério da Saúde do Brasil consiste na utilização de esquema ARV composto por três drogas de duas classes diferentes, seja com indicação de profilaxia ou de tratamento. Recomenda-se, para terapia inicial, um esquema preferencial com dois Inibidores da Transcriptase Reversa Análogo Nucleosídeos (ITRN) + Inibidor de Protease potencializado com Ritonavir (IP/r) [AZT + Lamivudina (3TC) + Lopinavir potencializado com Ritonavir (LPV/r)] e esquema alternativo com 2 ITRN + Inibidores da Transcriptase Reversa não Análogo Nucleosídeos (ITRNN) (AZT+3TC+NVP).

Toda gestante soropositiva para o HIV deve receber a infusão endovenosa de AZT no início do trabalho de parto até o nascimento do bebê, independentemente do esquema ARV utilizado no pré-natal, e do nível de carga viral plasmática⁶⁹.

Para os recém-nascidos, a recomendação é AZT em solução oral nas primeiras horas após o nascimento, devendo ser mantido o tratamento nas seis semanas subsequentes (42 dias)^{69; 107}.

6.5.1 Mutações de resistência, resistência transmitida e suas implicações na TV.

A prevenção da TV através do uso de ARVs pode resultar na transmissão direta de vírus resistente (resistência transmitida), ou mais frequentemente, a resistência às drogas pode ser selecionada em qualquer momento, desde a gestação até o parto ou amamentação, como resultado do uso de ARV pela mãe e/ou pela profilaxia pós-parto. Um estudo desenvolvido por Arrive e colaboradores (2007) demonstrou que mães e filhos apresentavam mutações diferentes (K103N na mãe e Y181C nos filhos) após a exposição à dose única de NVP profilático¹⁰⁸.

O surgimento de variantes virais resistentes selecionadas pela TARV pode acontecer pela escolha de um regime pouco potente ou a incompleta aderência ao tratamento, que juntamente com a resistência transmitida, resulta na limitação da eficácia do tratamento. As mutações de resistência surgidas a partir da profilaxia podem desaparecer algum tempo após o nascimento, não sendo possível desta forma, avaliar o grau de resposta à TARV em crianças mais velhas expostas à terapia não profilática¹⁰⁹.

No estudo de Hauser e colaboradores (2012) com gestantes em uso de TARV tripla profilática (AZT, NVP dose única e 3TC), foi detectada a presença de variantes virais com mutações de resistência a pelo menos um ARV em 40% das mulheres; e 3/7 neonatos apresentaram vírus resistente¹¹⁰. Já em um estudo recente com 97 gestantes infectadas com o HIV-1, na África, foi relatada uma prevalência de 11,9% de resistência primária nestas pacientes¹¹¹.

6.6 Ações de controle da transmissão vertical

A eliminação da TV do HIV é uma meta perseguida por muitos países. Observa-se uma queda significativa no número de crianças infectadas anualmente ao longo dos últimos anos. Em 2012, 210 mil crianças no mundo foram infectadas pelo HIV-1, o que representa uma diminuição de 38% desde 2009⁵⁹. Pode-se dizer que a TV do vírus já foi virtualmente eliminada em países industrializados, já que a maioria das novas infecções tem ocorrido em países da África Subsaariana e na Índia. Em 2008, para cada criança vivendo com o vírus nas Américas e na Europa centro-ocidental, aproximadamente 800 crianças foram infectadas nesta região africana¹¹².

As ações prioritárias recomendadas pela OMS para a redução do número de crianças infectadas incluem: (1) fortalecer os serviços primários de prevenção para assegurar que as mulheres em idade reprodutiva e seus parceiros evitem a infecção pelo HIV, (2) tomar medidas (tais como o fornecimento de contraceptivos e aconselhamento) para reforçar o planejamento familiar entre as mulheres que vivem com o HIV, (3) fornecer teste de HIV, aconselhamento e medicamentos ARV em tempo hábil para as mulheres grávidas infectadas e (4) assegurar cuidados adequados e em tempo hábil, tratamento e apoio para as mulheres que vivem com o HIV, seus filhos e suas famílias².

Em 2006, o Ministério da Saúde do Brasil incluiu como prioridade no Pacto pela Saúde, a redução da mortalidade materno-infantil, que tem como um de seus componentes a redução das taxas de transmissão vertical do HIV e sífilis. As principais estratégias estão embasadas nas recomendações da OMS, com destaque para a realização do aconselhamento, que desempenha papel fundamental como

parte do processo de diagnóstico da infecção, tanto para o controle da infecção materna quanto para a prevenção da TV¹¹³.

O Brasil tem como meta a redução da TV do HIV para menos de 2% até 2015. Para atingir esse objetivo, muitas ações estão incluídas em diversas atividades em andamento. Em 2010, o Governo Federal lançou a “Rede Cegonha”, um conjunto de medidas para garantir a todas as mulheres, atendidas pelo SUS, assistência adequada, segura e humanizada desde a confirmação da gravidez, passando pelo pré-natal e o parto, até os dois primeiros anos de vida do bebê. Espera-se uma melhor vigilância do HIV-1, assim como de infecções na gravidez e no acompanhamento cuidadoso de mães positivas e seus filhos ¹¹⁴⁻¹¹⁵.

A descoberta de terapias que previnem a TV foi e está sendo um grande avanço na luta contra o vírus, mas ainda urge a descoberta de uma vacina segura e eficaz para os neonatos, crianças e também adultos. Prevenir a transmissão de mãe para filho do HIV é um ponto crucial para cuidado e suporte de mães, crianças e suas famílias^{63; 69}.

Referências

1. Barré-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, et al. Isolation of a T-lymphocyte retrovirus from a patient at risk for acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). *Science*. 1983;220: 868-87.
2. UNAIDS. AIDS Epidemic Update 2013. [acesso em 10 jan 2014]. Disponível em:http://www.unaids.org/en/media/unaids/contentassets/documents/epidemiology/2013/gr2013/UNAIDS_Global_Report_2013_en.pdf.
3. Ministério da Saúde (Brasil). Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais 2013. Boletim Epidemiológico HIV e AIDS. Ano II, n1. Até a semana epidemiológica 26^a - dezembro de 2013:1-64.
4. Sczwarcwald CL. Taxas de prevalência de HIV e sífilis e conhecimento, atitudes e práticas de risco relacionadas às infecções sexualmente transmissíveis no grupo das mulheres profissionais do sexo, no Brasil. Relatório técnico entregue ao Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais, 2009.
5. Bastos FI. Taxas de infecção de HIV e sífilis e inventário de conhecimento, atitudes e práticas de risco relacionadas às infecções sexualmente transmissíveis entre usuários de drogas em 10 municípios brasileiros. Relatório técnico entregue ao Departamento de DST, AIDS e Hepatites Virais, 2009.

6. Kerr L. Comportamento, atitudes, práticas e prevalência de HIV e sífilis entre homens que fazem sexo com homens (HSH) em 10 cidades brasileiras. Relatório técnico entregue ao Departamento de DST, AIDS e Hepatites Virais, 2009.
7. Barré-Sinoussi F. HIV as the cause of AIDS. *Lancet*. 1996;348:31-35.
8. Zeichner S.L. The molecular biology of HIV. Insights into pathogenesis and targets for therapy. *Clin Perinatol*. 1994;21:39-73.
9. Chan DC, Kim OS. HIV entry and it's inhibition. *Cell*. 1998;93:681-684.
10. Starcich BR, Haha BH, Shaw GM, et al. Identification and characterization of conserved and variable regions of the envelope gene HTLV-III/LAV, the retrovirus of AIDS. *Cell*. 1986;(45):637-44.
11. Goudsmit J, Debouck C, Melen RH, et al. Human immunodeficiency virus type 1 neutralization epitope with conserved architecture elicits early type-specific antibodies in experimentally infected chimpanzees. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998;(85):4478-82.
12. Mariani R, Chen D, Schrofelbauer B, et al. Species-specific exclusion of APOBEC3G from HIV-1 virions by Vif. *Cell*. 2003;(114):21-31.
13. Cohen EA, Subramanian RA, Gottlinger HG. Role of auxiliary proteins in retroviral morphogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1996;214: 219-35.
14. Puglisi JD, Tan R, Calnan BJ, Frankel AD, Williamson JR. Conformation of the TAR RNA-arginine complex by NMR spectroscopy. *Science*. 1992;257:76-80.
15. Hope TJ. Viral RNA export. *Chem Biol*. 1997;4(5):335-44.
16. Klimkait T, Strebel K, Hoggan MD, Martin MA, Orenstein JM. The human immunodeficiency virus type 1-specific protein vpu is required for efficient virus maturation and release. *J Virol*. 1990;64:621-9.
17. Peter F. HIV nef: The mother of all evil? *Immunity*. 1998;9:433-7.
18. Greene WC, Peterlin BM. Charting HIV's remarkable voyage through the cell: Basic science as a passport to future therapy. *Nat Med*. 2002;8:673-680.
19. Gao F, Bailes E, Robertson DL, Chen YL, et al. Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes troglodytes*. *Nature*. 1999;397:436-441.
20. Sharp PM, Bailes E, Chaudhuri RR, Rodenburg CM, Santiago MO, Hahn BH. The origins of acquired immune deficiency syndrome viruses: where and when? *Philos Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci*. 2001;356:867-876.
21. Plantier J-C, Leoz M, Dickerson JE, et al. A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. *Nat. Med*. 2009;15:871-872.

22. Mccutchan FE. Understanding the genetic diversity of HIV-1. *AIDS*. 2000;(Supl 3)14:S31-S44.
23. Hemelaar J, Gouws E, Ghys PD, Osmanov S. Global trends in molecular epidemiology of HIV-1 during 2000– 2007. *AIDS*. 2011;25(5):679–689.
24. Jaffe HW, Schochetman G. Group O human immunodeficiency virus-1 infections. *Infect Dis Clin North Am*. 1998;12(1):39-46.
25. Simon F, Maucière P, Roques P, et al. Identification of a new human immunodeficiency virus type 1 distinct from group M and group O. *Nat Med*. 1998;4(9):1032-7.
26. Morgado MG, Sabino E, Sphaer E, Bongertz V, Brigido L, Guimarães MDC, et al. Polymorphism in the V3 region on the envelope protein of HIV-1 in Brazil: divergence from prevalent North American/European subtype B strains and identification of newly described F subtype. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1994;10:569-576.
27. Morgado MG, Guimarães ML, Gripp CB, Costa CI, Neves JRI, Veloso, VG, et al. High prevalence of HIV-1 subtype B and identification of an HIV-1 subtype D infection in the city of Rio de Janeiro, Brazil. *J AIDS and Hum Retrovirology*. 1998;18:488-494.
28. Caride E, Brindeiro R, Hertogs K, et al. Drug resistance reverse transcriptase genotyping and fenotyping B and non B subtypes (F and A) of human Immunodeficiency vírus type 1 found in brazilian patients falling HAART. *Virology*. 2001; 275: 107-115.
29. Brindeiro RM, Diaz RS, Sabino EC, Morgado MG, Pires IL, Brigido L, et al. Brazilian Network for HIV Drug Resistance Surveillance (HIV-BResNet): a survey of chronically infected individuals. *J. AIDS*. 2003;17:1063–69.
30. Machado ES, Lambert, JS, Afonso AO, Cunha SM, Oliveira RH, Tanuri A, et al. Overview of genotypic and clinical profiles of human immunodeficiency virus type 1-infected children in Rio de Janeiro, Brazil. *An. Acad. Bras. Cien*. 2004;76(4):727-741.
31. De Oliveira CM, Almeida FJ, Rodrigues R, Crozatti M, Vasquez CM, do Socorro Carneiro Ferrão M, et al. High frequency of BF mosaic among HIV-1 infected children from São Paulo, Brazil. *Arch. Virol*. 2008;153:1799-1806
32. Eyer-Silva WA, Morgado MG. Autochthonous horizontal transmission of a CRF02_AG strain revealed by a human immunodeficiency virus type 1 diversity survey in a small city in inner state of Rio de Janeiro, Southeast Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2007;102(7):809-15.
33. Carr JK, Avila M, Gomez Carrillo M, et al. Diverse BF recombinants have spread widely since the introduction of HIV-1 into South America. *AIDS*. 2011;15:41-7.

34. De Sa Filho DJ, Sucupira MC, Casieiro MM, et al. Identification of two HIV type 1 circulating recombinant forms in Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2006;22:1-13.
35. Guimarães ML, Eyer-Silva WA, Couto-Fernandez JC, Morgado MG. Identification of two new CRF_BF in Rio de Janeiro State, Brazil. *AIDS*. 2008;22:433-5.
36. Sanabani S, Kleine Neto W, Kalmar EM, Diaz RS, Janini LM, Sabino, EC. Analysis of the near full length genomes of HIV-1 subtypes B, F and BF recombinant from a cohort of 14 patients in Sao Paulo, Brazil. *Infect Genet Evol*. 2006;6:368-77.
37. Santos AF, Sousa TM, Soares EA, et al. Characterization of a new circulating recombinant form comprising HIV-1 subtypes C and B in southern Brazil. *AIDS*. 2006;20:2011-19.
38. Sanabani SS, Pastena ER, Neto WK, Martinez VP, Sabino EC. Characterization and frequency of a newly identified HIV-1 BF1 intersubtype circulating recombinant form in São Paulo, Brazil. *Viol J*. 2010;16:7:74
39. Brennan CA, Brites C, Bodelle P, et al. HIV-1 strains identified in Brazilian blood donors: significant prevalence of B/F1 recombinants. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2007;23(11):1434-41.
40. Monteiro-Cunha JP, Araujo AF, Santos E, Galvao-Castro B, Alcantara LC. Lack of high-level resistance mutations in HIV type 1 BF recombinant strains circulating in northeast Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2011;27(6):623-31.
41. Santos LA, Monteiro-Cunha JP, Araujo AF, Brites C, Galvao-Castro B, Alcantara LC. Detection of distinct human immunodeficiency virus type 1 circulating recombinant forms in northeast Brazil. *J Med Virol*. 2011;83(12):2066-72.
42. Potts KE, Kalish ML, Lott T, et al. Genetic heterogeneity of the V3 region of the HIV-1 envelope glycoprotein in Brazil. Brazilian Collaborative AIDS Research Group. *AIDS*. 1993;7(9):1191-7.
43. Araujo AF, Brites C, Monteiro-Cunha J, et al. Lower prevalence of human immunodeficiency virus type 1 Brazilian subtype B found in northeastern Brazil with slower progression to AIDS. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2010;26(11):1249-54.
44. Clavel F. HIV-2, the West African AIDS virus. *AIDS*. 1987;1(3):135-40.
45. Rambaut A, Posada D, Crandall KA, Holmes EC: The causes and consequences of HIV evolution. *Nat Rev Genet*. 2004;5:52–61.
46. Marlink R, Kanki P, Thior I, et al. Reduced rate of disease development after HIV-2 infection as compared to HIV-1. *Science*. 1994;265(9):1587-90.

47. Cohen OJ, Weissman D, Fauci A. The immunopathogenesis of HIV infection. In: William E Paul. *Fundamental immunology*. 4.ed. Philadelphia: Lippincott-Raven;1999:147-201.
48. Pomerantz R, Horn D. Twenty years of the therapy for HIV-1 infection. *Nature Med*. 2003;9(7):867-873.
49. Frankel AD; Young JA. HIV-1: fifteen proteins and an RNA. *Annu Rev Biochem* 1998; 67:1-25.
50. Coffin JM. HIV Population Dynamics in Vivo: Implications for Genetic Variation, Pathogenesis, and Therapy. *Science*. 1995;267:483-489.
51. Robinson H. New Hope for an AIDS Vaccine. *Nature Rev*. 2002;2:239-252.
52. Coffin J, Swanstrom R. HIV Pathogenesis: Dynamics and Genetics of Viral Populations and Infected Cells. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2013;1(3):1-10.
53. Little K, Thorne C, Luo C, Bunders M, Ngongo N, McDermott P, Newell ML. Disease progression in children with vertically-acquired HIV infection in sub-Saharan Africa: reviewing the need for HIV treatment. *Curr HIV Res*. 2007;5(2):139–53.
54. Ahmad, N. Molecular mechanisms of HIV-1 mother-to-child transmission and infection in neonatal target cells. *Life Sci*. 2011;88:980–986.
55. World Health Organization (WHO). Antiretroviral therapy of HIV infection in infants and children: towards universal access. Recommendations for a public health approach. 2010 [acesso em 19 set 2013]. Disponível em: <http://www.who.int/hiv/pub/paediatric/infants2010/en/index.htm>
56. Palella FJ Jr, Deloria-Knoll M, Chmiel JS, Moorman AC, Wood, KC, Greenberg AE, et al. Survival benefit of initiating antiretroviral therapy in HIV-infected persons in different CD4+ cell strata. *Ann Intern Med*. 2003;15;138(8):620-6.
57. Matilda H (Coord.). Relatório do projeto de pesquisa: avaliação da transmissão vertical do HIV no estado de São Paulo, Brasil, 2010.
58. da Silva RC, Bedin E, Mangano A. HIV mother-to-child transmission: A complex genetic puzzle tackled by Brazil and Argentina research teams. *Infect Genet Evol*. 2013;19:312-22.
59. Govender T, Coovadia H. Eliminating mother to child transmission of HIV-1 and keeping mothers alive: Recent progress. *J Infect*. 2014; 68 Suppl 1:S57-62.
60. Newell ML, Dunn DT, Peckham CS, Semprini AE, Pardi G. Vertical transmission of HIV-1: maternal immune status and obstetric factors. The European collaborative study. *AIDS*. 1996;10(14):1675–1681.
61. Kourtis AP, Bulterys M, Nesheim SR, et al. Understanding the timing of HIV transmission from mother to infant. *JAMA*. 2001;285:709–12.

62. Lehman DA, Farquhar C. Biological mechanisms of vertical HIV-1 transmission. *Rev Med Virol.* 2007;17:381–403.
63. Cavarelli, M; Scarlatti, G. Human immunodeficiency virus type 1 mother-to-child transmission and prevention: successes and controversies. *Intern Med.* 2011;270(6):561-79.
64. Johnson EL, Chakraborty, R. Placental Hofbauer cells limit HIV-1 replication and potentially offset mother to child transmission (MTCT) by induction of immunoregulatory cytokines. *Retrovirology.* 2012;9:101:1-11.
65. Wabwire-Mangen F, Gray R, Mmiro F, et al. Placental membrane inflammation and risks of maternal to child transmission of HIV-1 in Uganda. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 1992;22:379–85.
66. Lagaye S, Derrien M, Menu E, et al. Cell-to-cell contact results in a selective translocation of maternal human immunodeficiency virus type 1 quasispecies across a trophoblastic barrier by both transcytosis and infection. *J Virol.* 2001;75(10):4780-91.
67. Kourtis AP, Bulterys. Mother-to-child transmission of HIV: pathogenesis, mechanisms and pathways. *Clin Perinatol.* 2010;37(4):721-37.
68. Nielsen K, Boyer P, Dillon M, et al. Presence of human immunodeficiency virus type 1 and HIV-1-specific antibodies in cervicovaginal secretions of infected mothers and in the gastric aspirates of their infants. *J Infect Dis.* 1996;173:1001–4.
69. Ministério da Saúde (Brasil). Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. Recomendações para profilaxia da transmissão vertical do HIV e terapia antirretroviral em crianças. Guia de tratamento. 2010;46:1-173.
70. European Collaborative Study. Caesarian section and risk of vertical transmission of HIV-1 infection. *Lancet.* 1994;343:1464-7.
71. Semba RD, Kumwenda N, Hoover DR, et al. Human immunodeficiency virus load in breast milk, mastitis, and mother-to-child transmission of human immunodeficiency virus type 1. *J Infect Dis.* 1999;180:93–8.
72. Richardson BA, John-Stewart GC, Hughes JP et al. Breast-milk infectivity in human immunodeficiency virus type 1-infected mothers. *J Infect Dis.* 2003;187:736–40.
73. Coutoudis A, Pillay K, Spooner E, Kuhn L, Coovadia HM. Influence of infant-feeding patterns on early mother-to-child transmission of HIV-1 in Durban, South Africa: a prospective cohort study. South African Vitamin A Study Group. *Lancet.* 1999;354:471–6.
74. Coovadia HM, Rollins NC, Bland RM, Little K, Coutoudis A, Bennish ML, et al. Mother-to-child transmission of HIV-1 infection during exclusive breastfeeding in the first 6 months of life: and intervention cohort study. *Lancet.* 2007;369:1107-16.

75. Rollins NC, Filteau SM, Coutsooudis A, Tomkins AM. Feeding mode, intestinal permeability, and neopterin excretion: a longitudinal study in infants of HIV infected South African women. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2001;28:132–9.
76. World Health Organization (WHO). New data on the prevention of mother-to-child transmission of HIV and their policy implications: conclusions and recommendations. Oct 11–13, 2000. WHO/RHR/ 01.28 ed. Geneva: World Health Organization; 2001.
77. Ahmad N. Molecular mechanisms of HIV-1 vertical transmission and pathogenesis in infants. *Adv Pharmacol*. 2008;56:453–508.
78. King CC, Ellington SR, Kourtis AP. The role of co-infections in mother-to-child transmission of HIV. *Curr HIV Res*. 2013;11(1):10-23.
79. Delwart E, Magierowska M, Royz M, et al. Homogeneous quasispecies in 16 out of 17 individuals during very early HIV-1 primary infection. *AIDS*. 2002; 25;16(2):189-95.
80. Bulterys PL, Dalai SC, Katzenstein DA. Viral sequence analysis from HIV-infected mothers and infants: molecular evolution, diversity, and risk factors for mother-to-child transmission. *Clin Perinatol*. 2010;37(4):739-50.
81. Walter J, Kuhn L, Aldrovandi GM. Advances in basic science understanding of mother-to-child HIV-1 transmission. *Curr Opin HIV AIDS*. 2008;3:146–50.
82. Kliks S, Cogtag CH, Corliss H, et al. Genetic analysis of viral variants selected in transmission of HIV to newborns. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2000;16:1223–33.
83. Renjifo B, Chung M, Gilbert P, et al. In utero transmission of quasispecies among HIV type 1 genotypes. *Virology*. 2003;307:278–82.
84. Scarlatti G, Leitner T, Halapi E, et al. Comparison of variable region 3 sequences of HIV-1 from infected children with the RNA and DNA sequences of the virus population of their mothers. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993;90:1721-725.
85. Dickover RE, Garratty EM, Plaeger S, et al. Perinatal transmission of major, minor, and multiple maternal human immunodeficiency virus type 1 variants in utero and intrapartum. *J Virol* 2001;75:2194–203.
86. Kuhn L, Abrams EJ, Palumbo P et al. Maternal versus paternal inheritance of HLA class I alleles among HIV-infected children: consequences for clinical disease progression. *AIDS*. 2004;18(9):1281-9.
87. Ceballos A, Andreani G, Ripamonti C, et al. Lack of viral selection in human immunodeficiency virus type 1 mother-to child transmission with primary infection during late pregnancy and/or breastfeeding. *J Gen Virol*. 2008;89(11):2773-82.

88. Castro-Nallar E, Pérez-Losada M, Burton GF, Crandall KA. The evolution of HIV: inferences using phylogenetics. *Mol Phylogenet Evol.* 2012;62(2):777-92.
89. Korber B, Muldoon M, Theiler J, Gao F, Gupta R, Lapedes A, Hahn BH, Wolinsky S, Bhattacharya T. Timing the Ancestor of the HIV-1 Pandemic Strains. *Science.* 2000;288:1789–1796.
90. Holmes EC, Grenfell BT. Discovering the Phylodynamics of RNA Viruses. *Plos Comput Biol.* 2009;5(10):1-9.
91. Rodrigo AG, Shpaer EG, Delwart EL, Iversen AKN, Gallo MV, Brojatsch J.r. Hirsch MS, Walker BD, Mullins JI. Coalescent estimates of HIV-1 generation time in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 1999;96:2187–2191.
92. Jetz AE, Yu H, Klarmann GJ, Ron Y, Preston BD, Dougherty JP. High rate of recombination throughout the human immunodeficiency virus type 1 genome. *J.Virol.* 2000;74:1234-1240.
93. Blackrd JT, Renjifo B, Fawzi W, et al. HIV-1 LTR subtype and perinatal transmission. *Virology.* 2001;287:261–265.
94. Yang C, Li M, Newman RD et al. Genetic Diversity of specific differences in mother-to-child transmission. *AIDS.* 2003; 25:(11):1667-74.
95. Renjuji B, Gilbert P, Chaplin B, Msamanga G, Mwakagile D, Fawzi W, Essex M And Tanzanian Vitamin And Hiv Study GROUP. Preferential in-utero transmission of HIV-1 subtype C as compared to HIV-1 subtype A or D. *AIDS.* 2004;18:1629–1636.
96. Krogstad P, Eshleman SH, Geng Y, et al. Mother-to-child transmission in the United States of subtypes D and A/G human immunodeficiency virus type 1. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2002; 10;18(6):413-7.
97. Chaix ML, Manigart O, Letourneur F, Burgard M, Mayaux MJ, Rouzioux C. Diversity of HIV-1 genetic subtypes in France, in the context of mother-to-child transmission. The French Pediatric Cohort Study Group. *AIDS.* 2000;18;14(3):327-8.
98. Martínez AM, Hora VP, Santos AL, et al. Determinants of HIV-1 mother-to-child transmission in Southern Brazil. *An Acad Bras Cienc* 2006;78(1):113-21.
99. Pádua E, Parreira R, Tendeiro R, et al. Potential impact of viral load and genetic makeup of HIV type 1 on mother-to-child transmission: characterization of env-C2V3C3 and nef sequences. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2009; 25(11):1171-7.
100. Odaibo GN, Olaleye DO, Heyndrickx L, Vereecken K, Houwer K, Jassens W. Mother-to-child transmission of different HIV-1 subtypes among ARV Naive infected pregnant women in Nigeria. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2006;48:77–80.

101. Moutouh L, Corbeil J, Richman D. Recombination leads to the rapid emergence of HIV-1 dually resistant mutants under selective drug pressure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1996; 93:6106-6111.
102. From the Centers for Disease Control and Prevention of HIV transmission from mother to infant. *JAMA* 1994;271(20):1567-70.
103. Wade NA, Birkhead GS, Warren BL, et al. Abbreviated regimens of zidovudine prophylaxis and perinatal transmission of the human immunodeficiency virus. *N Engl J Med*. 1998;339(20):1409-14.
104. Guay LA, Musoke P, Fleming T et al. Intrapartum and neonatal single-dose nevirapine compared with zidovudine for prevention of mother-to-child transmission of HIV-1 in Kampala, Uganda: HIV NET 012 randomised trial. *Lancet*. 1999;354:795–802.
105. The Petra Study Team. Efficacy of three short-course regimens of zidovudine and lamivudine in preventing early and late transmission of HIV-1 from mother to child in Tanzania, South Africa, and Uganda (Petra study): a randomised, double-blind, placebo controlled trial. *Lancet*. 2002;359:1178–86.
106. Dabis F, Bequet L, Ekouevi DK, et al. Field efficacy of zidovudine, lamivudine and single-dose nevirapine to prevent peripartum HIV transmission. *AIDS*. 2005;19:309–18.
107. Shapiro E, Sperling R, Coombs R, for the Pediatric AIDS Clinical Trials Group 076 Study Group. Effect of Zidovudine on perinatal HIV-1 transmission and maternal viral load. *The Lancet*. 1999;354:157-8.
108. Arrive E, Newell ML, Ekouevi DK, et al. Prevalence of resistance to nevirapine in mothers and children after single-dose exposure to prevent vertical transmission of HIV-1: a meta-analysis. *Int J Epidemiol*. 2007;36:1009–21.
109. Felicity Fitzgerald F, Penazzato M, Gibb D. Development of Antiretroviral Resistance in Children with HIV in Low- and Middle-Income Countries. *J Infect Dis*. 2013;207:S85–92.
110. Hauser A, Sewangi J, Mbezi P, Dugange F, Lau I, Ziske J, Theuring S, Kuecherer C, Harms G, Kunz A. Emergence of minor drug-resistant HIV-1 variants after triple antiretroviral prophylaxis for prevention of vertical HIV-1 transmission. *PLoS One*. 2012;7(2):e32055.
111. Vairo F, Nicastrì E, Liuzzi G. HIV-1 drug resistance in recently HIV-infected pregnant mother's naïve to antiretroviral therapy in Dodoma urban, Tanzania. *MC Infect Dis*. 2013; 21:13:439.
112. UNAIDS. It takes a Village: Ending Mother-to-Child HIV Transmission – a partnership uniting the Millennium Villages Project and UNAIDS. 2010. [acesso em 23 set 2013]. Disponível em: http://www.unaids.org/en/media/unaids/contentassets/documents/document/2010/20101231_MVP_en.pdf

113. Ministério da Saúde (Brasil). Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa nacional de DST e Aids. Plano operacional, redução da transmissão vertical do HIV e da sífilis. Brasília: Ministério da Saúde; 2007.
114. Ministério da Saúde. Rede Cegonha conta com quase R\$ 9,4 bi para garantia da assistência segura e humanizada à mãe e ao bebê. 2011 [acesso em 28 dez 2012]. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/aplicacoes/noticias>
115. Nóbrega I, Netto EM, Brites C. Barriers to prevention of HIV type 1 mother-to-child-transmission in Bahia, Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2012;28(3):233-4.

4 RESULTADOS – ARTIGO ORIGINAL

Manuscrito submetido à Revista Plos One. Registro: PONE-D-14-21768.

Genetic diversity of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 following Mother-to-Child transmission

Sara Nunes Vaz¹⁻², Luiz Carlos Junior Alcântara², Filipe Ferreira de Almeida Rego²;
Tulio de Oliveira³, Siva Danaviah³; Maria Luiza Freire Gonçalves⁴; Carlos Brites¹

¹ Retrovirology Laboratory, Federal University of Bahia, Salvador, Bahia, Brazil.

² Laboratory of Hematology, Genetics and Computational Biology, Gonçalo Moniz Research Center, Oswaldo Cruz Foundation, Salvador, Bahia, Brazil.

³ Virology Laboratory, Africa Centre for Health and Population Studies, University of Kwa Zulu-Natal, Durban, South Africa.

⁴ Specialized Center in Diagnosis, Care and Research, Salvador, Bahia, Brazil.

ABSTRACT

Introduction: Around 35.3 million people worldwide are infected with Human Immunodeficiency Virus (HIV) around 2.7 million of whom are children under 15 years. Mother-to-child-transmission (MTCT) of HIV-1 accounts for 90% of all HIV-1 infections in children and can occur during pregnancy, delivery and through breast-feeding. Despite great advances in the prevention of MTCT in Brazil, children are still becoming infected. **Objective:** Characterize the genetic diversity of HIV-1 isolates in infected children by the vertical route in relation to the maternal virus, in a population from Salvador, the capital of Bahia State, Brazil. **Methods:** Samples from 41 HIV-1 infected individuals from 19 families were collected. Genomic DNA was extracted; fragments from *gag*, *pol* and *env* were amplified and sequenced directly. Phylogenetic reconstruction was performed to subtype the sequences and find recombinants. The V3 loop from *env* sequences was analyzed and coreceptor usage was predicted. Drug resistance analyses were performed in *pol* and *env* sequences. **Results:** We found 82.1% of subtype B and 17.9% of BF recombinants. The highest frequency of non-synonymous mutations was found in *env* (9.9%), followed by *gag*

(2.7%) and *pol* (1.9%). Based on V3 characterization, 8 (19.5%) Brazilian B' (GWGR), 19 (46.4%) European/ EUA B (GPGR) and 14 (34.1%) GXGX variants were found. With regard to coreceptor usage, 19 (46.3%) V3 sequences were predicted to use the CXCR4 coreceptor (X4 virus) and 10 (52.6%) of them were mothers. A prevalence of 43.9% drug resistance-associated mutations in the *pol* sequences was identified. 33.3% of the drug-naïve children/adolescents presented at least 1 mutation related to PI/NRTI/NNRTI resistance. The prevalence of transmitted drug resistance mutations was 4.9%. On the *env* we found a low prevalence of HR1 (4.9%) and HR2 (14.6%) mutations. **Conclusion:** This study thus highlights the importance of increasing antenatal testing and maintaining mothers on suppressed ART. To better support public health policies to eliminate MTCT and select active regimens for mothers and babies, it is essential to understand the molecular epidemiology of the virus.

Key-words: HIV-1, mother-to-child-transmission; viral diversity.

INTRODUCTION

Globally, Human Immunodeficiency Virus (HIV) affects 35.3 million people around 2.7 million of whom are children under 15 years. There were 2.3 million new HIV infections in 2012, despite the decrease observed in these rates over the last decades. Among children, there was a pronounced drop of 52% between 2001 to 2012 [1]. In Brazil, the number of people living with HIV is 718,000, representing a prevalence rate of 0.4% in the general population [2]. The epidemic is increasing among women worldwide, which is a characteristic of the feminization of AIDS. Brazil is following this trend. The male: female infection rate has changed from 9:1 to 1.7:1 in the last 2 decades [1]-[2].

Mother-to-child-transmission (MTCT) of HIV-1 occurs at a rate of 30% without any intervention and accounts for 90% of all HIV-1 infections in children [3]. However, prevention of MTCT (PMTCT) strategies using antiretroviral (ARV) decreases infant transmission to less than 2%. The transmission can occur during pregnancy, delivery and through breast-feeding⁴. The mechanisms and timing of HIV-1 MTCT, however, have not been fully elucidated. Some maternal parameters, such as mothers being in an advanced clinical stage, low CD4+ lymphocyte counts and high viral load have been implicated in the increased risk of MTCT [4]-[5].

The defining feature of HIV is its exceptional genetic diversity. This diversity has been associated with the high substitutions rates, a rather small genome, short generation times and the high error-prone nature of its replication machinery that favors recombination and the emergence of mutant viruses [6]-[7]-[8]-[9]-[10]. The pandemic M group has been classified into 9 genetic subtypes: A-D, F-H, J and K, and recombination between these subtypes have generated unique recombinant forms (URFs) and circulating recombinant forms (CRFs). Until now, 55 CRFs have been identified and they are responsible for over 20% of HIV infection worldwide [11]. The subtype B is the most prevalent genotype found in Brazil, followed by F1, C and recombinants B/F [12]-[13]. Besides these genotypes, a signature motif at the V3 loop, named Brazilian subtype B (B') has been reported [14]-[15].

Brazil was the first developing country to implement a countrywide public health program to PMTCT, providing pregnant women and newborn with free HIV diagnostic tests and antiretroviral therapy (ART) [2]. While ART has been shown to reduce MTCT rates, selective transmission of resistant strains has also been documented [16]-[17].

The aim of this study is to characterize the genetic diversity of HIV-1 isolates in infected children by the vertical route in relation to the maternal virus, in a population from Salvador, the capital of Bahia State, Brazil.

MATERIALS AND METHODS

Study Population

This cross-sectional study was performed with a non-probabilistic sample of 41 HIV-1 infected individuals: children/adolescents infected through MTCT (22) and their mothers (19), followed at the Specialized State Center in Diagnosis, Care and Research (CEDAP), a Reference Health Service located in the city of Salvador, Bahia, Brazil. The study protocol (n^o.048/2011) was approved by the Ethics Committee of Maternidade Climério de Oliveira (MCO/UFBA). Mothers gave written informed consent for themselves and for their children. The study population was

recruited in 2012 and the clinical and demographic data were obtained from patients' medical records.

DNA extraction, PCR amplification and sequencing

The whole blood samples were obtained and shipped to the Virology Laboratory at Professor Edgard Santos Hospital (HUPES). Genomic DNA was extracted from peripheral blood mononucleated cells (PBMC) using the Qiagen extraction kit (Qiagen, Valencia, CA) in accordance with the manufacturer's directions. Fragments of *gag* (positions 836-2040), *pol* (positions 2253-3260) and *env* (positions 6817-8296) genes, all three relative to the HXB2 reference sequence, were generated by nested-PCR, as previously described [15]-[18]. The DNA fragments were purified and sequenced in an ABI 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems) using a Big Dye Terminator kit (Applied Biosystems).

Sequence analysis

Sequences were assembled using Geneious Software (Biomatters), aligned with a subtype reference set from Los Alamos database (<http://hiv-web.lanl.gov>), using ClustalX software [19] and manually edited using GENEDOC software [20]. JModeltest software [21] was used to choose the best model of nucleotide substitution. Phylogenetic reconstruction was performed using PAUP* 4.0b10 software [22] to generate neighbor-joining (NJ) and maximum likelihood (ML) trees. The reliability of the nodes was accessed by bootstrap analysis (1000 replicates) and the likelihood ratio test method was used to calculate statistical support for the branches. Sequences that did not cluster within any pure subtype groups were analyzed using bootscanning methods available in Rega HIV Subtyping Tool V.3 [23] and SIMPLOT software [24]. Recombinant forms were confirmed through phylogenetic reconstruction, as described above. Paired mother and child sequences were aligned and translated into amino acid sequences. All sites of amino acid discordance between mother and child were identified.

V3 sequence analysis and viral tropism

V3 *env* amino acid sequences were aligned in order to find the signature motif GWGR, with a tryptophan (W) replacing a proline (P) at the position 328 on the HIV-1

envelope. Coreceptor usage was predicted *in silico* based on V3 sequences and clinical data using the web-based tools geno2pheno [coreceptor] [25]. A false-positive rate (FRP) of 10% was used as a cutoff.

Drug Resistance Analyses

To check the presence of drug resistance-associated mutations (DRAM) in *pol* (PR/RT fragments), sequences were submitted to the Stanford HIV resistance database (<http://hivdb.stanford.edu/>). Transmitted drug resistance mutations (tDRM) were analyzed using the Calibrated Population Resistance (CPR) tool [26]. The gp41 *env* mutations associated with fusion inhibitor were defined based in the International AIDS Society-USA/IAS-USA database [27] and the Stanford Database (<http://hivdb.stanford.edu/>).

Statistical analysis

We have used SPSS software version 18.0 to perform descriptive analysis (frequencies, medians, averages) from clinical, laboratory and demographic data. Nonparametric tests were used and statistically significant difference was assumed when $p < 0.05$.

The sequences were reported to GenBank under the accession numbers KJ094770 - KJ094810; KJ094811 - KJ094851; KJ09852 - KJ09890.

RESULTS

Subjects' characteristics

Of the 41 HIV-1 infected subjects, 22 (53.7%) were children/adolescent and 19 (46.3%) were their mothers (adults). Three mothers were enrolled with 2 children each. Among the children, the median age at sampling time was 6 years-old (IQR 3-11); 15 (68.2%) were female; 14 (63.6%) were diagnosed early; 15 (68.2%) were born through cesarean section; 7 (31.8%) were breastfed and 3 (13.63%) had AIDS symptoms. All of them were infected through vertical transmission. Among the mothers, the median age was 35 years (IQR 27-38), the majority (42.1%) were

diagnosed at delivery and only 3 (15.8%) had AIDS symptoms. Clinical, demographic and laboratory data of the studied subjects are described in Table 1.

TABLE 1. Clinical, Demographic and Laboratory Characteristics of HIV-1 infected individuals in Salvador-Bahia, Brazil.

	Children (n=22)	Mothers (n=19)*
Age [years] - median (IQR)	6 (3-11)	35 (27-38)
Gender		
Male - n (%)	7 (31.82)	N/A
Female - n (%)	15 (68.18)	19 (100)
Transmission route		
Heterosexual - n (%)	N/A	11 (57.9)
IDU - n (%)	N/A	1 (5.3)
Unknown - n (%)	N/A	7 (36.8)
Time since diagnosis [years] - median (IQR)	6 (3-11)	5 (2-8)
Time of diagnosis	4.5 (2-7.25)	5 (2-8)
Before pregnancy - n (%)	N/A	2 (10.5)
During pregnancy - n (%)	N/A	2 (10.5)
At delivery - n (%)	N/A	8 (42.1)
After delivery - n (%)	N/A	7 (36.8)
Until the first year of life - n (%)	14 (63.6)	N/A
After the first year of life - n (%)	8 (36.4)	N/A
Viral load [copies/ml] - median (IQR)	15,873 (5,248-192,897)	22,953 (7,143-112,873)
Undetectable - n (%)	4 (57.1)	8 (66.6)
CD4 (cells/ml) - median (IQR)	698 (559.50-811.25)	478 (214-778)
Prenatal - n (%)	11 (50)	N/A
ARV prophylaxis during pregnancy - n (%)	4 (18.2)	N/A
Mode of Delivery		
Vaginal - n (%)	7 (31.8)	N/A
Cesarean - n (%)	15 (68.2)	N/A
Maternal IV AZT during labor - n (%)	7 (31.8)	N/A
Breastfeeding - n (%)	7 (31.8)	N/A
Duration of breastfeeding [months] - median (IQR)	36 (3-48)	N/A
AZT syrup for neonate prophylaxis - n (%)	11 (50)	N/A
Symptomatic [AIDS] - n (%)	3 (13.63)	3 (15.8)
Under ARV treatment - n (%)	7 (31.8)	12 (63.2)

* Three mothers with two offspring. IQR, Interquartile range; ARV, antiretroviral; N/A, not applicable; IDU, intravenous drug user; IV, intravenous.

As regards the use of ARVs, 7 (31.8%) children and 12 (63.2%) mothers were under HAART, while 15 children (68.2%) and 7 (36.8%) mothers were drug-naïve. Among the 7 children treated with ARV, 3 (42.9%) had received nucleotide analogue reverse transcriptase inhibitors (NRTI) + non nucleotide analogue reverse transcriptase inhibitor (NNRTI) and 4 (57.1%) had received NRTI + protease inhibitor (PI). Among the 12 mothers treated with ARV, half of them received NRTI + NNRTI and half NRTI + PI. None of them used fusion inhibitors (FI) or CCR5 antagonists. Of the individuals on therapy, 4 (57.1%) of the children and 8 (66.6%) of the mothers had undetectable viral load (i.e. VL < 50 copies/ml).

Phylogenetic analysis

All samples were successfully sequenced in the 3 genomic regions, except *gag* sequences from #8C1M (pair 8). Three different datasets were created according to each genomic region. The final fragment length and the position relative to HXB2 were: *gag* (1079 bp, position 895 to 1974), *pol* (900 bp, position 2358 to 3258) and *env* (1242 bp, position 6921 to 8163). In addition, sequences from each of the 19 family/mother-child pairs were concatenated in an alignment of 3,221 bp. Phylogenies were constructed to the concatenated and individual genes. All analysis showed that the mother and child sequences were more closely related to each other than to any other sequences (bootstraps > 97) in the concatenated dataset (Figure 1). On the sub-genomic datasets of *gag*, *pol* and *env* all mother and child sequences were more closely related to each other than to any other sequences (bootstraps > 92), except pair 6 in *pol* NJ tree. In this case, the mother-child sequences clustered together in *gag* and *env* trees but unexpectedly clustered separately in *pol*. In order to determine if this unexpected clustering was due to contamination or sample mix-up, new DNA extractions were taken from the mother and child and these were sequenced. The new sequencing of *gag* and *env* confirmed the clustering and *pol* clustered separately again (Figures 2, 3, 4).

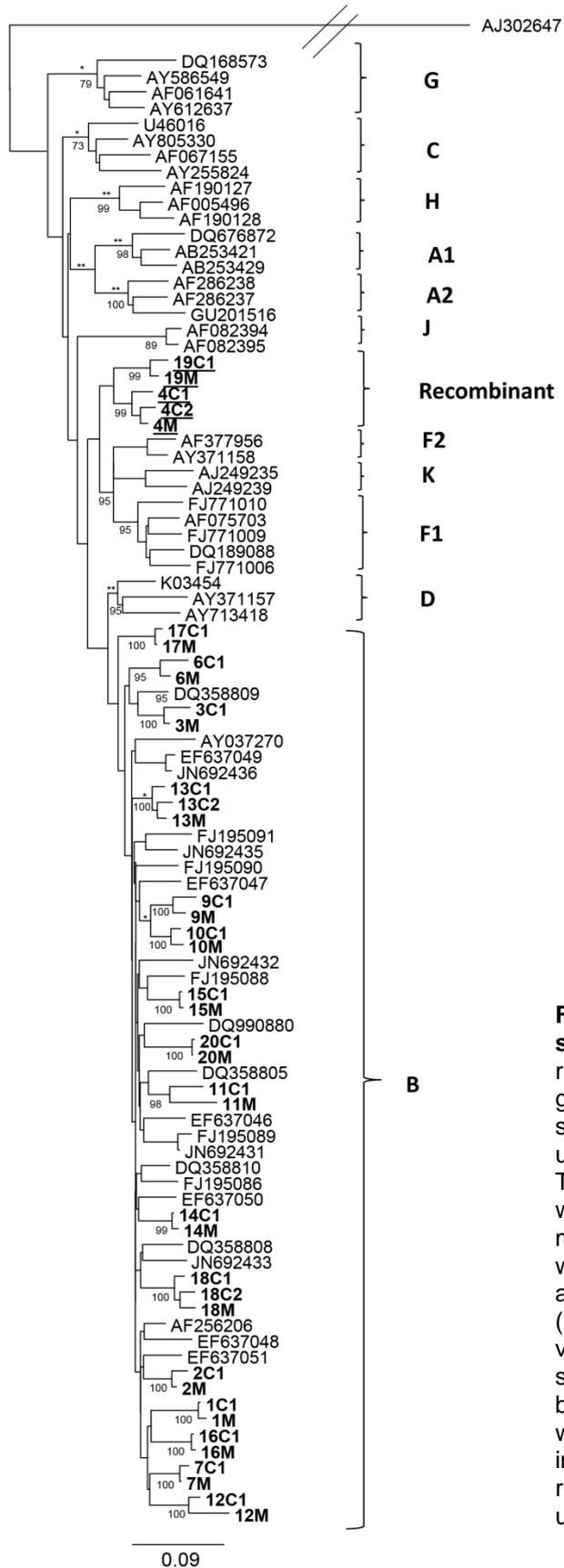


Figure 2. NJ tree based on gag sequences. NJ tree showing phylogenetic relationships between HIV-1 samples and group M reference sequences. A sequence from group O (AJ302647) was used as an outgroup sequence. The TVM+I+G nucleotide substitution model was used. Branches supported by the ML method are indicated by an asterisk (*) when significant ($P < 0.05$), and with two asterisks (**) when highly significant ($P < 0.001$). The 1,000 replicate bootstrap values above 70% were considered significant and are indicated in the branches. The HIV-1 sequences which were generated in the present study are indicated in bold and possible recombinant sequences are also underlined.

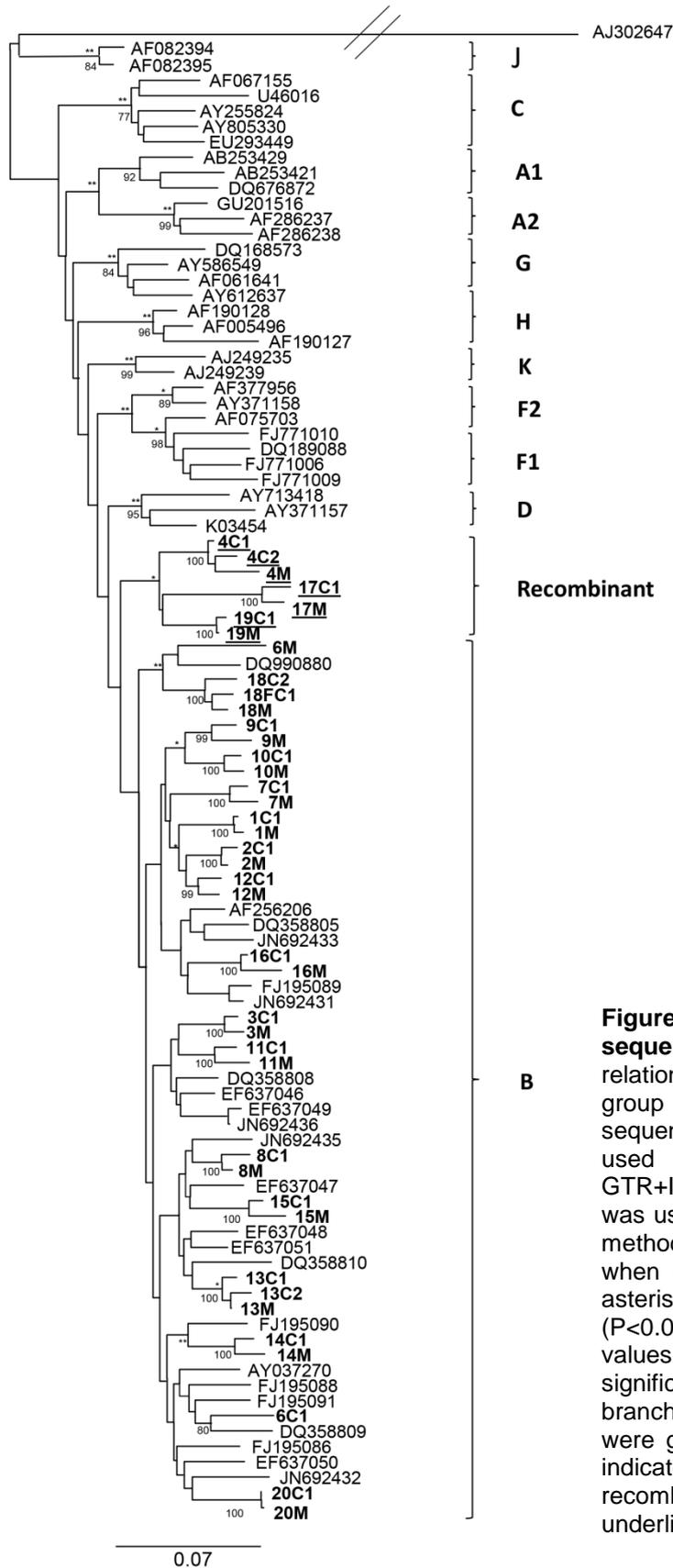


Figure 3. NJ tree based on *pol* sequences. NJ tree showing phylogenetic relationships between HIV-1 samples and group M reference sequences. A sequence from group O (AJ302647) was used as an outgroup sequence. The GTR+I+G nucleotide substitution model was used. Branches supported by the ML method are indicated by an asterisk (*) when significant ($P < 0.05$), and with two asterisks (**) when highly significant ($P < 0.001$). The 1,000 replicate bootstrap values above 70% were considered significant and are indicated in the branches. The HIV-1 sequences which were generated in the present study are indicated in bold and possible recombinant sequences are also underlined.

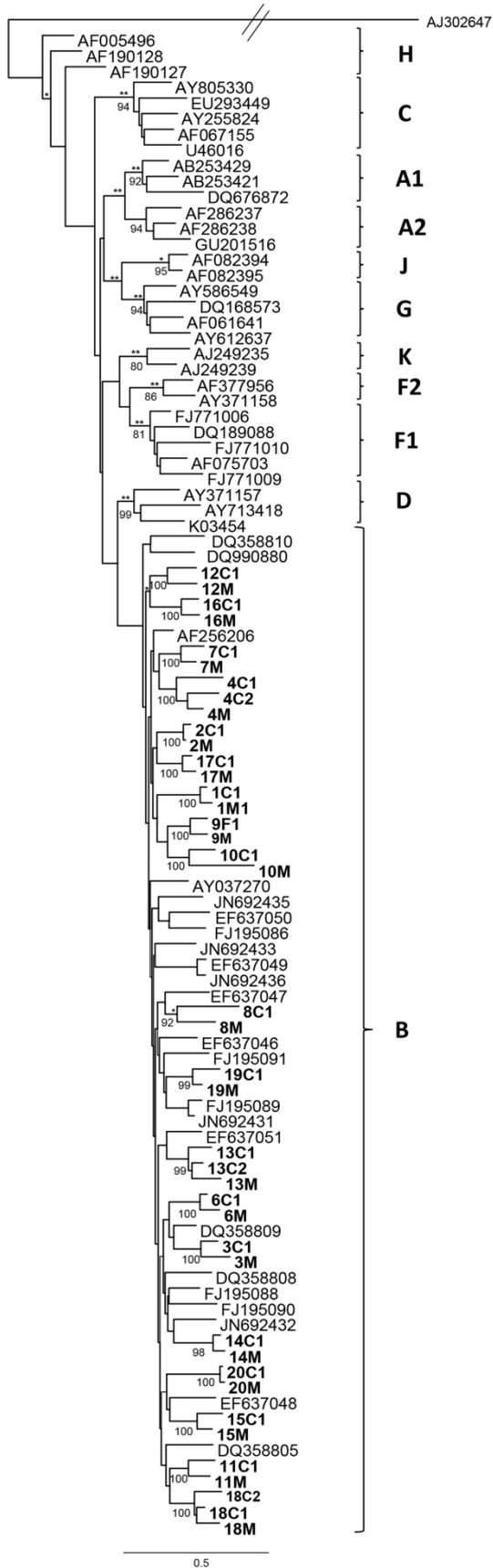


Figure 4. NJ tree based on *env* sequences. NJ tree showing phylogenetic relationships between HIV-1 samples and group M reference sequences. A sequence from group O (AJ302647) was used as an outgroup sequence. The TVM+I+G nucleotide substitution model was used. Branches supported by the ML method are indicated by an asterisk (*) when significant ($P < 0.05$), and with two asterisks (**) when highly significant ($P < 0.001$). The 1,000 replicate bootstrap values above 70% were considered significant and are indicated in the branches. The HIV-1 sequences which were generated in the present study are indicated in bold.

The sequences were subtyped using the new version of the Rega HIV-1 Subtyping Tool (V3) and were confirmed by NJ and ML analysis with pure HIV-1 subtypes. All of the alignments were above 900 bp, which allowed recombination analysis to be performed. In total, 34 (82.9%) individuals were subtype B and 7 were B/F recombinants (17.1%) in at least 1 of the genomic regions (Table 2). Individuals from mother-child pairs (number 4 and 19) clustered outside pure subtypes clusters and were confirmed as a recombinant by bootscan analysis (Figure 1 & Table 2). Another mother-child pair (number 17) clustered inside subtype B in the concatenated tree. This was confirmed in the *gag* and *env* trees, however, this pair clustered outside in the *pol* gene, which was confirmed as a recombinant by bootscanning analysis (Figures 2, 3, 4).

In order to further characterize the possible B/F recombinant viruses circulating in this population, sequences that did not cluster inside any pure subtype clusters were submitted to phylogenetic analysis using the CRF as reference sequence. Five (17.9%) *gag* and 7 (17.1%) *pol* sequences were detected as BF recombinants: viruses from #4C1C2M (family 4 – 2 children and mother) and #19C1M (pair 19) were classified as BF *gag*/BF *pol*, while viruses from #17C1M (pair 17) were B *gag*/BF *pol*. Within the *gag* sequences, the recombinant families 4 and 19 did not cluster with any recombinant profile, but formed a monophyletic cluster between CRF28_BF and CRF40_BF sequences in the phylogenetic trees (Figure 5). Within the *pol* sequences, strains from families 4 and 19 clustered together with CRF29_BF and CRF28_BF sequences respectively, whereas strains from family 17 were closely related to CRF12_BF sequences (Figure 6). When analyzing the NJ and ML trees for subtype B samples, we observed that the sequences generated in this study are present in different clusters in the phylogenetic trees suggesting multiple introductions of HIV-1 subtype B in the general population of Salvador city.

Viral sequences derived from naïve mother-child pairs were aligned to identify sites of amino acid discordance. A total of 305 discordant sites were identified. The distribution of nonsynonymous mutation was equal for Gag and Pol (median of 5), but higher in Env polipeptides (median of 30). Likewise, the highest frequency of mutations was found in Env (9.9%), followed by Gag (2.7%) and Pol (1.9%) (Table 3).

Table 2. Subtyped sequences according to Rega HIV-1 Subtyping Tool V3.

Sequence	<i>Gag</i>	<i>Pol</i>	<i>Env</i>
1C1	HIV-1 Subtype B	HIV-1 Subtype B	HIV-1 Subtype B
1M1	HIV-1 Subtype B	HIV-1 Subtype B	HIV-1 Subtype B
2C1	HIV-1 Subtype B	HIV-1 Subtype B	HIV-1 Subtype B
2M	HIV-1 Subtype B	HIV-1 Subtype B	HIV-1 Subtype B
3C1	HIV-1 Subtype B	HIV-1 Subtype B	HIV-1 Subtype B
3M	HIV-1 Subtype B	HIV-1 Subtype B	HIV-1 Subtype B
4C1	Recombinant of F1, B	Recombinant of B, F1	HIV-1 Subtype B
4C2	Recombinant of F1, B	Recombinant of B, F1	HIV-1 Subtype B
4M	Recombinant of F1, B	Recombinant of B, F1	HIV-1 Subtype B
6C1	HIV-1 Subtype B	HIV-1 Subtype B	HIV-1 Subtype B
6M	HIV-1 Subtype B	HIV-1 Subtype B	HIV-1 Subtype B
7C1	HIV-1 Subtype B	HIV-1 Subtype B	HIV-1 Subtype B
7M	HIV-1 Subtype B	HIV-1 Subtype B	HIV-1 Subtype B
8C1	N/S	HIV-1 Subtype B	HIV-1 Subtype B
8M	N/S	HIV-1 Subtype B	HIV-1 Subtype B
9C1	HIV-1 Subtype B	HIV-1 Subtype B	HIV-1 Subtype B
9M	HIV-1 Subtype B	HIV-1 Subtype B	HIV-1 Subtype B
10C1	HIV-1 Subtype B	HIV-1 Subtype B	HIV-1 Subtype B
10M	HIV-1 Subtype B	HIV-1 Subtype B	HIV-1 Subtype B
11C1	HIV-1 Subtype B	HIV-1 Subtype B	HIV-1 Subtype B
11M	HIV-1 Subtype B	HIV-1 Subtype B	HIV-1 Subtype B
12C1	HIV-1 Subtype B	HIV-1 Subtype B	HIV-1 Subtype B
12M	HIV-1 Subtype B	HIV-1 Subtype B	HIV-1 Subtype B
13C1	HIV-1 Subtype B	HIV-1 Subtype B	HIV-1 Subtype B
13C2	HIV-1 Subtype B	HIV-1 Subtype B	HIV-1 Subtype B
13M	HIV-1 Subtype B	HIV-1 Subtype B	HIV-1 Subtype B
14C1	HIV-1 Subtype B	HIV-1 Subtype B	HIV-1 Subtype B
14M	HIV-1 Subtype B	HIV-1 Subtype B	HIV-1 Subtype B
15C1	HIV-1 Subtype B	HIV-1 Subtype B	HIV-1 Subtype B
15M	HIV-1 Subtype B	HIV-1 Subtype B	HIV-1 Subtype B
16C1	HIV-1 Subtype B	HIV-1 Subtype B	HIV-1 Subtype B
16M	HIV-1 Subtype B	HIV-1 Subtype B	HIV-1 Subtype B
17C1	HIV-1 Subtype B	Recombinant of B, F1	HIV-1 Subtype B
17M	HIV-1 Subtype B	Recombinant of B, F1	HIV-1 Subtype B
18C1	HIV-1 Subtype B	HIV-1 Subtype B	HIV-1 Subtype B
18C2	HIV-1 Subtype B	HIV-1 Subtype B	HIV-1 Subtype B
18M	HIV-1 Subtype B	HIV-1 Subtype B	HIV-1 Subtype B
19C1	Recombinant of F1, B	Recombinant of B, F1	HIV-1 Subtype B
19M	Recombinant of F1, B	Recombinant of B, F1	HIV-1 Subtype B
20C1	HIV-1 Subtype B	HIV-1 Subtype B	HIV-1 Subtype B
20M	HIV-1 Subtype B	HIV-1 Subtype B	HIV-1 Subtype B

C, child; M, mother; N/S, not sequenced.

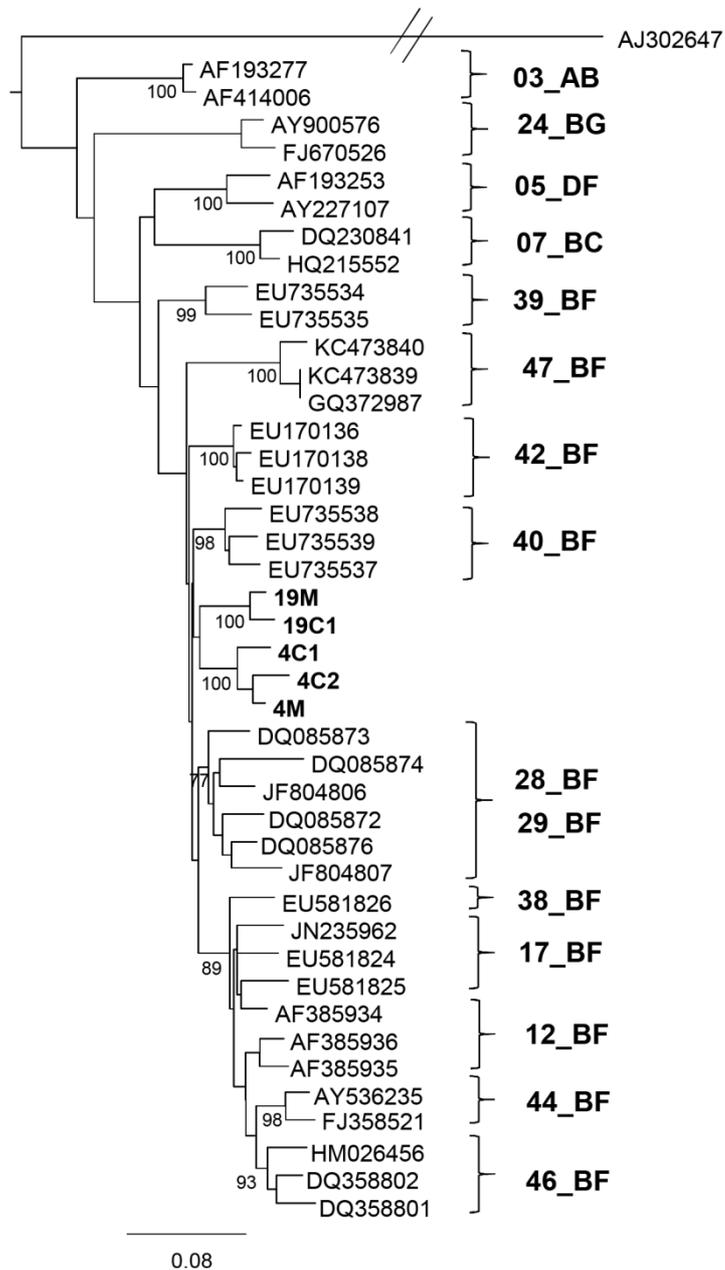


Figure 5. NJ tree based on gag recombinant sequences.

NJ tree showing phylogenetic relationships between HIV-1 samples and BF, BD, BC, BG and AB reference sequences. A sequence from group O (AJ302647) was used as an outgroup sequence. The GTR+I+G nucleotide substitution model was used. The 1,000 replicate bootstrap values above 70% were considered significant and are indicated in the branches. The HIV-1 sequences which were generated in the present study are indicated in bold.

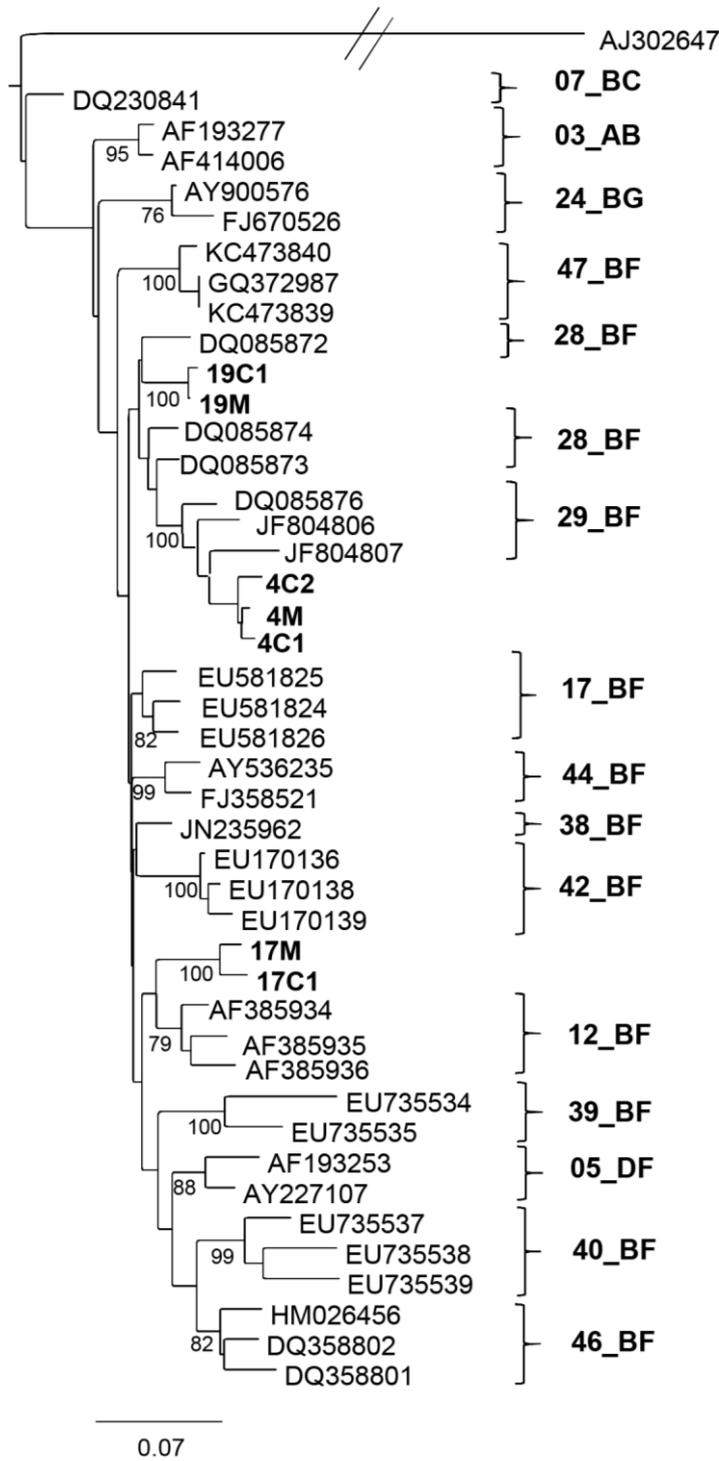


Figure 6. NJ tree based on *pol*/recombinant sequences.

NJ tree showing phylogenetic relationships between HIV-1 samples and BF, BD, BC, BG and AB reference sequences. A sequence from group O (AJ302647) was used as an outgroup sequence. The GTR+I+G nucleotide substitution model was used. The 1,000 replicate bootstrap values above 70% were considered significant and are indicated in the branches. The HIV-1 sequences which were generated in the present study are indicated in bold.

TABLE 3: Amino acid discordances in drug-naïve mother-child-pairs

Region	N ^o of subjects pairs	Median n ^o of mutations	Protein length (aa)	Median no. of mutations per aa
Gag	6	5	380	0.0272
Pol	7	5	300	0.0199
Env	7	30	440	0.0994

aa, amino acid.

V3 characterization

Based on V3 characterization, 8 (19.5%) Brazilian B' (GWGR), 19 (46.4%) European/EUA B (GPGR) and 14 (34.1%) GXGX variants were found. Amongst the mothers, the motifs GWGR and GPGR were found in (four) 4 (21.1%) and 9 (47.4%) respectively, while among children, they were found in 4 (18.2%) and 10 (45.5%) respectively. We compared clinical characteristics between subjects harboring B' (GWGR group) and B (GPGR+GXGX group) viruses. The median viral load was 6,995 and 9,599 copies/ml; the median CD4 count was 658 and 653 cells/ml; the time since diagnosis was 6.5 and 4 years in B' and B groups respectively (Mann-Whitney test $p>0.05$).

With regard to coreceptor usage, 19 (46.3%) V3 sequences were predicted to use the CXCR4 coreceptor (X4 virus) and 10 (52.6%) of them were mothers. The median age, viral load and the time since diagnosis among children infected with X4 virus was higher (7 years; 18,835 copies/ml; 6 years) than among children predicted to use the CCR5 coreceptor (R5 virus) (5 years; 9,599 copies/ml; 4 years). The median age, viral load and the time since diagnosis was also higher (35 years; 14,000 copies/ml; 6 years) among mothers harboring X4 virus than the ones infected with R5 virus (32 years; 7,443 copies/ml; 4 years). However, the median CD4 count for subjects harboring X4 viruses was lower (690 cells/ml for children and 361 cells/ml for mothers) than the R5 group (706 cells/ml for children and 653 cells/ml for mothers), as expected, but none of these variables reached statistical significance (Mann-Whitney test $p>0.05$).

Drug resistance analysis

The prevalence of DRAM was investigated in the *pol* sequences of the HIV-1 isolates in this population. We found resistance-associated mutations in the reverse transcriptase (RT) and in protease (PR) regions in 18 (43.9%) strains (Table 4). Half of them were drug naïve (5 children and 4 mothers) and the other half were ARV treated (2 children and 7 mothers). The prevalence of DRAM in naïve children was 33.3%.

With regard to the naïve subjects, we only observed the presence of tDRM in 1 child (#4C2 – K103N) and in 1 mother (#16M – M41L, M184V, L210W, K103N), corresponding a prevalence of 4.9%. Of note, 1 untreated patient (#6M) had an extensive resistance pattern to RT drugs, as shown in Table 4. Ten children received AZT during the first 6 weeks of life, but did not present DRM associated with the drug. Among the samples showing DRAM, 6 (25%) presented mutations associated with a high level of resistance to ARV drugs. Four were ARV treated and 3 of them were using at least 1 of the drugs as part of their current ARV regimen, while 1 patient presented a mutation associated with a drug that was not part of her antiretroviral combination.

Resistance mutations associated with fusion inhibitor (T-20) therapy have been described in the 36-45 amino-acid heptad repeat region (HR1), and compensatory mutations have been described in the HR2 region of the gp41 *env* gene [27]-[28]. The L44M primary mutation was present in 2 subjects (4.9%). The N37K compensatory mutation was found in 6 subjects (14.65%). Pair #20C1M had both the L44M and the N37K. Pair #17C1M had V90I, an NNRTI polymorphic accessory mutation in the *pol* gene. All subjects harboring HR1 and/or HR2 mutations had no prior exposure to antiretroviral, nor prophylactic, except 1 (#4C1) which was ARV treated.

Four mother-child pairs (#1C1M, #13C1M, #13C2M, #17C1M) presented the same mutations profile in *pol* and 2 (#17C1M, #20C1M) in *env*, suggesting MTCT transmission of resistance Table 4.

TABLE 4: Clinical, demographic and genotypic characteristics of the subjects showing mutations associated with drug resistance.

Id	Age (yrs)	Subtype	ARV use	ARV use duration (yrs)	Drug regimen	PR/RT Mutations (a)			gp41 mutations (a-b)		Drug Resistance profile (a)		
						PI (minor)	NRTI	NNRTI	HR1	HR2	Low	Intermediate	High
01M	30	B	N	N/A	N/A			E138A,V179E			RPV		
01C1	3	B	N	N/A	N/A			E138A,V179E			RPV		
04M	37	BF/BF/B	Y	3	AZT,EFV	D30G							
04C1	12	BF/BF/B	Y	1	AZT,3TC,NVP				N137K				
04C2	5	BF/BF/B	N	N/A	NA			K103N*					EFV,NVP
06M	51	B	Y	3	3TC,EFV,TDF	A71T		A98G			NVP		
07M	19	B	Y	1	AZT,3TC,EFV			K103N					EFV,NVP
11M	35	B	Y	3	3TC,TDF,ATV/R			V103I					
13M	38	B	Y	2	AZT,3TC,LPV/R	A71V							
13C1	5	B	N	N/A	N/A	A71V							
13C2	2	B	N	N/A	N/A	A71V							
14M	38	B	N	N/A	N/A	D30G							
15M	36	B	Y	3	TNF,3TC,LPV/R		M41L,M184V,L210W	K103N,V108I			TDF	ABC,AZT,D4T,DDI	FTC,EFV,NVP
15C1	3	B	N	N/A	N/A				N137K				
16M	25	B	N	N/A	N/A		M41L*,M184V*,L210W*	K103N*,V108I			TDF	ABC,AZT,D4T,DDI	FTC,EFV,NVP
17M	26	BF/B/B	N	N/A	N/A			V90I		N137K			
17C1	5	BF/B/B	N	N/A	N/A			V90I		N137K			
18M	32	B	Y	1	AZT,3TC,ATV/R	A71T							
18C1	10	B	Y	2	AZT,DDI,LPV/R	A71T	M41L,T215Y	G190A				ABC,DDI,TDF,EFV	AZT,D4T,NVP
18C2	3	B	Y	2	AZT,3TC,LPV/R		M184V	V90I			ABC		3TC,FTC
20M	19	B	N	N/A	N/A				L44M	N137K			
20C1	0	B	N	N/A	N/A				L44M	N137K			

Id, subject identification; C, child; M, mother; N, no; Y, yes; N/A, not applicable; ARV, antiretroviral; PI, protease inhibitor; NRTI, nucleoside reverse transcriptase inhibitors; NNRTI, non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors; PR, protease region; RT, reverse transcriptase region. HR1, primary mutations; HR2, compensatory mutations. * Transmitted drug resistance mutations based in the Calibrated Population Resistance database. (a) According to Stanford HIV resistance database. (b) According to International AIDS Society-USA/IAS-USA database.

DISCUSSION

In this study, we found 82.1% of subtype B and 17.9% of BF recombinants based on the sequences of *gag*, *pol* and *env* genes. This confirms that B strains are still the main HIV-1 variant [29]-[30]-[31] and that the number of BF recombinant strains has increased over the years as part of the complexity of the dynamics and evolution of HIV. Our data confirm this increase, if compared with previous findings. In 1999, Couto-Fernandez and cols. found 3.4% of BF recombinants among a group of patients infected through sexual contact in Salvador [32]. In 2003, Brindeiro and cols. reported 6% of BF recombinants in their study with samples from northeast Brazil [33]. In 2005, De Sá Filho and cols. showed a prevalence of 8.4% BF strains circulating in São Paulo [34] and more recently, in 2009, Monteiro and cols. found 13.1% BF viruses [35] in Salvador.

We found 2 intergenetic recombination patterns in this population. Strains from families' #4C1C2M and #19C1M were classified as $BF_{gag}/BF_{pol}/B_{env}$, while strains from family #17C1M were $B_{gag}/BF_{pol}/B_{env}$. The recombinant sequences did not cluster with any of the 12 previously described B/F CRFs in Brazil. These results suggest that most of the CRFs in Brazil are not of epidemiological importance in Salvador. To better identify the CRFs and possibly find URFs, we reinforced the importance of multiple and full genomic region characterization in order to obtain a reliable profile of HIV-1 molecular epidemiology.

The sequences of all mother-child pairs were in subtype accordance, including those harboring BF recombinants strains. It is likely that the recombinants exhibit some advantages over parental strains with regard to any changes in tropism and viral fitness, making them potentially more virulent and more efficiently transmitted [36].

As expected, sequences from each family/mother-child pair formed a cluster in all the phylogenetic analysis and were more closely related to each other than to any other sequences, showing the closest pairwise relationship, with high bootstrap levels (ranging from 92 to 100), which is consistent with vertical transmission [37]. The exception occurred with pair #6C1M in the *pol* tree and this can be explained as a case of divergent evolution in the infant following HIV-1 acquisition and ART. The child was 14 years old at sampling time; he was diagnosed at 6 years of age and

then started HAART. Furthermore, the child was breastfed for 60 months so would most likely have been infected during breastfeeding. It suggests the virus could have evolved significantly in comparison with the strain that was originally transmitted from the mother before initiation and during ART or that the mother was co-infected with another strain, which recombined with the original one, in a similar way to the famous Zambian couple recombination case [38].

Some of the sequences characterized in this study presented different clustering within the subtype B group in *gag*, *pol* and *env* NJ trees. For instance, sequences from pair #2C1M showed a close relationship with a reference B sequence in *gag* tree, while in the *pol* and *env* trees, they were closely related with pairs #12C1M and #17C1M respectively. These observations could indicate that these samples derived from a common ancestor that went through a different evolution process and subsequent intrasubtype recombination [15].

The tetrapeptide motif on the tip of the V3 loop of *env* varied in the sequences and a prevalence of 19.5% Brazilian B' variant was found. This frequency is slightly higher than the results found in a recent study conducted by Araújo and cols. in Bahia [15]. Nevertheless, these prevalence rates are much lower than the prevalence of 40% observed in the Brazilian Southeast [39]. This leads us to suggest that Salvador has experienced different introductions and founder effects than the Brazilian Southeast [15]. The B' Brazilian variant has been associated with low replications rates and lower disease progression [40].

Most of the V3 sequences sequenced in this study were predictive of CCR5 use (R5 virus), including the majority of the children (59%). Sanabini and cols. had similar findings even using different FRP cutoff [31]. When comparing the subjects infected with R5 and X4 viruses with respect to age, viral load and time since diagnosis, we observed that the highest values were associated with the subjects harboring X4 viruses. However, the CD4 count was lower in these groups. These findings were expected, since CXCR4 usage is associated with low CD4 T-cell counts, high viral load and an increased disease progression, while CCR5 is associated with acute or asymptomatic patients [41]-[42]. Unexpectedly, 4 out of 6 subjects with AIDS symptoms harbored the R5 virus. The coreceptor usage analysis in our study was limited to sequence-based algorithms rather than using phenotypic/functional

methods. Although phenotypic assays still have advantages over genotypic methods, genotypic predictors demonstrate to be highly concordant with phenotype data and can reliably be used to determine viral tropism. The web-based tool geno2pheno was used and it showed a similar performance to the Trofile phenotypic assay, the most often used tropism method [43].

The comparison between aligned amino acid sequences from naïve mother-child pairs showed the highest frequency of nonsynonymous mutation in the *env* gene. In the absence of selective pressure imposed by ARV, structural proteins such as *gag* and *pol* are less able to accommodate amino acid variation [44]. Indeed, the HIV-1 envelope is a highly polymorphic region, and the outer membrane proteins are under constant pressure from the immune system [45].

Transmitted drug resistance was defined according the Calibrated Population Resistance, an algorithm specifically designed for the epidemiologic surveillance of HIV-1 tDRM [26]-[46]. The prevalence of tDRM detected in this population was 4.9%, which was somewhat lower than that previously reported for adults and children in other regions of Brazil which used Stanford CPR criteria for these estimates [29]-[47]-[48]. However, if one includes all DRAMs, we found a prevalence of 43.9% DRAM in the *pol* sequences, and among naïve subjects a prevalence of 41% DRAM was observed. 33.3% (5/15) of the drug-naïve children/adolescents presented at least 1 mutation related to PI/NRTI/NNRTI resistance. However, these were minor resistance mutations and their resistance drug profile did not present intermediate or high resistance to any drug. Drug-naïve young with resistance mutation can be worrying because it may limit future treatment, especially at an age that reaching good adherence may be complicated [49]. Thus, these results reinforce the importance of performing genotypic tests in pregnant women and children before they start ART. This practice is already routinely followed in Brazilian Public Health [2].

Ten children received AZT during the first 6 weeks of life, but did not present DRM associated with the drug, which may involve reversion of resistance mutations and is consistent with prior findings [17]. It is known that 9-30% of infected infants exposed to MTCT prophylaxis with AZT present AZT-resistant viruses [50].

When comparing the resistance mutations in the children and their mothers, we observed that the resistance pattern was the same in 5 out of 22 mother-child pairs (22.8%), suggesting transmission of resistance or convergence evolution due to treatment. In 2 drug-naïve pairs (#1C1M and #17C1M), the subjects had not been previously exposed to any ARV, nor prophylaxis and presented NNRTI mutations (E138A, V179E, V190I). This suggests that mothers were infected with a mutant strain and transmitted them to their children. If this hypothesis or interpretation of event is accurate, there was a tendency for the mutations in the transmission of the virus to be preserved regardless of the time that had elapsed since diagnosis. On the other hand, some children did not present mutations which were detected in their mothers. This suggests that either a less prevalent strain without mutations was transmitted and gained fitness in the new host environment or that the mutations revert after the transmission [16]-[51]. We included in our study some drug-naïve subjects that had been infected for some years, and hence some of the DRAM might no longer be detected. The M184V mutation was detected in #16M, but not in her child, a fact that may be linked to its tendency to disappear in the absence of selective pressure by ART [52]. Another hypothesis is that this mutation was acquired by the mother after the transmission to the child.

We found a low prevalence of HR1 (4.9%) and HR2 (14.6%) mutations. Similar findings have been shown in a study from Reis and cols. in the Central-West Region, Brazil, which worked with a cohort of pregnant women [53]. It is known that selective pressure of ARV drugs on the *pol* gene of HIV-1 may affect other genomic regions, such as the *env* gene [54]. However, it was not possible to assess the relationship between ARV exposure and the presence of natural resistance mutations to T-20, because only 1 subject harboring HR1/HR2 mutation was ARV treated. The L44M primary mutation, found in 2 subjects, can lead to a loss of clinical response if combined with other mutations in the HR1 region. This mutation has been described in isolates from T-20 drug-naïve patients [53]-[55]-[56]. On the other hand, two subjects with extensive resistance pattern on the *pol* region had no T-20 resistance, indicating that they may benefit from the T-20 salvage therapy.

Additional observations of this study are that heterosexual transmission was the predominant route of contamination for mothers, which is in accordance with the

pattern of increase observed among young women in Brazil. The rate of male: female infection has changed from 9:1 to 1.7:1 over the last 2 decades and the feminization of the epidemic is a fact in the country [2]. The prevalence of late HIV-1 diagnosis among mothers and children is worrying. These data disclose that regardless of the great effort made by the Brazilian health authorities to control the AIDS epidemic, some problems might still be occurring [57].

We are aware that our observations on genetic complexity may be limited by the relatively small cohort and small fragments analyzed. Another limitation of this study is that direct bulk sequencing and genotyping of HIV-1 might not identify minority variants - quasispecies, which constitute less than 20-30% of the viral population [58]. Likewise, the sequencing method used possibly underestimates the prevalence of resistance mutations. Despite these limitations, our results thus highlight the importance of monitoring the spread of HIV-1 and its transmission through the vertical route, the molecular subtypes, and drug resistance among pregnant women and exposed children. To better support public health policies, it is essential understand the HIV-1 epidemiology.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the Program for Technological Development in Tools for Health-PDTIS/FIOCRUZ for the use of its facilities.

REFERENCES

1. UNAIDS. AIDS Epidemic Update 2013 (2013) Available: <http://www.unaids.org>. Assessed 2 January 2014.
2. Brazil Ministry of Health. National Department of STD, Aids and Viral Hepatitis (2013). Boletim Epidemiológico AIDS e DST. Ano II, n1:1-64.
3. Ahmad N (2008) Molecular mechanisms of HIV-1 vertical transmission and pathogenesis in infants. *Adv Pharmacol* 56:453–508.

4. Newell, ML, Dunn DT, Peckham CS, Semprini, AE, Pardi G (1996) Vertical transmission of HIV-1: maternal immune status and obstetric factors. The European collaborative study. *AIDS* 10(14):1675–1681.
5. Kourtis AP, Bulterys M (2010) Mother-to-child transmission of HIV: pathogenesis, mechanisms and pathways. *Clin Perinatol* 37(4):721-37.
6. Rodrigo AG, Shpaer EG, Delwart EL, Iversen AKN, Gallo MV, et al. (1999) Coalescent estimates of HIV-1 generation time in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:2187–2191.
7. Jetz AE, Yu H, Klarmann GJ, Ron Y, Preston BD, Dougherty JP (2000) High rate of recombination throughout the human immunodeficiency virus type 1 genome. *J Virol* 74:1234-1240.
8. Korber B, Muldoon M, Theiler J, Gao F, Gupta R, et al. (2000) Timing the Ancestor of the HIV-1 Pandemic Strains. *Science* 288:1789–1796.
9. Holmes EC, Grenfell BT (2009) Discovering the Phylodynamics of RNA Viruses. *Plos Comput Biol* 5(10):1-9.
10. Castro-Nallar E, Pérez-Losada M, Burton GF, Crandall KA (2012) The evolution of HIV: inferences using phylogenetics. *Mol Phylogenet Evol* 62(2): 777-792.
11. Hemelaar J, Gouws E, Ghys PD, Osmanov S (2011) Global trends in molecular epidemiology of HIV-1 during 2000– 2007. *AIDS* 25(5):679–689.
12. Morgado MG, Sabino E, Sphaer E, Bongertz V, Brigido L, et al. (1994) Polymorphism in the V3 region on the envelope protein of HIV-1 in Brazil: divergence from prevalent North American/European subtype B strains and identification of newly described F subtype. *AIDS Res Hum Retroviruses* 10: 569-576.
13. Guimarães ML, Eyer-Silva WA, Couto-Fernandez JC, Morgado MG (2008) Identification of two new CRF_BF in Rio de Janeiro State, Brazil. *AIDS* 22:433- 5.
14. Potts KE, Kalish ML, Lott T, Orloff G, Luo CC, et al. (1993) Genetic heterogeneity of the V3 region of the HIV-1 envelope glycoprotein in Brazil. Brazilian Collaborative AIDS Research Group. *AIDS* 7(9):1191-7.
15. Araujo FA, Brites C, Monteiro-Cunha JP, Santos LA, Galvão-Castro B, Alcantara LCJ (2010) Lower prevalence of human immunodeficiency virus Type 1 Brazilian subtype B found in Northeastern Brazil with slower progression to AIDS. *AIDS Res Hum Retroviruses* 26:1249–1254.
16. Monteiro-Cunha JP, Araujo AF, Santos E, Galvao-Castro B, Alcantara LC (2011) Lack of high-level resistance mutations in HIV Type 1 BF recombinant strains circulating in Northeast Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses* 27:623–631.
17. Almeida FJ, Rodrigues R, Zapparoli MS, Berezin EN, Sáfiadi MA et al. (2012) Prevalence of transmitted HIV-1 drug resistance mutations in children and adolescents in São Paulo, Brazil. *Pediatr Infect Dis J.* 31(12):e255-7.
18. Santos LA, Monteiro-Cunha JM, Araujo AF, Brites C, Galvao-Castro B, Alcantara LCJ (2011) Detection of Distinct Human Immunodeficiency Virus

Type 1 Circulating Recombinant Forms in Northeast Brazil. *J Med Virology* 83:2066–2072.

19. Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG (1997) The ClustalX windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 25:4876–4882.
20. Nicholas KB, Nicholas HBJ, Deerfield DW (1997) GeneDoc: Analysis and visualization of genetic variation. *EMB News* 14:30.
21. Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D (2012) jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods* 9(8):772.
22. Swofford D (1997) PAUP*: Phylogenetic analysis using parsimony. Version 4.0b10. Smithsonian Institution. Washington, D.C.
23. Pineda-Peña AC, Faria NR, Imbrechts S, Libin P, Abecasis AB, et al. (2013) Automated subtyping of HIV-1 genetic sequences for clinical and surveillance purposes: performance evaluation of the new REGA version 3 seven other tools. *Infect Genet Evol* 19:337-48.
24. Salminen MO, Carr JK, Burke DS, McCutchan FE (1995) Identification of breakpoints in intergenotypic recombinants of HIV type 1 by bootscanning. *AIDS Res Hum Retroviruses* 11(11):1423-1425.
25. Lengauer T, Sander O, Sierra S, Thielen A, Kaiser R (2007) Bioinformatics prediction of HIV coreceptor usage. *Nat Biotechnol* 25(12):1407-1410.
26. Gifford RJ, Liu TF, Rhee SY, Kiuchi M, Hue S, et al. (2009) The calibrated population resistance tool: standardized genotypic estimation of transmitted HIV-1 drug resistance. *Bioinformatics* 25(9): 1997-1998.
27. Johnson VA, Calvez V, Günthard HF, Paredes R, Pillay D, et al. (2013) 2013 Update of the Drug Resistance Mutations in HIV-1: March 2013. *Top Antivir Med* 21:6-14.
28. Xu L, Pozniak A, Wildfire A, Stanfield-Oakley SA, Mosier SM, et al. (2005) Emergence and Evolution of Enfuvirtide resistance following long-term therapy involves heptad repeat 2 mutations within gp41. *Antimicrob Agents Chemother* 49(3):1113-1119.
29. Almeida FJ, Berezin EN, Rodrigues R, Sáfiadi MA, Arnoni MV, et al. (2009) Diversity and prevalence of antiretroviral genotypic resistance mutations among HIV-1-infected children. *J Pediatr (Rio J)* 85:104–109.
30. da Silveira AA, Cardoso LP, Francisco RB, de Araujo Stefani MM (2009) HIV type 1 molecular epidemiology in pol and gp41 genes among naive patients from Mato Grosso do Sul State, central western Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses* 28: 304–307.
31. Sanabani SS, Pessôa R, Soares de Oliveira AC, Martinez VP, Giret MT, et al. (2013) Variability of HIV-1 genomes among children and adolescents from São Paulo, Brazil. *PLoS One* 8(5):e62552.
32. Couto-Fernandez JC, Morgado MG, Bongertz V, Taniri A, Andrade T, et al. (1999) HIV-1 subtyping in Salvador, Bahia, Brazil a city with African sociodemographic characteristics. *J Acquir Immune Defic Syndr* 22(3):288-93.

33. Brindeiro RM, Diaz RS, Sabino EC, Morgado MG, Pires IL, et al. (2003) Brazilian Network for HIV Drug Resistance Surveillance (HIV-BResNet): a survey of chronically infected individuals. *AIDS* 17(7):1063-9.
34. de Sa Filho DJ, Sanabani S, Diaz RS, Munerato P, Brunstein A, et al. (2005) Analysis of Full-Length Human Immunodeficiency Virus Type 1 Genome Reveals a Variable Spectrum of Subtypes B and F Recombinants in São Paulo, Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses* 21(2): 145-151.
35. Monteiro JP, Alcantara LCJ, de Oliveira T, Oliveira AM, Melo MA, et al. (2009) Genetic variability of Human Immunodeficiency virus-1 In Bahia State, Northeast, Brazil: High diversity of HIV genotypes. *J Med Virol* 81:391–399.
36. Moutouh L, Corbeil J, Richman D (1996) Recombination leads to the rapid emergence of HIV-1 dually resistant mutants under selective drug pressure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:6106-6111.
37. Katzenstein TL, Petersen AB, Jorgensen LB, Strand TJ, Madsen TV, Gerstoft, J (2008) Seventeen-Year-Old Mother-to Child HIV Type 1 Transmission Identified by Phylogeny and Signature Patterns (2008) *AIDS Res Hum Retroviruses* 24(8):1117-1120.
38. Salminen MO, Carr JK, Robertson DL, Hegerich P, Gotte D, et al. (1997) Evolution and probable transmission of intersubtype recombinant human immunodeficiency virus type 1 in a Zambian couple. *J Virol* 71(4):2647-55.
39. Diaz RS, Leal E, Sanabani S, Sucupira MC, Tanuri A, et al. (2008) Selective regimes and evolutionary rates of HIV-1 subtype B V3 variants in the Brazilian epidemic. *Virology* 381(2):184-193.
40. de Brito A, Komninakis SC, Novoa P, de Oliveira RM, Fonseca LA, et al. (2006) Women infected with HIV type 1 Brazilian variant, subtype B (B'-GWGR motif) have slower progression to AIDS, compared with patients infected with subtype B (B-GPGR motif). *Clin Infect Dis* 43(11):1476-1481.
41. Berger EA, Murphy PM, Farber JM (1999) Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. *Annu. Rev. Immunol* 17: 657–700.
42. Schuitemaker H, Koot M, Kootstra NA, Dercksen MW, de Goede RE, et al. (1992) Biological phenotype of human immunodeficiency virus type 1 clones at different stages of infection: progression of disease is associated with a shift from monocytotropic to T-cell-tropic virus population. *J Virol* 66(3):1354–1360.
43. McGovern RA, Thielen A, Mo T, Dong W, Woods CK, et al. (2010) Population-based V3 genotypic tropism assay: a retrospective analysis using screening samples from the A4001029 and MOTIVATE studies. *AIDS* 24: 2517–2525.
44. Ryland EG, Tang Y, Christie CD, Feeney ME (2010) Sequence evolution of HIV-1 following mother-to-child transmission. *J Virol* 84(23):12437-12444.
45. Joobs B, Fischer M, Schweizer A, Kuster H, Böni J (2007) Positive in vivo selection of the HIV-1 envelope protein gp120 occurs at surface-exposed regions. *J Infect Dis* 196(2):313-320.
46. Bennett D, Camacho RJ, Otelea D, Kuritzkes DR, Fleury H, et al. (2009) Drug resistance mutations for surveillance of transmitted HIV-1 drug-resistance: 2009 update. *PLoS One* 4(3):e4724.

47. Arruda E, Simões L, Sucupira C, Medeiros M, Arruda E, et al. (2011) Short communication: intermediate prevalence of HIV type 1 primary antiretroviral resistance in Ceará State, Northeast Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses* 27(2):153-6.
48. Ferreira JL, Rodrigues R, Lança AM, de Almeida VC, Rocha SQ, et al. (2013) Transmitted Drug Resistance among people living with HIV/AIDS at major cities of São Paulo State, Brazil. *Adv Virol* 2013:878237.
49. Haberer J, Mellins C (2009) Pediatric adherence to HIV antiretroviral therapy. *Curr HIV/AIDS Rep* 6: 194–200.
50. Delaugerre C, Chaix ML, Blanche S, Warszawski J, Cornet D, et al. (2009) Perinatal acquisition of drug-resistant HIV-1 infection mechanisms and long-term outcome. *Retrovirology* 6(85):1-13.
51. Li B, Gladden AD, Altfeld M, Kaldor JM, Cooper DA, et al. (2007) Rapid reversion of sequence polymorphisms dominates early human immunodeficiency virus type 1 evolution. *J Virol* 81(1):193-201.
52. Jain V, Sucupira MC, Bacchetti P, Hartogensis W, Diaz RS, et al. (2011) Differential persistence of transmitted HIV-1 drug resistance mutation classes. *J Infect Dis* 203:1174–81.
53. Reis MN, de Alcântara KC, Cardoso LP, Stefani MM (2014) Polymorphisms in the HIV-1 gp41 env gene, natural resistance to enfuvirtide (T-20) and pol resistance among pregnant Brazilian women. *J Med Virol* 86(1):8-17.
54. Si-Mohamed A, Piketty C, Tisserand P, LeGoff J, Weiss L, et al. (2007) Increased polymorphism in the HR-1 gp 41 env gene encoding the enfuvirtide (T-20) target in HIV-1 variants harboring multiple antiretroviral drug resistance mutations in the pol gene. *J Acquir Immune Defic Syndr* 44(1):1-5.
55. Alencar CS, Nishiya AS, Ferreira S, Giret MT, Diaz RS, Sabino EC (2010) Evaluation of Primary Resistance to HIV Entry Inhibitors among Brazilian patients failing Reverse Transcriptase/protease Inhibitors treatment reveal high prevalence of Maraviroc resistance-related mutations. *AIDS Res Hum Retroviruses* 26(12):1267-71.
56. Pessoa LS, Valadão AL, Abreu CM, Calazans AR, Martins AN, et al. (2011) Genotypic analysis of the gp41 HR1 region from HIV-1 isolates from enfuvirtide-treated and untreated patients. *J Acquir Immune Defic Syndr* 57 Suppl 3:S197-201.
57. Nóbrega I, Netto EM, Brites C (2012) Barriers to prevention of HIV type 1 mother-to-child-transmission in Bahia, Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses* 28(3):233-4.
58. Barbour JD, Hecht FM, Wrin T, Liegler TJ, Ramstead CA, et al. (2004) Persistence of primary drug resistance among recently HIV-1 infected adults. *AIDS* 18(12):1683-9.

5 CONCLUSÕES

- A predominância de cepas do subtipo B e a identificação de recombinantes do tipo BF era esperada, uma vez que estes genótipos vêm sendo descritos circulando em Salvador-BA.
- A maior frequência de mutações não-sinônimas nas sequências de *env*, quando comparado às sequências de *gag* e *pol* refletem a alta variabilidade desta região genômica.
- Verificamos uma baixa prevalência de subtipo B' (B brasileiro), o que contrasta com as últimas publicações sobre este tema.
- A alta prevalência de vírus X4 nesta população, principalmente em crianças pode, juntamente com outras variáveis, determinar um mau prognóstico para estes pacientes.
- A baixa prevalência de resistência transmitida, principalmente em crianças virgens de terapia antirretroviral, amplia a possibilidade de tratamento destes pacientes ao longo dos anos.
- A baixa prevalência de mutações associadas ao Enfuvirtida (T20 - inibidor de fusão) amplia a possibilidade de esquemas terapêuticos de resgate em casos múltiplas falhas.
- Seis pares de mães e filhos apresentaram o mesmo padrão de mutações em *pol* e/ou *env*, fato que confirma a transmissão vertical de cepas de HIV mutantes.
- Enfatizamos a necessidade de realização do teste de genotipagem em gestantes e crianças antes da introdução de terapia antirretroviral.

6 LIMITAÇÕES DO ESTUDO

Destacamos algumas limitações neste estudo:

- O número pequeno da amostra não nos permitiu realizar inferências estatísticas robustas, assim como extrapolar os resultados para a população de Salvador-Bahia;
- O não sequenciamento do genoma completo impossibilitou uma melhor caracterização e correta classificação dos recombinantes;
- Utilizamos a técnica do sequenciamento direto que só identifica cepas dominantes, deixando de detectar quasiespécies virais. Isso implica na subestimação de mutações e de algumas características genéticas virais.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os achados deste estudo, apesar das limitações, podem contribuir para uma melhor caracterização do perfil genético de cepas de HIV-1 que circulam em crianças e adolescentes soteropolitanos, infectados por via vertical. Dados sobre este tema ainda são escassos em nosso meio e estudos futuros são fundamentais para elucidar questões ainda não respondidas.

8 PERSPECTIVAS FUTURAS

Não pretendemos finalizar este estudo com a conclusão deste trabalho. Buscaremos aumentar o número de pares de mães e filhos, sobretudo as crianças virgens de terapia antirretroviral e mais jovens; coletar amostras do mesmo paciente em mais de um tempo para análises de filodinâmica; clonar as sequências virais para realizar análises evolutivas e realizar sequenciamento de genoma completo ou quase completo (NFLGs). Estes esforços serão de grande importância para melhor caracterização da diversidade genética das cepas de HIV-1 que circulam em Salvador-Bahia, podendo contribuir para o desenho de uma vacina e melhor manejo de pacientes infectados pelo vírus.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TÍTULO DO PROJETO: **EVOLUÇÃO DOS VÍRUS HIV-1 E HTLV-1 EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES COINFECTADOS EM SALVADOR-BAHIA**

Responsável: Dr. Carlos Roberto Brites Alves

Introdução - Você e/ou seu filho está sendo convidado a doar sangue para uma pesquisa. Antes de decidir fazer parte deste estudo, é necessário compreender os riscos e benefícios existentes para que você possa tomar uma decisão informada. Este procedimento é conhecido como Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Este formulário de consentimento fornece informações sobre a pesquisa que foi explicada a você. Uma vez que você compreenda o estudo e os testes que ele requer, você será solicitado a assinar este formulário caso concorde em participar desse estudo. Sua decisão em participar desse estudo é voluntária. Isto significa que você é livre para escolher se vai participar do estudo ou não.

Finalidade - O projeto “Evolução dos vírus HIV-1 e HTLV-1 em crianças e adolescentes coinfectados em Salvador-Bahia” tem o objetivo de avaliar de que maneira os vírus HIV-1 e HTLV-1 evoluem em uma criança/adolescente infectado com esses vírus, que foram transmitidos ao filho através da mãe. É importante para os pesquisadores saber as mudanças ocorridas nos vírus e como eles se comportam quando são passados de mãe para filho.

Coleta e Possíveis Riscos - Será coletado um pouco de sangue (cerca de 10 mililitros - 1 colher de sopa) através da punção de uma veia periférica, preferencialmente do braço. Há possibilidade de uma ligeira dor no momento em que o sangue é retirado e pode ocorrer um leve sangramento após a coleta, que irá parar espontaneamente em minutos.

Possíveis Benefícios - Você pode não ser beneficiado por este estudo, porém se for encontrado algo que possa beneficiá-lo, nós faremos todo o esforço para que esta informação chegue até você.

Custos e compensações - O paciente não terá nenhum custo com este estudo. Você não vai receber nenhum pagamento ou compensação por participar deste estudo.

Confidencialidade, Direito e Segurança - Nenhuma informação ao seu respeito será divulgada, as amostras serão utilizadas somente para esta pesquisa. Você tem o direito de negar-se a participar deste estudo sem qualquer perda dos seus direitos ao atendimento clínico. A Participação neste estudo é voluntária.

Perguntas - Se você tiver alguma dúvida poderá entrar em contato com o Dr Carlos Roberto Brites Alves, responsável pela pesquisa (71) 3283 8123. Se as dúvidas continuarem, você também poderá entrar em contato com o Dr. Eduardo Martins Netto, coordenador do Comitê de Pesquisa da Maternidade Climério de Oliveira (Universidade

Federal da Bahia), através do telefone (71) 3283 9275. End. Rua do Limoeiro, 137, CEP: 40.055-150 - Salvador BA.

Assinaturas

Eu declaro compreender este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido depois de ler e receber explicação em linguagem compreensível, e tive tempo suficiente para decidir participar. Concordo livremente em participar deste estudo de pesquisa. Ao assinar abaixo, vou receber uma cópia deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido assinado e datado.

Nome do paciente em letra de forma

Data

Assinatura do paciente

Nome do responsável em letra de forma

Assinatura do responsável

ASSINATURA DA TESTEMUNHA (se aplicável)

Eu, a testemunha, confirmo que acompanhei toda a explicação deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e confirmo que o sujeito da pesquisa ou responsável compreendeu o conteúdo deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido sobre o estudo, e que as perguntas dele ou de seu representante legal foram respondidas com total satisfação.

Nome da testemunha em letra de forma

Data

Assinatura da testemunha

ASSINATURA DA PESSOA QUE CONDUZIU O TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O Sujeito da Pesquisa, (ou seu representante legal) _____, compreendeu o conteúdo do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, e compreende também os riscos do estudo. As perguntas do sujeito de pesquisa e/ou as de seu representante legal foram precisamente respondidas até sua completa satisfação.

Nome em letra de forma da pessoa que conduziu o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Data

Assinatura da pessoa que conduziu o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

APÊNDICE B – Ficha para coleta de dados

FICHA PARA COLETA DE DADOS

DADOS DA CRIANÇA

Nome: _____ Data de Nascimento: ____/____/____

Sexo: Masculino Feminino

Infecção: HIV HIV+HTLV Tipo de parto: Normal Cesárea

Diagnóstico: Até o 1º ano Após 1º ano Aleitamento: Sim Não Tempo: _____

Aleitamento cruzado: Sim Não Tempo: _____

Transusão de sangue: Sim Não CV _____ CD4+ _____

AZT xarope pós nascimento: Sim Não Tempo uso: _____

Em uso de ARV: Sim Não Esquema: _____ Tempo uso: _____

Outras medicações: _____

Sintomático AIDS: Sim Não Relato de doenças: _____

Estado geral: _____

Médico: _____

Observações: _____

DADOS DA MÃE

Nome: _____ Data de Nascimento: ____/____/____

Infecção: HIV HIV+HTLV

Diagnóstico: ____/____/____ Antes gravidez Durante gravidez No parto Pós-parto

Risco: Parceiro Droga injetável Não sabe Outros: _____

Pré-natal: Sim Não AZT endovenoso no parto: Sim Não

Profilaxia: Sim Não Esquema: _____ Tempo de Uso: _____

Carga viral antes do parto _____ Data: _____

CV _____ CD4+ _____

Nº de Filhos: _____ Todos soropositivos? _____

Em uso de ARV: Sim Não Esquema: _____ Tempo uso: _____

Outras medicações: _____

Sintomático AIDS: Sim Não Relato de doenças: _____

Estado geral: _____

Médico: _____

Observações: _____

CONTATO paciente _____

Responsável pela coleta de dados: _____ DATA: ____/____/____

APÊNDICE C – Primers utilizados nas reações de PCR

REGIÃO GAG

PRIMER	SEQUÊNCIA	POSIÇÃO
GAG1F (1 ^o round)	5' GCGAGAGCGTCAGTATTAAGC 3'	796-813
H1P202R (1 ^o round)	5' CTAATACTGTATCATCTGCTCCTGT 3'	2352-2328
GAG2F (2 ^o round e seq)	5' GGGAAAAAATTCGGTTAAGGCC 3'	836-857
G17R (2 ^o round e seq)	5' TCCACATTTCCAACAGCCCTTTTT 3'	2040-2017
H1G77F (seq)	5' TCACCTAGAACTTTGAATGCATGGG 3'	1231-1255
MZ14R (seq)	5' GAACCGGTCTACATAATCTC 3'	1689-1670

REGIÃO POL

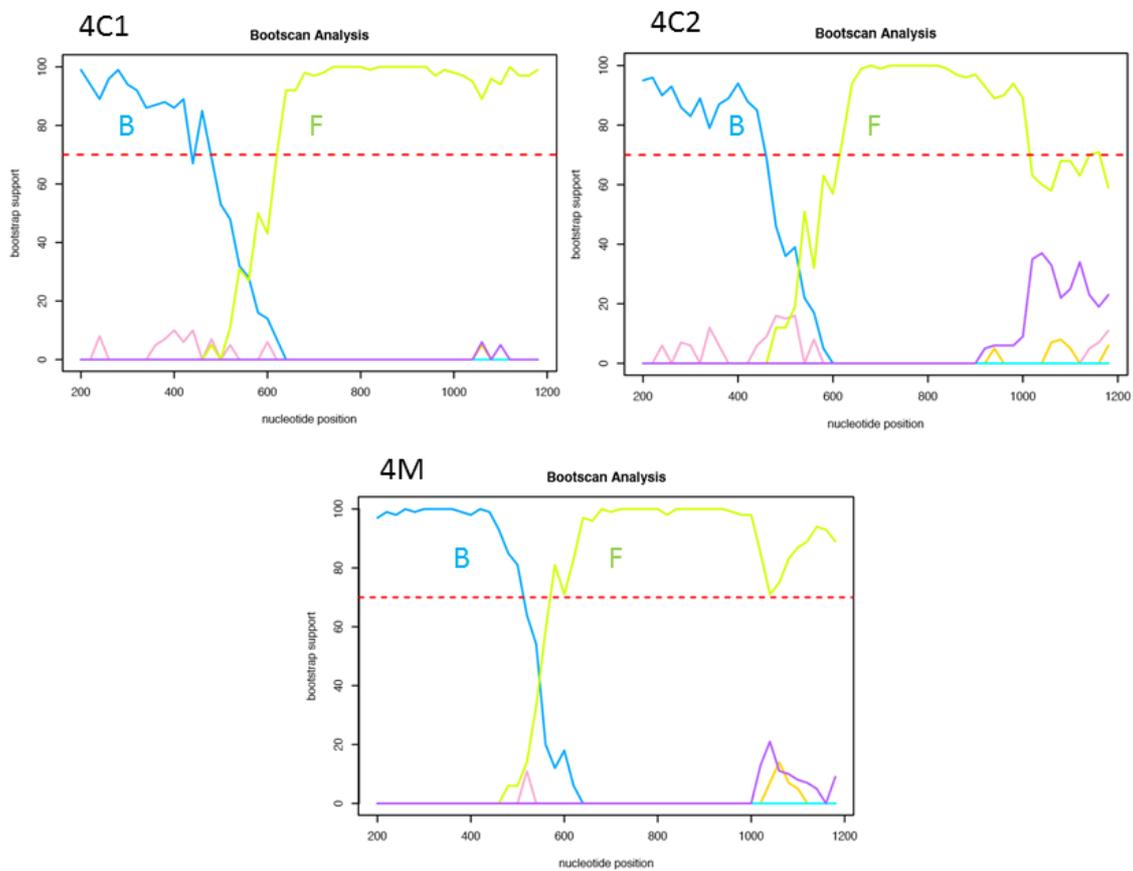
PRIMER	SEQUÊNCIA	POSIÇÃO
DP10F (1 ^o round)	5' TAACTCCCTCTCAGAAGCAGGAGCCG 3'	2198-2223
LR54R (1 ^o round)	5' TAGGCTGTACTGTCCATTTAT 3'	3279-3259
DP16F (2 ^o round e seq)	5' CCTCAAATCACTCTTTGGCAAC 3'	2253-2274
RT12R (2 ^o round e seq)	5' ATCAGGATGGAGTTCATAACCCATCC 3'	3260-3235
LR49F (seq)	5' CAATGGCCATTGACAGAAGA 3'	2836-2812
LR51R (seq)	5'TGTGG TATTCCTAATTGAACTTCCC 3'	2616-2635

REGIÃO ENV

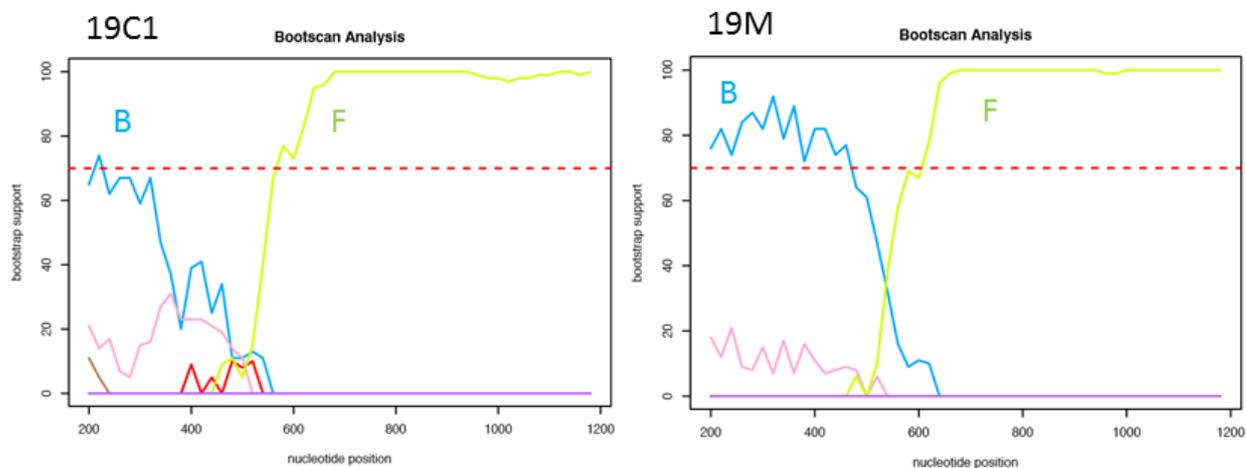
PRIMER	SEQUÊNCIA	POSIÇÃO
ED5F (1 ^o round)	5' ATGGGATCAAGCCTAAAGCCATGTG 3'	6557-6582
MM1R (1 ^o round)	5'GGTGAATATCCCTGCCTAA 3'	8365-8347
ED31F (2 ^o round e seq)	5' CCTCAGCCATTACACAGGCCTGTCCAAAG 3'	6817-6845
MM4R (2 ^o round e seq)	5'CCTCCTACTATCATTATGAA 3'	8296-8277
ES7F	5' CTGTTAAATGGCAGTCTAGC 3'	7002-7021
ED14R (seq)	5' TCTTGCCTGGAGCTGTTTGATGCCCCAGAC 3'	7961-7932

APÊNDICE D – Análise de bootscan através do programa SIMPLOT

Família 4: mãe (4M) e dois filhos (4C1 e 4C2)



Família 19: mãe (19M) e um filho (19C1)



ANEXOS

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética



PARECER/RESOLUÇÃO N.º 053/2011

Registro CEP. 048/11. (Este número, bem como o do Parecer acima, devem ser citados nas correspondências referentes a este projeto).

Título do Projeto: “Evolução dos Vírus HIV-1 e HTLV-1 em crianças e adolescentes coinfectados em Salvador-Bahia”.

Patrocínio/Financiamento: Não especificado. **Orçamento** compatível explícito, a ser custeado com recurso do “Laboratório de Pesquisa em Infectologia – LAPI”, oriundos de projetos em andamento.

Instituição Proponente, Serviços Especializados em Infectologia, Centro de Pesquisa “SEI”, Salvador – Bahia.

Pesquisador Orientador: Professor, PHD, **Carlos Roberto Brites Alves.** Pesquisadora Associada **Sara Nunes Vaz.** “Curricula Vitae” anexos, súmulas, procedentes.

Entidades: “LAPI e SEI”, esta entidade Vinculada.

Área do Conhecimento: Ciências Biológicas, 2.00, Biologia Geral, 2.01; Biossegurança, Nível Epidemiológico, Grupo III.

Objetivo(s) Geral: Avaliar a evolução das cepas de HIV-1 e HTLV-1 transmitidas verticalmente e comparar à evolução dos seus precursores no organismo dos pacientes. **Específicos:** Avaliar se as cepas virais evoluem de modo independente; Caracterizar polimorfismos genéticos associados à transmissão do HIV-1 e HTLV-1.

Resumo: Após **Introdução**, na qual são tecidas considerações sobre o HTLV-1, (identificação, origem, patogenicidade, interrelação com o HIV-1, transmissão com ênfase na verticalidade, incidência nas populações consideradas e o estudo laboratorial a ser processado); **Materiais e Métodos**, (população do Estudo e processamento investigacional); **Resultados Esperados; Cronograma; Potenciais Limitações do Estudo; Considerações Éticas, Referências Bibliográficas e Anexos** este entre os quais se fundamenta a pedra basilar desta pesquisa, a existência legal do “**Banco de Espécime Brasileiro de Câncer Viral, (BEBCV)**”. Compõem ainda, estes **Anexos**, a formalização dos compromissos do Investigador Responsável para com as disposições vigentes na espécie, as credenciais profissionais habilitadoras e o “Termo de Consentimento Livre e Esclarecido”.

Parecer: As peças constitutivas desta condensada, porém completa Proposição de Pesquisa obedecem às normas que presidem a pesquisa em Seres Humanos, *inexistindo intervenção, (procedimento)*. O presente Processo Investigatório, com seus anexos pode ser **aprovado** por este Institucional. Bem como a realização da pesquisa na **Entidade referida** sob a condução do **Pesquisador Responsável**, devendo ser observadas as disposições constantes na “Folha de Recomendações” e no “Modelo de Relatório” deste CEP, inclusos. **Projeto Aprovado.**

Salvador, 03 de Novembro de 2011.


Professor, Doutor Eduardo Martins Netto
Coordenador – CEP/MCO/UFBA

Observações importantes. Toda a documentação anexa ao Protocolo proposto e rubricada pelo (a) Pesquisador (a), arquivada neste CEP, e também a outra devolvida com a rubrica da Secretária deste (a) ao (à) mesmo (a), faz parte intrínseca deste Parecer/Resolução e nas “Recomendações Adicionais” apensas, **bem como a impostergável entrega de relatórios parciais e final como consta nesta liberação**, (Modelo de Redação para Relatório de Pesquisa, anexo).

ANEXO B – Resumo publicado em anais de congresso

Resumo apresentado em julho de 2013 no **Terceiro Congresso Brasileiro sobre HIV-AIDS e Vírus Relacionados**, sob forma de apresentação oral.

3º CONGRESSO BRASILEIRO SOBRE
HIV-AIDS E VÍRUS RELACIONADOS

11

RESUMO DOS TRABALHOS

AO-05

TÍTULO: DIVERSIDADE GENÉTICA DO VÍRUS HIV-1 NA TRANSMISSÃO MATERNO-INFANTIL EM SALVADOR-BAHIA
AUTOR(ES): SARA NUNES VAZ, LUIZ CARLOS ALCANTARA, JULIANA C. ABREU, JOANA MONTEIRO CUNHA, CARLOS BRITES
INSTITUIÇÃO: LABORATÓRIO DE PESQUISA EM INFECTOLOGIA, HUPES/UFBA; LABORATÓRIO DE HEMATOLOGIA, GENÉTICA E BIOLOGIA COMPUTACIONAL, CPOGM- FIOCRUZ/BA

INTRODUÇÃO – A transmissão perinatal do vírus HIV-1 é um complexo processo multifatorial que ainda permanece não totalmente elucidado, podendo ocorrer no útero, durante o parto e através da amamentação. Fatores virológicos e imunológicos podem influenciar diretamente a transmissão materno-infantil. O HIV-1 apresenta uma notável variabilidade genética dentre e entre indivíduos, consequência de sua elevada taxa de substituição de nucleotídeos, tamanho genômico pequeno, curta geração e alta frequência de recombinação, como parte dos mecanismos naturais de sua replicação e da seleção natural. As taxas de evolução viral entre hospedeiros são maiores no gene *env*, no entanto é possível traçar eventos de transmissão utilizando os genes *pol* e *gag*. Identificar fatores seletivos relativos às variantes virais transmitidas, sua influência na diversidade viral e recombinação no risco da transmissão de mãe para filho pode sugerir novas estratégias terapêuticas de prevenção.

OBJETIVO – Caracterizar a evolução viral do HIV-1 em pares de mães e filhos virgens de terapia antiretroviral.

MATERIAIS E MÉTODOS - Sete crianças infectadas verticalmente e suas respectivas mães foram recrutadas no ambulatório de HIV/AIDS do HUPES/UFBA, no ano de 2012. Amostras de sangue total foram coletadas, DNA proviral foi extraído, fragmentos dos genes *gag* (~1.200pb), *pol* (~1.000pb) e *env* (~1.400pb) foram amplificados individualmente através de nested-PCR, purificados e sequenciados. As sequências geradas foram alinhadas com sequências disponíveis no GenBank utilizando o Clustal X software e editadas manualmente no GENEDEC. Análises filogenéticas foram realizadas utilizando PHYLIP software para gerar árvores neighbor-joining (NJ). Mutações de resistência associadas ao gene *pol* foram identificadas através do algoritmo de interpretação de resistência genotípica (Stanford University); e do gene *env* foram analisadas manualmente no Geneious software. Análises estatísticas foram realizadas no SPSS.

RESULTADOS – Um total de 14 indivíduos foram envolvidos no estudo. A média de idade das mães foi 29 anos e dos filhos 5 anos. Seis mães (85,7%) não receberam ARV profilático e 3 (42,9%) receberam AZT endovenoso no parto. Quanto às crianças, 5 (71,4%) fizeram uso de AZT xarope e 2 (28,6%) foram amamentadas. A média da carga viral plasmática das mães foi 44.960 cópias/ml e das crianças 171.094 cópias/ml. Todos os sujeitos estavam na fase crônica da infecção e eram assintomáticos. As análises filogenéticas dos genes *gag*, *pol* e *env* mostraram que 100% das sequências se agruparam com referências do subtipo B. Na comparação das sequências de cada par, a similaridade em *pol* variou entre 97,4 e 99,7%; em *gag* 89,7 e 99,1%; em *env* 78,4 e 97,2%. A prevalência de resistência primária foi de 28%. Em 2 pares foi verificada mutações de resistência: 1 par apresentou a L10V (PI minor), E138A e V179E (NNRTI); 1 par a V90I (NRTI). Não foram encontradas mutações no envelope associadas à resistência.

CONSIDERAÇÕES FINAIS – No grupo de indivíduos estudado, verificamos uma grande similaridade entre as sequências de cada par mãe-filho. As maiores taxas de divergência foram encontradas no gene *env*, o que já era esperado, devido à grande variabilidade desta região genômica. A prevalência de mutações de resistência foi significativa e a taxa de resistência primária em crianças/adolescentes virgens de terapia é preocupante podendo refletir numa alta proporção de falha terapêutica para estes pacientes.

ANEXO C – E-mail de confirmação de envio do manuscrito à Revista Plos One



PLOS ONE (no-reply@editorialmanager.com) Adicionar aos contatos 15/05/2014 |▶
Para: saranunes02@hotmail.com ▼

Ações ▼

PONE-D-14-21768

Genetic diversity of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 following Mother-to-Child transmission
PLOS ONE

Dear Mrs VAZ,

Thank you for submitting your manuscript entitled "Genetic diversity of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 following Mother-to-Child transmission" to PLOS ONE. Your assigned manuscript number is PONE-D-14-21768.

We will now begin processing your manuscript and may contact you if we require any further information. You will receive an update once your manuscript passes our in-house technical check; you can also check the status of your manuscript by logging into your account at <http://pone.edmgr.com/>.

Please visit EveryONE (<http://blogs.plos.org/everyone>), the PLOS ONE community blog for our published authors and readers, to find out what the journal is thinking, changing and doing.

If you have any inquiries or other comments regarding this manuscript, please contact plosone@plos.org.

Thank you for your support of PLOS ONE.

Kind regards,
PLOS ONE