CARLA ANDREIA BAGGETTI FERRAZ DE LIMA

**Excreção cervicovaginal do vírus da imunodeficiência humana
(HIV) ao longo do ciclo menstrual em mulheres soropositivas
acompanhadas em serviço especializado de São Paulo.**

**Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título
de Mestre em Ciências**

**Área de concentração: Doenças Infecciosas e
Parasitárias
Orientador: Aluisio Augusto Cotrim Segurado**

SÃO PAULO

2007

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Lima, Carla Andreia Baggetti Ferraz de

Excreção cervicovaginal do vírus da imunodeficiência humana (HIV) ao longo do ciclo menstrual em mulheres soropositivas acompanhadas em serviço especializado de São Paulo / Carla Andreia Baggetti Ferraz de Lima. -- São Paulo, 2007.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias.

Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Orientador: Aluisio Augusto Cotrim Segurado.

Descritores: 1.HIV 2.Eliminação de partículas virais 3.RNA 4.DNA
5.Provirus 6.Reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa 7.Ciclo menstrual 8.Infecções por HIV

USP/FM/SBD-428/07

Dedico este trabalho...

A todas nós mulheres,
seres iluminados que
podemos ter o privilégio
de conhecer e conceber
o amor incondicional.
Paola, obrigada por ser
não só a razão, mas a
alegria de todas as
minhas existências.
Amo você sempre!

Ao meu companheiro, marido e melhor amigo, além da
personificação da paciência nos momentos mais
difíceis. Paulo, obrigada por tanto amor, compreensão
e principalmente por nossa filha.

Aos meus pais, José Augusto e Carmen Lúcia,
exemplo de integridade, dedicação e
profissionalismo. Obrigada por sempre acreditarem
em mim, mesmo quando eu mesma já não o fazia. Se
os filhos escolhem os pais, tenham certeza que já
nasci várias vezes e nasceria milhões de outras
sempre com vocês. Vocês são tudo que posso almejar
ser em minha vida, meus heróis!

Aos meus irmãos Carlos e Manuela, Carlim e Biscoita,

Meus avós Carlos (in memorian) e Maria Luíza; e Augustinho e Astrogilda (in memorian),

Aos meus tios Manuel, Carlos, Sônia, Mônica, Bárbara e Vera,

Às minhas amigas Mércia, Sandra, Érica e Daniela, *no matter what*, fecho os olhos e acompanho vocês.

Obrigada a todos por fazerem parte do que eu sou hoje, sempre me apoiando, me escutando e me dando carinho. Obrigada também por me deixar amá-los, fazendo de mim uma pessoa mais feliz.

AGRADECIMENTOS

A Deus,

Ao professor e, com muito orgulho, meu orientador Dr. Aluísio Augusto Cotrim Segurado, por ter confiado em mim a realização desta dissertação, pelos momentos de calma e brilhantismo mesmo nas situações difíceis, como prazos ou quando eu estava perdida e pela amizade de uma pessoa de caráter e capacidade indiscutíveis.

Ao professor e chefe do laboratório de Virologia Dr. Cláudio Sergio Pannuti por ser um pai e exemplo para todos nós agregados do laboratório. Obrigada pelas oportunidades.

Ao Dr. José Eduardo Levi, pela orientação no início da minha vida acadêmica e por ter acreditado em mim, abrindo as portas do mercado de trabalho.

À Lucy Vilas Boas por ter sido minha amiga, mãe e confidente durante todo o período que estive no Instituto de Medicina Tropical. Agradeço imensamente por tudo que já fez por mim,

Aos meus amigos Anderson, José de Paula, Maria Carolina, Daniela de Souza, Adriana Machado e Ana Carolina, por tantos momentos de alegria na nossa convivência durante todos esses anos.

Agradeço especialmente a Ana Carolina, Daniela e Keli Mello, por serem além de amigas, colaboradoras para a realização desta dissertação.

Às amigas que por muitas vezes são as co-orientadoras de todos os pós-graduandos: Maria Cristina Fink, Laura Sumita e Cíntia Canto.

A todos os amigos e colegas do Instituto de Medicina Tropical da USP, por terem feito do laboratório a minha segunda casa. **Adriana Tateno, Junior, Daniel, Débora Alves, Dra. Clarisse, Dra. Daisy, Dr. Luís Vicente, Dra. Vanda, Eduardo, Jaila, Jussara, Luciano, Maria, Marli, Michela, Nadily, Sílvia, Sônia, Synara, Rodrigo Melin, Tânia, Vera e Wilton.** Além de vários aprimorandos, residentes e estagiários que se tornaram também amigos durante o tempo que ficaram no laboratório.

À minha nova casa e família Eppendorf do Brasil: Josely, Carlos, Ana Paula, Luciana, Ulisses, Fátima e Carla, pela ótima receptividade e convivência, além de me apoiarem para a conclusão desse estudo.

Aos pesquisadores Lourens Zaneveld, Deborah J. Anderson e Iara Moreno Linhares, respectivamente, da Rush University, Harvard Medical School e da disciplina de Ginecologia da FMUSP, pela colaboração na concepção e realização desta pesquisa.

Aos professores Cláudio Sérgio Pannuti, João Renato Rebello Pinho e Eliana Gutierrez pelas valiosas sugestões apresentadas no Exame de Qualificação.

À equipe técnica do laboratório SAE pela valiosa colaboração na realização da pesquisa de contaminação espermática das amostras de LCV por meio do ensaio imunoenzimático para detecção do antígeno prostático específico PSA.

À Dra. Ester Sabino e o pesquisador Walter, do Laboratório de Biologia Molecular do Hemocentro do Hospital das Clínicas, pela também valiosa colaboração na realização da quantificação de DNA proviral de HIV nas amostras de lavados cervicovaginais, utilizando-se técnica de PCR em tempo real.

Às secretarias Roseli Antônia Santo, Rosemeire Aparecida Morais Ribeiro e Vânia Miguel, por sempre se mostrarem prontas a nos ajudar, não esquecendo a palavra amiga.

À Roche Diagnóstica, pelo apoio recebido, por meio da doação de kits comerciais para realização da pesquisa de RNA-HIV nos lavados cervicovaginais.

À Fundação Fogarty e ao Programa CONRAD, dos Estados Unidos da América pela subvenção financeira do projeto de pesquisa sobre fatores associados à excreção genital do HIV, do qual se originou o protocolo desta dissertação.

À FAPESP pela concessão de bolsa de mestrado (processo 04/11562-0).

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE QUADROS

RESUMO

SUMMARY

INTRODUÇÃO	1
1. HIV / aids.....	2
2. Pesquisa do HIV no trato genital feminino.....	5
3. Fatores associados à excreção cervicovaginal do HIV.....	7
3.1 Viremia plasmática, excreção genital e TAR.....	7
3.2 Compartimentalização viral.....	8
3.3 HIV no trato genital e co-infecções.....	9
3.4 Excreção do HIV no trato genital e o ciclo menstrual.....	10
 JUSTIFICATIVA	 16
 OBJETIVOS	 18
 PACIENTES E MÉTODOS	
1.Seleção da casuística.....	20
1.1 Critérios de inclusão.....	20
1.2 Critérios de exclusão.....	20
2.Procedimentos do estudo.....	21
2.1 Material.....	21

2.2 Coleta e processamento inicial das amostras biológicas.....	22
2.3 Avaliação da qualidade as amostras e da presença de contaminação espermática.....	26
2.4. Extração de DNA a partir das amostras de LCV.....	28
2.5. Avaliação da qualidade do material biológico estocado.....	28
2.5.1. Espectrofotometria.....	28
2.5.2. PCR CCR5.....	29
2.6. Avaliação de contaminação espermática do LCV.....	30
2.6.1. PSA.....	31
2.6.2. PCR para o gene SRY.....	31
2.7. Etapas da investigação laboratorial do HIV no LCV.....	33
2.8. Amplificação quantitativa de seqüências genômicas de HIV-RNA.....	34
2.9. Avaliação do número de células contido no botão celular do LCV.....	35
2.10. Avaliação quantitativa do DNA proviral de HIV.....	37
3. Análise dos resultados.....	39
4. Aspectos éticos.....	39

RESULTADOS

1. Avaliação de qualidade do material biológico.....	42
1.1. Espectrofotometria para presença de DNA.....	42
1.2. PCR para o gene CCR5.....	43
2. Avaliação de contaminação espermática do LCV.....	44
2.1. Teste imunoenzimático PSA.....	44
2.2. PCR para o gene SRY.....	44
3. Caracterização da população estudada.....	46
4. Amplificação quantitativa de seqüências genômicas de HIV livre.....	50
5. Quantificação do número de células contido em amostras de LCV.....	53
6. Avaliação quantitativa de seqüências genômicas provirais de HIV.....	55
7. Avaliação conjunta da excreção genital do HIV.....	60

DISCUSSÃO	63

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72

ANEXOS

Anexo 1 – Termo de Consentimento

Anexo 2 - Aprovação Cappesq

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Alterações hormonais e sua repercussão sobre o endométrio durante o ciclo menstrual.....	12
Figura 2 - Avaliação de qualidade das amostras e da presença de contaminação espermática em alíquotas de lavados cervicovaginais.....	27
Figura 3 - Investigação laboratorial para pesquisa de HIV no LCV.....	33
Figura 4 - Revelação em gel de agarose do fragmento amplificado de 188pb do gene de CCR5 em amostras de LCV de pacientes infectadas pelo HIV – HC-FMUSP, 2000.....	43
Figura 5 - Revelação em gel de agarose do fragmento amplificado de 229pb do gene de SRY em amostras de LCV de pacientes infectadas pelo HIV – HC-FMUSP, 2000.....	45
Figura 6 - Concentrações séricas de estradiol durante um ciclo menstrual em 16 pacientes infectadas por HIV. HC – FMUSP, 2000.....	48
Figura 7. Concentrações séricas progesterona durante um ciclo menstrual em 16 pacientes infectadas por HIV. HC – FMUSP, 2000.....	49
Figura 8 - Curva padrão da PCR em tempo real para o gene da beta-globina em amostras de LCV de 16 pacientes infectadas por HIV. HC – FMUSP, 2000.....	54

Figura 9 - Curva de amplificação do gene da beta-globina por PCR em tempo real em amostras de LCV de 16 pacientes infectadas por HIV. HC – FMUSP, 2000.....54

Figura 10 - Curva de dissociação da PCR em tempo real para amplificação do gene da beta-globina em amostras de LCV de 16 pacientes infectadas por HIV. HC – FMUSP, 2000.....55

Figura 11 - Curva padrão da PCR em tempo real para o DNA-HIV em amostras de LCV de 16 pacientes infectadas por HIV. HC – FMUSP, 2000.....56

Figura 12 - Curva de amplificação da PCR em tempo real para o DNA-HIV em amostras de LCV de 16 pacientes infectadas por HIV. HC – FMUSP, 2000.....56

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Caracterização da população estudada de 16 pacientes infectadas por HIV. HC – FMUSP, 2000.....	46
TABELA 2 - Patógenos genitais detectados em amostras de 6 pacientes infectadas por HIV. HC – FMUSP, 2000.....	50
TABELA 3 - Excreção genital do RNA-HIV livre durante o ciclo menstrual de 16 pacientes infectadas por HIV. HC – FMUSP, 2000.....	52
TABELA 4 - Excreção genital do DNA proviral do HIV o ciclo menstrual de 16 pacientes infectadas por HIV. HC – FMUSP, 2000.....	57
TABELA 5 - Excreção genital do DNA-HIV em 6 pacientes soropositivas que exibiram co-infecção genital. HC – FMUSP, 2000.....	59
TABELA 6 - Excreção genital do HIV durante o ciclo menstrual de 16 pacientes infectadas por HIV. HC – FMUSP, 2000.....	61

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Síntese de dados da literatura sobre variações da excreção genital de HIV durante o ciclo menstrual.....13

Quadro 2 - Alíquotas obtidas durante o processamento de lavados cervicovaginais das pacientes admitidas no estudo, segundo a finalidade de investigação.....25

Lima, CABF. *Excreção cervicovaginal do vírus da imunodeficiência humana (HIV) ao longo do ciclo menstrual em mulheres soropositivas acompanhadas em serviço especializado de São Paulo* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2007. 101p.

A via sexual é a principal forma de transmissão inter-humana da infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV). Com o incremento do número de mulheres infectadas por esse agente retroviral, o estudo de particularidades da biologia do vírus no trato genital feminino adquiriu maior importância. Com o objetivo de avaliar a excreção genital do HIV ao longo do ciclo menstrual, coletaram-se, nas diversas fases de dois ciclos, lavados cervicovaginais de 17 mulheres soropositivas para essa infecção e acompanhadas em serviço ambulatorial especializado de São Paulo. O RNA viral livre foi quantificado por RT-PCR e o DNA proviral por PCR em tempo real, empregando sistema TaqMan. Avaliou-se ainda a carga viral plasmática de HIV, o número de células CD4+ periféricas e presença de co-infecção genital. Detectou-se excreção de RNA-HIV e de DNA proviral, respectivamente, em 18,8% e 31,3% das pacientes. Todas as pacientes que apresentaram excreção de RNA viral também exibiram a de DNA proviral, incluindo paciente com viremia de HIV indetectável. Não houve variação significativa da excreção genital do vírus durante o ciclo menstrual. Em 6 dessas pacientes, que apresentaram co-infecção genital previamente à admissão no estudo, avaliou-se também a excreção genital de HIV quando da co-infecção. Em 2 casos, a excreção genital do DNA-HIV foi superior na vigência de co-infecção causada por *Streptococcus sp* e *Ureaplasma*. Não se observou excreção de RNA viral livre nas pacientes co-infectadas. Os resultados obtidos podem contribuir para o entendimento do potencial de transmissibilidade sexual da infecção por HIV e reiteram a necessidade de adesão às práticas de sexo protegido para evitar sua transmissão inter-humana.

Descritores: 1.HIV   2.eliminação de partículas virais   3.RNA   4.DNA
5.provírus   6.reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa
7.ciclo menstrual   8.infecções por HIV

Lima, CABF. *Human immunodeficiency virus (HIV) cervicovaginal shedding during the menstrual cycle in seropositive women followed at a specialized care center in São Paulo*[dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2007. 101 p.
ABSTRACT

The sexual route is the main means of transmission of the human immunodeficiency virus (HIV). With the increasing numbers of HIV-infected women, the investigation of particular biological features of HIV infection in the genital tract has become more important. To evaluate HIV genital shedding during the menstrual cycle, we collected cervicovaginal lavages (CVL) from 17 women, assisted at an HIV outpatient clinic in São Paulo, in different hormonal phases during 2 cycles. HIV-RNA and proviral DNA shedding were quantified using RT-PCR and a TaqMan real-time PCR assay, respectively. In addition, patients were screened for genital coinfections and had their HIV plasma viral loads and CD4+ cell counts assessed. Cell-free HIV-RNA and proviral DNA shedding were found in 18.8% and 31.3% of women. All patients who shed HIV-RNA were also shown to present detectable proviral DNA in their CVL, including one woman with undetectable HIV plasma viral load. No significant difference in viral shedding was seen among menstrual cycle phases. Six patients from the cohort, who exhibited genital coinfections previous to admission to the study, had their HIV genital shedding compared at time of coinfection and after its resolution. In two of them proviral DNA shedding was higher at the time of coinfection, caused by *Streptococcus sp* and *Ureaplasma*. No cell-free HIV-RNA shedding was detected in coinfecting patients. Our results may contribute to the understanding of HIV sexual infectivity from women and emphasize the need for adherence to protected sexual practices in order to avoid viral transmission.

Descriptors: 1. HIV   2.viral shedding   3.RNA   4.DNA
5.provirus   6. reverse transcription polymerase chain reaction
7. menstrual cycle   8.HIV infections

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

1. HIV / aids

O vírus da imunodeficiência humana (HIV) é um retrovírus do gênero lentivírus que infecta preferencialmente linfócitos e células apresentadoras de antígeno da linhagem macrofágica, que exibem o marcador celular de superfície CD4. Ao longo da história natural de sua infecção, observa-se no hospedeiro lenta e progressiva redução do número de células CD4+ no sangue periférico, que se traduz clínica e laboratorialmente por um estado de imunodeficiência grave (aids), determinante de infecções oportunistas e tumores, responsáveis pelas altas taxas de morbidade e letalidade associadas à doença. A transmissão inter-humana do HIV pode se dar por via horizontal, através do contato sexual ou parenteral com sangue contaminado ou por via vertical da mãe infectada a seu filho, durante a gestação ou pelo aleitamento materno (Levy, 1998).

A infecção pelo HIV constitui um dos mais importantes problemas de saúde pública da atualidade, segundo dados obtidos da Organização Mundial de Saúde. Estima-se que em todo o mundo mais de 25 milhões de pessoas faleceram em consequência à síndrome da imunodeficiência adquirida (aids) desde o reconhecimento dessa doença em 1981. Só em 2006 foram estimados

2,9 milhões de óbitos. Admite-se que ao longo desse mesmo ano 4,3 milhões de pessoas tenham contraído o HIV, elevando a estimativa mundial para 39,5 milhões de pessoas vivendo com HIV. Deste total, 17,7 milhões são mulheres e apenas 1,3 milhões de pessoas têm acesso ao tratamento com anti-retrovirais, sendo que 170.000 destas estão no Brasil (Ministério da Saúde, 2006; Unids, 2006).

Recentemente têm-se verificado em diferentes regiões do mundo, acometidas pela pandemia de infecção pelo HIV/aids, alterações nos padrões epidemiológicos da doença, com mudanças significativas na contribuição percentual dos diferentes modos de exposição ao HIV entre os casos diagnosticados. Assim, por exemplo, no início da epidemia no Brasil, registraram-se em 1986 1.076 casos de aids em indivíduos maiores de 12 anos de idade, sendo 813 (75,6% do total) por transmissão sexual. Destes 542 (50,4%) referiram prática homossexual exclusiva e apenas 22 (2%) relataram a prática heterossexual exclusiva. Ao contrário, dados mais recentes, exemplificados pelos do ano de 2005, demonstram um total de 19.511 casos de aids em indivíduos da mesma faixa etária, sendo 15.692 (80,4%) por transmissão sexual, com 12.371 (63,4%) referindo prática exclusivamente heterossexual. A região Sudeste concentra 52% dos casos notificados no Brasil, embora no tocante à incidência, venha-se observando maior participação de outras regiões brasileiras, em particular a região Sul (Ministério da Saúde, 2006).

Tais estatísticas destacam a importância crescente do comportamento heterossexual no contexto da epidemia de HIV/aids entre nós, fato este também salientado em outros países. Pode-se estimar essa modalidade de exposição como responsável por 75% das infecções por HIV em todo o mundo (Unaid, 2006).

O maior risco de transmissão sexual a partir de parceiros com estágios mais avançados da infecção por HIV é atribuído a maior concentração de partículas virais livres e de células infectadas em fluidos biológicos desses indivíduos (Coombs et al., 2003).

Considerando-se que a rotura de preservativos durante o coito vaginal ocorre muito infreqüentemente (estimada em 1%), deve-se admitir que a maior parte dos casos de transmissão heterossexual se dê pela não adesão às práticas de sexo seguro entre casais de parceiros sorodiscordantes (Chan-Chee et al, 1991). De fato, o preservativo masculino reduz o risco da transmissão de HIV com eficácia de 80-90% e o único método de proteção de barreira física ao lado deste é o preservativo feminino, oferecendo também uma proteção eficaz. Entretanto, deve-se lembrar que o atual provimento desses insumos de prevenção encontra-se muito aquém do necessário. Segundo o Fundo de População das Nações Unidas (UNFPA), a atual distribuição mundial de preservativos atende a menos da metade da demanda real (Mantell et al., 2006; Unaid, 2006).

Devem-se ainda destacar as crescentes taxas de infecção por HIV, observadas na população feminina. De fato, os dados enfatizam que se no início da epidemia a relação entre homens e mulheres com aids no Brasil era de 30 para 1, ela hoje corresponde a 1,4 para 1. Desse modo é imperioso analisar com maior critério e profundidade os mecanismos envolvidos na transmissão desse agente a partir de mulheres soropositivas. A presença e quantidade de HIV em secreções cervicovaginais e os fatores que possam influenciá-los são provavelmente determinantes importantes dessa forma de transmissão (Ministério da Saúde, 2006). Um melhor conhecimento acerca da excreção do HIV a partir do trato genital feminino, com base nas técnicas de detecção viral hoje disponíveis, pode contribuir para aprimorar as estratégias de prevenção da transmissão da infecção pelo HIV.

2. Pesquisa do HIV no trato genital feminino

Utilizando-se metodologia para estudo quantitativo ou qualitativo do HIV em trato genital feminino, pode-se avaliar o RNA viral livre, o RNA viral inserido na célula infectada e o DNA proviral associado à célula a partir de diferentes técnicas de coleta. As coletas podem ser feitas por meio da utilização de *Sno-strips*, por *swab* ou empregando citoescovação, por aspirado cervical direto ou ainda, executando-se lavado cervicovaginal com soluções salinas (LCV). Todas as técnicas possuem vantagens e desvantagens. O *Sno-strip* é uma fita

absorvente que possui como vantagem coletar secreção de uma parte específica do trato genital (amostra cervical ou vaginal, por exemplo), num volume definido de 8uL, sem agredir a superfície epitelial. Porém, possui a desvantagem de coletar um volume pequeno e, dado que o material absorvido consiste na porção acelular das secreções, seu emprego permite apenas avaliar a excreção do RNA das partículas virais livres. No caso dos *swabs* ou da citoescovação, analogamente ao mencionado em relação às fitas absorventes, tem-se a vantagem de permitir adquirir material de uma porção específica do trato genital. Além disso, permitem coletar tanto o HIV associado a células quanto o vírus livre. Porém, o volume de secreção coletado é impreciso e, por serem técnicas potencialmente agressivas à mucosa, podem causar contaminação da amostra com sangue. O aspirado direto pode também ser dirigido a um local específico do trato genital, porém geralmente resulta em coleta de um volume bastante limitado de secreções e trata-se de procedimento tecnicamente mais complexo do que os anteriores. Finalmente, o lavado cervicovaginal possui como vantagem a coleta de um volume maior de fluido contendo as secreções genitais. Esse pode ser facilmente fracionado em porção celular e sobrenadante, permitindo a detecção de material genético viral tanto de partículas livres como de vírus associados a células. Além disso, possui a vantagem de não agredir a mucosa e de ser executado de maneira relativamente simples. Entretanto, não se pode precisar a origem das secreções coletadas (cervix uterino ou vagina) e devido à inoculação de solução salina para sua execução, haverá invariavelmente diluição da amostra, a ser

contabilizada na análise quantitativa do RNA viral livre (Andréoletti et al., 2003; Coombs et al., 2001; Coombs et al., 2003; Coombs et al., 2005; John et al., 2001; Spinillo et al., 1999; Webber et al., 2001).

3. Fatores associados à excreção cervicovaginal do HIV

A excreção genital do HIV pode ter diversos fatores associados ao seu incremento ou redução entre as mulheres portadoras da infecção. Dentre esses fatores, serão destacados mais detalhadamente a viremia plasmática e o tratamento com anti-retroviral (TAR), o fenômeno da compartimentalização, a presença de co-infecção genital e as variações hormonais do ciclo menstrual.

3.1. Viremia plasmática, excreção genital e TAR

Vários estudos têm sido conduzidos visando correlacionar o potencial de excreção genital com a viremia plasmática de HIV e o uso de terapia anti-retroviral (TAR). Na maioria desses, verificou-se uma forte correlação positiva entre carga viral plasmática e os níveis de excreção do HIV no trato genital feminino. Além disso, pode-se observar queda na excreção do vírus com o uso de TAR, o que pode ser dependente da forte ação supressora sobre a replicação viral exibida pelos esquemas terapêuticos combinados de alta potência (HAART). Entretanto, deve-se destacar que na maioria dessas

avaliações foi possível identificar excreção genital, mesmo em mulheres com viremia indetectável no plasma (Coombs et al., 2001; Garcia-Bujalance et al., 2004; Mostad et al., 1998; Natividad-Villanueva et al., 2003; Reichelderfer et al., 2000; Saracino et al., 2000; Spinillo et al., 2006; Vettore et al., 2005).

3.2. Compartimentalização viral

A compartimentalização viral é definida como a heterogeneidade genética dos isolados de HIV encontrados em diferentes territórios orgânicos, correspondentes às sub-populações virais em um mesmo indivíduo. Vários mecanismos e fatores podem contribuir para esse fenômeno. Durante a infecção primária, o HIV coloniza diversos órgãos e divide-se em populações virais distintas, adaptando-se às pressões seletivas provenientes do sistema imunológico do hospedeiro. Além dessas, ocorre também alta taxa de mutação viral, resultante fundamentalmente de erros de transcrição observados na replicação viral, que podem ampliar o grau de divergência genética entre as subpopulações. O uso de drogas anti-retrovirais, por sua vez, também pode resultar em evoluções divergentes do vírus desde que haja falha de adesão ao tratamento ou ainda por distúrbio farmacológico desigual em diferentes territórios orgânicos. Portanto, geram-se populações virais compartimentalizadas, com eventuais características fenotípicas diferentes, como o tropismo celular, resistência a drogas e patogênese viral (Andreoletti et

al., 2003; Andreoletti et al., 2007; Chomont et al., 2007; Fiore et al., 2002; Philpott et al., 2005; Zárate et al., 2007).

Várias pesquisas confirmam a existência de compartimentalização no âmbito do trato genital. Nunnari et al. (2005), demonstraram em seu estudo que, apesar de sua intensa ação inibidora da replicação viral, a terapia anti-retroviral de alta potência (HAART) não leva ao clareamento da infecção. Ao contrário, o ambiente cervicovaginal pode continuar como reservatório da infecção. Fiore et al. (2003), observaram que mesmo em mulheres com carga viral plasmática indetectável, pode-se encontrar excreção genital do vírus, apesar do tratamento anti-retroviral. Os resultados indicaram ainda que o cenário virológico sanguíneo e genital representam compartimentos virais diferentes, que podem por vezes conter variantes virais genotipicamente distintas. Com isso, apesar de ser possível reduzir-se a viremia plasmática do HIV a níveis indetectáveis no tratamento com HAART, é importante garantir a continuidade das práticas de sexo protegido (Martinez et al., 2006; Tuomala et al., 2003).

3.3. HIV no trato genital e co-infecções

Alguns autores sugerem uma associação da intensidade da excreção genital de HIV e a ocorrência de infecções concomitantes do trato genital, tais como a vaginose bacteriana, a candidíase, a infecção por citomegalovírus (CMV), pelo vírus da hepatite C, pelo papilomavírus humano (HPV), pelo herpes

vírus (HSV) (Al-Harthi et al., 2001; Coombs et al., 2003; Garcia-Bujalance et al., 2004; Ghanem et al., 2005; Lurain et al., 2004 ; Nowick et al., 2005; Sha et al., 2005; Spinillo et al., 2005; Stover et al., 2003; Strick et al., 2006; Watts et al., 2005). Na revisão de Coombs et al. (2003), foi observado que organismos associados às vaginoses bacterianas, como *Mycoplasma*, *Gardnerella* e *Peptostreptococcus*, parecem estar associados a um fator de indução do HIV (HIF), que aumenta a expressão do genoma viral. Coombs observou também que, no caso de co-infecção por *Chlamydia trachomatis*, após o tratamento para esta, verificou-se redução da excreção de HIV livre, mas não do provírus associado a células. Sha et al. (2005) também encontraram aumento da excreção genital do HIV na vigência de co-infecção por *Gardnerella* e *Mycoplasma*. No estudo de Mc Clelland et al. em 2005, foi demonstrado que não só co-infecções aumentam a excreção genital do HIV, como também o contrário pode ocorrer. Em estudo retrospectivo demonstraram que a presença do HIV no trato genital feminino incrementa o potencial de transmissibilidade de agentes microbiológicos causadores de outras doenças sexualmente transmissíveis (DSTs).

3.4. Excreção do HIV no trato genital e o ciclo menstrual

Especula-se que as variações na capacidade de excreção genital de HIV possam também ser influenciadas pelo ciclo menstrual. Para melhor

compreensão desse aspecto, descrevem-se a seguir, de forma sucinta, as alterações fisiológicas verificadas durante o ciclo menstrual.

A secreção vaginal nas mulheres é dependente de ações hormonais presentes durante o ciclo menstrual, o qual é composto por três fases: fase menstrual, fase folicular (proliferativa ou estrogênica) e fase lútea (secretora ou progesterônica). A Figura 1 sintetiza as alterações observadas nas concentrações séricas de hormônios hipofisários e ovarianos, bem como sua repercussão sobre a membrana endometrial. A fase menstrual é caracterizada pela descamação da camada funcional do endométrio. Dessa forma o fluxo menstrual é constituído por sangue, epitélio e estroma parcialmente desintegrado e secreções das glândulas endometriais. Essa fase é ocasionada pela redução das concentrações plasmáticas de estrógenos e progesterona no final do ciclo ovariano. A fase folicular é caracterizada pela reepitelização do endométrio e restabelecimento das glândulas. Essa fase é controlada pela secreção de estrógenos pelos ovários. A fase lútea ocorre poucos dias após a ovulação, quando o corpo lúteo é formado e começa a secretar progesterona. Nessa fase a teca interna continua a secretar estrógeno e a ação combinada destes dois hormônios produz as alterações secretórias do endométrio. Durante os últimos dias dessa fase são encontradas quantidades crescentes de linfócitos no estroma entre as glândulas (Gartner, 2002; Snell 1985).

Figura 1. Alterações hormonais e sua repercussão sobre o endométrio durante o ciclo menstrual.

Em relação à excreção genital de HIV, segundo relatos de diversos autores, variações quantitativas de sua intensidade ao longo do ciclo menstrual têm sido observadas, porém de modo inconstante (Al-Harthi et al., 2001; Benki et al., 2004; Ghanem et al., 2005; Goulston et al., 1996; Money et al., 2003; Mostad et al., 1998; Reichelderfer et al., 2000; Villanueva et al., 2002;). Diferenças metodológicas na seleção dos casos estudados em diferentes avaliações ou nas técnicas de coleta e análise das amostras biológicas podem justificar as discrepâncias de resultados observados. O quadro 1 resume dados

da literatura, que descrevem possíveis alterações da excreção genital de HIV ao longo do ciclo menstrual.

nº de pacientes estudados	Tempo de avaliação (nº de ciclos)	Material biológico	Forma de detecção de HIV	Conclusões	Referência
6	2	LCV	PCR	-	Goulston, 1996
17	1	Esfregaços endocervicais e vaginais	PCR	-	Mostad, 1998
25	Dias 7, 14 e 21	LCV	PCR	-	Villanueva, 2002
871	1		Contagem de leucócitos	-	Ghanem, 2005
55	2	LCV, <i>Sno-strips</i> e esfregaços endocervicais	Nasba e PCR	< Folicular > Lútea	Reichelderfer, 2000
55	2	LCV	PCR	> Menstrual	Al-Harhi, 2001
14	2	LCV	PCR	< Peri-ovulação	Money, 2003
17	1	Esfregaços endocervicais e vaginais	Gen-Probe	> Lútea à Menstrual	Benki, 2004

Quadro 1. Síntese de dados da literatura sobre variações da excreção genital de HIV durante o ciclo menstrual.

Assim, Villanueva et al. (2002), avaliaram amostras de LCV de 25 mulheres HIV-positivas durante um ciclo menstrual, nos dias 7, 14 e 21. A amplificação viral foi realizada pelo método da reação em cadeia por polimerase (PCR). Esse estudo confirmou a associação da carga viral plasmática à

concentração de RNA de HIV no trato genital, mas não verificou influência do ciclo menstrual sobre tais concentrações em LCV.

Já em 2003, COOMBS et al. em seu artigo de revisão concluíram que a excreção viral no trato genital feminino é menor durante a fase folicular e aumenta durante a estimulação de progesterona na fase lútea. Atribuíram tais diferenças ao fato do estrógeno induzir a proliferação do epitélio, aumentando a barreira física à excreção do HIV durante a fase folicular, enquanto na fase lútea, sob ação da progesterona essa barreira diminuiria.

JUSTIFICATIVA

JUSTIFICATIVA

O interesse em se determinar a variação da intensidade de excreção genital do HIV ao longo do ciclo menstrual prende-se a seu potencial impacto na formulação de estratégias preventivas da transmissão heterossexual do HIV, assim como no desenvolvimento de vacinas de administração pela mucosa e na implementação rotineira de intervenções médicas como a prescrição de contracepção hormonal para mulheres que vivem com HIV. Ao lado disso, no Brasil esse tipo de avaliação em amostras obtidas do trato genital feminino de pacientes infectadas é ainda escasso (Segurado et al., 1999; Vettore et al., 2005). A partir desse tipo de avaliação, poder-se-ia obter uma idéia mais abrangente do potencial de excreção genital do vírus em mulheres que vivem com HIV, uma vez que tanto o RNA viral livre como o DNA proviral integrado em células-alvo da infecção são passíveis de transmissão sexual. Com base nesse racional, concebeu-se o presente estudo, realizado no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

- Objetivo geral: Avaliar a excreção genital de HIV ao longo do ciclo menstrual de uma amostra de pacientes acompanhadas em serviço ambulatorial de referência do município de São Paulo.

- Objetivos específicos

1. Avaliar quantitativamente a excreção genital de RNA viral livre;
2. Avaliar quantitativamente a excreção genital de DNA proviral do HIV;
3. Comparar a intensidade da excreção genital de HIV na vigência ou não de co-infecção.

PACIENTES E MÉTODOS

PACIENTES E MÉTODOS

1. Seleção da casuística

1.1. Critérios de inclusão

Foram consideradas elegíveis para o presente estudo:

- Mulheres soropositivas para infecção pelo HIV-1, de 18 a 45 anos de idade, em condições clínicas que permitissem o acompanhamento clínico e ginecológico ambulatorial (avaliado pelo médico responsável pelo seguimento clínico), independentemente de estarem ou não em tratamento anti-retroviral.

- As pacientes elegíveis foram convidadas a participar do estudo, tendo sido solicitadas a registrar em calendário a data de sua menstruação em dois ciclos menstruais consecutivos.

1.2. Critérios de exclusão

Foram excluídas do estudo as pacientes:

- gestantes

- aquelas cujo registro em calendário indicou ciclos menstruais irregulares
- que relataram relação sexual vaginal nos 4 dias prévios à realização do lavado cervicovaginal (LCV) ou
- que informaram utilização de duchas vaginais ou qualquer terapêutica tópica vaginal nos 2 dias prévios ao LCV
- que apresentaram colpocitologia oncótica com resultado alterado nos 3 meses precedentes à coleta de LCV
- em uso de dispositivo intra-uterino (DIU) e
- em uso de contraceptivos orais.

2. Procedimentos do estudo

2.1. Material

Neste trabalho foram utilizadas amostras biológicas de dezessete pacientes soropositivas para infecção por HIV acompanhadas no Serviço de Extensão ao Atendimento de Pacientes HIV/aids da Divisão de Clínica de

Moléstias Infecciosas e Parasitárias do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP (Casa da AIDS). A soropositividade para infecção por HIV foi definida com base em algoritmo diagnóstico recomendado pelo Ministério da Saúde, que inclui teste imunoenzimático de triagem e confirmação da positividade por técnica de Western Blot. Tais amostras haviam sido coletadas de abril a novembro de 2000, após seleção de pacientes para estudo mais abrangente de fatores imunoviológicos da infecção pelo HIV no trato genital.

Previamente à coleta do material, obteve-se das pacientes a assinatura de termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 1). As pacientes, no período acima citado, compareceram à consulta ambulatorial para exame clínico e ginecológico, em um dia de cada fase do ciclo menstrual, durante oito semanas (2 ciclos). As coletas de amostras biológicas nas diversas fases do ciclo menstrual para efeito deste estudo foram programadas para abranger 4 períodos: fase menstrual (coletas realizadas nos dias 1-4 do ciclo), fase folicular (dias 5-11), fase ovulatória (dias 12-16) e fase lútea (dias 20-24). As datas de coleta de material biológico foram definidas com base nas informações registradas em calendário menstrual sobre os ciclos precedentes.

2.2. Coleta e processamento inicial das amostras biológicas

As pacientes compareceram à consulta ambulatorial para exame ginecológico, em um dia de cada fase do ciclo menstrual, conforme detalhado

acima, durante oito semanas (2 ciclos). Nessa ocasião foram submetidas a lavado cervicovaginal (LCV) sob exame especular com instilação de 10 mL de solução fisiológica estéril em região circundante ao colo uterino. Foram colhidas ainda amostras de sangue, concomitantemente à 1a. coleta de material genital de cada paciente para aferição de parâmetros laboratoriais de evolução da infecção por HIV/aids: determinação quantitativa do número de células CD4+ periféricas e carga viral plasmática. A determinação quantitativa do número de células CD4+ periféricas baseou-se em citometria de fluxo e a quantificação da viremia plasmática do HIV na amplificação do RNA viral pelo Nasba. Amostras adicionais foram coletadas para aferição das concentrações séricas de estradiol e progesterona em cada fase do primeiro ciclo menstrual, pelo método de fluoroimunoensaio.

Foram ainda processadas amostras para pesquisa microbiológica (somente na 1a. coleta de material genital de cada paciente): *swab* endocervical para cultura de *Mycoplasma* e *Neisseria*, *swab* vaginal para bacterioscopia pelo método de Gram, cultura geral, exame micológico direto e cultura para fungos, pesquisa de *Trichomonas*, além de teste de Imunofluorescência Direta para pesquisa de *Chlamydia*, visando avaliar na população estudada a presença de co-infecções genitais. No caso de identificação de qualquer co-infecção, as pacientes eram temporariamente excluídas do estudo, submetidas a tratamento específico da infecção diagnosticada e, eventualmente, readmitidas, desde que

nova avaliação microbiológica, realizada quando da readmissão, demonstrasse resolução do processo.

Os LCV foram centrifugados a 600 g por 15 minutos e a seguir divididos em quatro alíquotas, sendo uma de botão celular com o conservante Trizol e outra sem Trizol, além de alíquotas de sobrenadante, sendo uma com Trizol e outra sem Trizol. As alíquotas foram armazenadas a -70°C no Laboratório de Investigação Médica de Virologia (LIM 52) do HC-FMUSP.

As diferentes alíquotas do lavado foram separadas para utilização conforme discriminado no Quadro 2.

ALÍQUOTA DO LCV	FINALIDADE
Botão Celular armazenado sem Trizol	-Pesquisa quantitativa da presença de DNA proviral em células mononucleares. -Avaliação da presença de contaminantes espermáticos pela amplificação de sequência do cromossomo Y em células mononucleares.
Botão Celular armazenado com Trizol	-Pesquisa quantitativa de RNA viral intracitoplasmático (não realizada nesse estudo).
Sobrenadante armazenado sem Trizol	-Avaliação da presença de contaminantes espermáticos por dosagem do marcador prostático PSA (antígeno prostático específico).
Sobrenadante armazenado com Trizol	-Pesquisa quantitativa de RNA viral livre.

Quadro 2. Alíquotas obtidas durante o processamento de lavados cervicovaginais das pacientes admitidas no estudo, segundo a finalidade de investigação.

2.3. Avaliação da qualidade das amostras e da presença de contaminação espermática

Após a seleção clínica das pacientes, durante o processamento das amostras avaliou-se a qualidade do material biológico e a presença de contaminação espermática. No caso da qualidade do material biológico, a amostra que não contivesse DNA genômico humano seria excluída do estudo, repetindo-se os procedimentos com outra alíquota da amostra coletada da paciente na mesma data. Já na verificação de contaminação espermática, previu-se excluir as pacientes cujas amostras evidenciassem a presença de material contaminante. Na Figura 2 ilustra-se o fluxograma de avaliações dessas características.

Figura 2. Avaliação de qualidade das amostras e da presença de contaminação espermática em alíquotas de lavados cervicovaginais.

2.4. Extração de DNA a partir das amostras de LCV

Para a extração de DNA foram utilizados 200µL da alíquota de botão celular sem Trizol, empregando-se o kit comercial QIAamp DNA (Qiagen AG), seguindo-se as recomendações do fabricante. Resumidamente, durante uma rápida centrifugação, o DNA foi adsorvido a uma membrana de sílica. Seguiram-se duas lavagens com tampão de lavagem para que as proteínas e outros contaminantes fossem retirados, garantindo-se a pureza do DNA. Em seguida procedeu-se à eluição do DNA da coluna de sílica, utilizando tampão de eluição. O DNA extraído foi mantido a -20°C até sua utilização.

2.5. Avaliação da qualidade do material biológico estocado

A presença de DNA em todos os LCV foi confirmada por método de espectrofotometria e pela amplificação molecular do gene CCR5, seguindo técnicas previamente descritas na literatura (Huang et al., 1996; Macedo et al., 2002).

2.5.1 Espectrofotometria

Visando melhorar o desempenho das reações de amplificação após testes inicialmente realizados, optou-se por incluir uma etapa de

espectrofotometria para padronizar a concentração de DNA molde das amostras biológicas a ser testadas.

Para a análise por espectrofotometria, 2µL da solução resultante da extração foram diluídos em 48µL de água bi-destilada. A análise foi realizada no espectrofotômetro BioPhotometer (Eppendorf), respeitando-se os cálculos de leituras de absorbância apresentados pelo mesmo.

2.5.2 PCR CCR5

Na PCR para amplificação do gene CCR5, foram utilizados 3 µL de DNA da solução resultante da extração e o par de iniciadores P1 e P2, descritos abaixo.

Ao DNA extraído foram acrescentados 1X PCR buffer, 2,5mM MgCl₂, 0,2 mM dNTPs, 0,2 mM P1, 0,2 mM P2 e 2,5U da enzima Taq polimerase (Invitrogen).

ALVO DA PCR GENE	INICIADORES	SEQUÊNCIA DOS INICIADORES	PARES DE BASE (pb)
CCR5	<i>P 1</i>	5' CAA AAA GAA GGT CTT CAT TAC ACC 3'	188
	<i>P 2</i>	5' CCT GTG CCT CTT CTT CTC ATT TCG 3'	

A PCR consistiu de cinco ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 55°C e 1 minuto a 72°C, seguidos de trinta e cinco ciclos compreendendo 30 segundos de denaturação a 94°C, 30 segundos de alinhamento dos iniciadores a 60°C e 45 segundos de extensão a 72°C, em termociclador automático (*Eppendorf Mastercycler Gradient*).

Os produtos da reação foram detectados após eletroforese em gel de agarose com concentração de 1,5%. O marcador de 100 pares de base (GIBCO BRL) foi usado em cada gel para identificação do tamanho do amplicom obtido na reação. Os produtos esperados de amplificação poderiam apresentar 188pb o tipo selvagem e 157pb o gene com deleção. Os géis foram revelados após coloração com brometo de etídeo (0,5µg/mL), diluído em solução tampão TAE (GIBCO BRL) e digitalizados com uma câmara tipo CCD integrante de um sistema para captação e análise de imagens, o UV Imager (Ultra-Violet Products, Cambridge, Reino Unido).

2.6. Avaliação de contaminação espermática do LCV

Com a finalidade de garantir que o material genético de HIV, recuperado do trato genital feminino, fosse efetivamente resultante da excreção local, no presente estudo foi avaliada a presença de contaminantes espermáticos inicialmente por meio da detecção do marcador prostático PSA, utilizando-se

com essa finalidade um método de ensaio imunoenzimático padronizado. Em seguida, procedeu-se à amplificação pela PCR de DNA humano de indivíduo do sexo masculino, com o uso de um único par de iniciadores SRY3F e SRY3R, os quais se alinham a uma região do gene SRY, localizado no cromossomo Y, conforme já descrito previamente na literatura (Chomont et al., 2001; Larsen et al., 1996; Tevi-Bénissan et al., 1997).

2.6.1 PSA

Para o método automatizado de ensaio imunoenzimático, foram utilizados 200µL da alíquota de sobrenadante sem trizol do LCV. Empregou-se o kit comercial AXSYM (Abbott), seguindo-se as recomendações do fabricante. Na reação foram utilizados como controle positivo da presença de material espermático no fluido genital 200µL de lavado cervicovaginal de voluntária que referia relação sexual nas 24 horas que precederam a coleta do LCV.

2.6.2 PCR para o gene SRY

Para a PCR, foram utilizados 5 µL de DNA da solução extraída previamente. Como controle positivo de reação foram utilizados 5µL de material extraído do botão celular de lavado cervicovaginal de voluntária que referia relação sexual nas 24 horas precedentes à coleta do LCV.

Ao DNA extraído foram acrescentados 1X PCR buffer, 2,0mM MgCl₂, 0,2mM dNTPs, 2,0μM dos iniciadores SRY3F e SRY3R, abaixo discriminados e 2,5U da enzima AmpliTaq (Invitrogen).

ALVO DA PCR GENE	INICIADORES	SEQUÊNCIA DOS INICIADORES	PARES DE BASE (pb)
SRY	<i>SRY3F</i> <i>SRY3R</i>	5' CGC ATT CAT CGT GTG GTC TCG 3' 5' ATT CTT CGG CAG CAT CTT CGC 3'	229

A PCR consistiu de uma desnaturação prévia por 04 minutos a 94°C, seguida de trinta e sete ciclos em termociclador automático (*Eppendorf Mastercycler Gradient*) com 1 minuto de denaturação a 94°C, 1 minuto de alinhamento dos iniciadores a 65°C e 2 minutos de extensão a 72°C, com uma extensão final de 10 minutos a 72°C.

Os produtos da reação foram detectados por eletroforese em gel de agarose com concentração de 1,5%. Um marcador de DNA de peso molecular de 100 pares de base (GIBCO BRL) foi usado em cada gel. Os géis foram revelados com brometo de etídeo (0,5μg/mL) diluído em solução tampão TAE (GIBCO BRL) e digitalizados com uma câmera tipo CCD integrante de um sistema para captação e análise de imagens, o UV Imager (Ultra-Violet Products, Cambridge, Reino Unido).

2.7. Etapas da investigação laboratorial do HIV no LCV

A figura 3 resume os procedimentos que foram realizados para a investigação laboratorial conduzida no presente estudo.

Figura 3. Investigação laboratorial para pesquisa de HIV no LCV.

2.8. Amplificação quantitativa de seqüências genômicas de HIV-RNA

A aferição da excreção cervicovaginal do HIV foi inicialmente efetuada por meio da amplificação quantitativa de RNA viral livre, presente no sobrenadante do LCV, nas alíquotas de sobrenadante com Trizol. A obtenção do RNA das amostras seguiu o protocolo de extração com Trizol - clorofórmio, acrescentando-se 1,8µL de QS (calibrador e controle interno do *kit* Amplicor HIV-1, Roche Diagnóstica) no início da extração. O *pellet* final foi ressuspendido em 50 µL de água DEPC com 0,5 µL de RNase out (Invitrogen), por amostra. Aos 50 µL dessa solução extraída foram acrescentados 50 µL do *mix* presente no kit comercial, seguindo-se a partir desse momento as etapas de amplificação e detecção automatizadas do RNA-HIV pelo aparelho Cobas (*Cobas Amplicor*, Roche Diagnóstica).

Os limites inferiores e superiores de detecção desta técnica são, respectivamente de 50 e 100.000 cópias/mL (Si-Mohamed et al., 2001). Para cálculo do valor final da quantificação de RNA viral livre por mL de LCV, levou-se em conta a diluição ocorrida nas etapas de coleta e processamento do material, multiplicando-se o valor obtido na amplificação do RNA viral pelo coeficiente de diluição, igual a 4.

Todos os insumos laboratoriais necessários para execução dessa etapa foram obtidos através de apoio da Roche Diagnóstica Brasil com o fornecimento de 5 kits de *Cobas Amplicor HIV Monitor*.

2.9. Avaliação do número de células contido nas amostras de botão celular do LCV

Para se quantificar o DNA proviral contido nas amostras de botão celular obtido do LCV, foi inicialmente necessário conhecer o número de células presente em cada amostra, uma vez que o resultado da quantificação viral seria dado em cópias de DNA proviral / 10.000 células. Com essa finalidade, a estimativa do número de células presente em cada amostra foi realizada pela quantificação do DNA do gene da beta-globina humana, por meio da técnica de PCR em Tempo Real.

Para a realização deste procedimento, utilizou-se o sistema *Sybr Green* com os iniciadores PCO4 e GH20, seguindo-se protocolo experimental padronizado no laboratório de biologia molecular da Fundação Pró-sangue-Hemocentro da São Paulo. Resumidamente, o *Sybr Green* é uma fluorescência que possui como característica principal a afinidade por pontes de hidrogênio, as quais são formadas durante a polimerização. Dessa forma, ele se intercala à fita dupla de DNA, durante o processo de extensão de novas duplas fitas, ou seja, na terceira etapa da PCR. A emissão da fluorescência liberada pelo

mesmo encontra-se nesse momento em sua atividade ótima, aumentando sua concentração de tal forma que passa a ser lida pelo equipamento (termociclador) de PCR em Tempo Real. Como o *Sybr Green* se liga a qualquer dupla fita de DNA, o processo de distinção de seqüências inespecíficas daquelas que representam as seqüências alvo é feito a partir da curva de dissociação (curva de *melting*) da reação. A partir da identificação da temperatura de dissociação da fita dupla de DNA, que depende do tamanho da mesma ou de sua concentração, pode-se verificar sua especificidade. Para provar a eficiência da reação e ter um controle padrão de valor conhecido para a quantificação da amostra, foi necessário utilizar uma curva padrão de diluição de uma amostra de DNA com concentração conhecida. Neste trabalho utilizou-se uma amostra de DNA de sangue humano em diluições seqüenciais de 10^8 a 10^4 (Fontaine et al., 2005; Saiki et al., 1986).

ALVO DA PCR GENE	INICIADORES	SEQUÊNCIA DOS INICIADORES
β-globina	<i>PCO4</i>	5' CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC 3'
	<i>GH20</i>	5' GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC 3'

2.10. Avaliação quantitativa do DNA proviral de HIV

O material amplificado proveio do DNA já extraído das amostras de botão celular obtido do LCV e armazenadas sem Trizol. Foi realizada a PCR em tempo real com o sistema de sondas *TaqMan*, seguindo-se protocolo de reação padronizado no laboratório de biologia molecular da Fundação Pró-sangue-Hemocentro da São Paulo. A seqüência alvo dos iniciadores dessa reação foi a LTR do genoma de HIV, de acordo com técnica já padronizada (Yun et al., 2002; Moroney et al., 2006; Zhao et al., 2002).

Resumidamente, entre as etapas de denaturação e anelamento dos iniciadores, a sonda anela-se a regiões específicas do DNA alvo. Essa sonda possui em suas terminações 5'e 3'fluorescências *Reporter* e *Quencher*, respectivamente, que, no caso deste trabalho, corresponderam às fluorescências FAM e TAMRA. Na etapa de anelamento e extensão dos iniciadores, a polimerase (sistema *TaqMan*) provoca a hidrólise da sonda, liberando a fluorescência *Reporter*, que então passa a ser detectada pelo equipamento de PCR em tempo real. Como controle interno da eficiência da reação e padrão de concentração conhecida para controle da quantificação das amostras, foi feita uma curva padrão com um controle positivo de DNA de HIV em diluições seriadas de 10^8 a 10^4 . O limiar de detecção desta técnica é de uma cópia de DNA proviral por 10000 células.

ALVO DA PCR GENE	INICIADORES	SEQUÊNCIA DOS INICIADORES
LTR	<i>SENSE</i> <i>ANTI SENSE</i>	5' GCC TCA ATA AAG CTT GCC TTG A 3' 5' ATT CTT CGG CAG CAT CTT CGC 3'

SEQUÊNCIA DA Sonda
5' FAM-CCA GAG TCA CAC AAC AGA CGG GCA CA-TAMRA 3'

Os resultados relativos à excreção de DNA proviral de HIV devem ser expressos em número de cópias por determinado número de células contido no material biológico analisado. Neste trabalho optou-se por expressá-lo em número de cópias de DNA proviral por 10000 células, empregando-se a fórmula apresentada a seguir. Resumidamente, dividiu-se o valor encontrado na leitura da amplificação de DNA-HIV pela metade do valor obtido na amplificação de beta globina, uma vez que o gene da beta globina possui dois alelos por célula. A seguir multiplicou-se o quociente obtido por 10000.

$$\frac{\text{Resultado amplificação HIV}}{\text{Resultado amplificação } \beta \text{ Globina}/2} = \text{cópias DNA proviral X 10000}$$

3. Análise dos resultados

Dados referentes a identificação das pacientes incluídas no estudo, bem como os obtidos no exame ginecológico e nas avaliações laboratoriais que compuseram o presente trabalho foram inseridos em banco de dados informatizado, empregando-se o programa computacional Microsoft® Office Excel 2003.

Na análise descritiva dos dados categóricos, empregaram-se as freqüências dos eventos de interesse, com estimativa dos respectivos intervalos de confiança 95%. Para interpretação de variáveis contínuas expressaram-se seus valores mínimos e máximos e as medidas de tendência central (médias e medianas).

4. Aspectos Éticos

O presente estudo seguiu as recomendações da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) do Ministério da Saúde para pesquisa envolvendo seres humanos, tendo seu protocolo sido aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projeto de Pesquisa (CAPPesq) do HC-FMUSP em novembro de 1996, sob no. 335/96 (Anexo 2). Como previamente mencionado, obteve-se das pacientes a assinatura de termo de consentimento livre e esclarecido no

momento de sua admissão ao estudo. Além disso, o anonimato dos sujeitos e a confidencialidade no manuseio das informações foram preservados durante toda a execução do trabalho.

RESULTADOS

RESULTADOS

Inicialmente cabe esclarecer que foram selecionadas para este estudo 17 pacientes, que preencheram os critérios de inclusão adotados. Destas, coletaram-se 8 amostras de LCV, correspondendo a uma amostra em cada fase do ciclo menstrual, em dois ciclos (total de amostras: 136). Adicionalmente, analisaram-se 20 outras amostras de 6 dessas pacientes que, embora selecionadas para admissão no estudo, foram temporariamente dele excluídas em algum momento do seguimento, em função do diagnóstico de co-infecção genital.

1. Avaliação de qualidade do material biológico

1.1. Espectrofotometria para presença de DNA

A presença de DNA em todas as alíquotas de botão celular sem trizol foi confirmada através da espectrofotometria. Foi avaliado o total de 156 amostras, verificando-se a presença de DNA na leitura de 100%.

1.2. PCR para o gene CCR5

A confirmação da presença de DNA baseou-se na reação em cadeia por polimerase (PCR), empregando-se os pares de iniciadores P1 e P2 para a detecção do gene CCR5 e com tamanho de fragmento esperado de 188pb para o tipo selvagem e de 157pb para o gene com deleção. Foram amplificadas 156 amostras, sendo que todas resultaram positivas, apresentando o fragmento esperado de 188pb ou 156pb (Figura 4).

Figura 4. Revelação em gel de agarose do fragmento amplificado de 188pb do gene de CCR5 em amostras de LCV de pacientes infectadas pelo HIV – HC-FMUSP, 2000.

Os números identificam LCV de parcela representativa das 156 amostras coletadas de pacientes, "C+" refere-se ao controle positivo e "no" refere-se ao controle negativo.

2. Avaliação de contaminação espermática do LCV

2.1. Teste imunoenzimático PSA

Foi avaliada a presença de contaminantes espermáticos por meio da detecção de um marcador prostático PSA, empregando-se para tal o método de ensaio imunoenzimático padronizado.

Foram analisadas 156 alíquotas, sendo que todas resultaram negativas, mostrando-se abaixo do limite de detecção (0,4 ng/mL).

2.2. PCR para o gene SRY

A presença de contaminantes espermáticos foi avaliada por meio da amplificação pela PCR de DNA humano de indivíduo do sexo masculino, com o uso de um único par de iniciadores SRY3F e SRY3R, os quais se alinham a uma região do gene SRY, localizado no cromossomo Y.

Foram amplificadas 156 amostras. Embora não se tenha verificado contaminação espermática em 152 (97,4%) das amostras testadas, em uma paciente observou-se amplificação do gene *SRY* (fragmento de 229pb) em 4 das 8 amostras de LCV coletadas (Figura 5).

Figura 5. Revelação em gel de agarose do fragmento amplificado de 229pb do gene de SRY em amostras de LCV de pacientes infectadas pelo HIV – HC-FMUSP, 2000.

Os números 1 a 24 referem-se a LCV de parcela representativa das amostras de pacientes, "+" refere-se ao controle positivo e número 25 refere-se ao controle negativo. Os fragmentos amplificados, visíveis nas posições 1, 2, 3 e 6 correspondem à amplificação do gene SRY encontrado no LCV de uma das pacientes.

Após a verificação da presença de contaminação espermática, a paciente foi excluída da análise do estudo, contabilizando 8 alíquotas de LCV a menos no total de amostras a serem avaliadas. A partir desse momento então, 16 pacientes tiveram suas amostras analisadas no presente estudo da excreção genital de HIV.

3. Caracterização da população estudada

PACIENTE	1º ciclo menstrual avaliado (Meses/ 2000)	2º ciclo menstrual avaliado (Meses/ 2000)	células CD4+ (nº cêls/mm ³)	Carga viral plasmática de HIV (cp/mL/log)	Terapia anti-retroviral
1	Abr–Mai	Mai-Jun	894	Ind	AZT, 3TC, NVP
2	Abr- Mai	Jul	444	220 / 2,34	-
3	Abr–Ma	Mai-Jun	647	520 / 2,72	AZT, DDI
4	Abr–Mai	Mai-Jun	573	5500 / 3,74	-
5	Abr–Mai	Mai-Jun	503	1700 / 3,23	AZT, 3TC
6	Mai–Jun	Set	707	Ind	-
7	Ago–Set	Set-Out	277	7300 / 3,86	-
8	Set–Out	Out-Nov	957	Ind	-
9	Mai–Jun	Jun-Jul	867	3700 / 3,57	D4T, DDI, NVP
10	Jul-Ago	Ago-Set	620	Ind	D4T, 3TC, EFZ
11	Set-Out	Out-Nov	929	Ind	AZT, DDI
12	Set-Out	Out-Nov	555	Ind	AZT, DDC
13	Set-Out	Out-Nov	350	Ind	AZT, 3TC, NVP
14	Set-Out	Out-Nov	589	230 / 2,36	AZT, 3TC
15	Abr-Mai	Mai-Jun	595	610 / 2,78	AZT, 3TC
16	Abr-Mai	Mai-Jun	730	Ind	AZT, DDI

TABELA 1. Caracterização da população estudada de 16 pacientes infectadas por HIV. HC – FMUSP, 2000.

Legenda:

Ind – indetectável

AZT – zidovudina

D4T – estavudina

3TC – lamivudina

NVP – nevirapina

DDI – didavudina

EFZ - efavirenz

A partir da avaliação da qualidade do material biológico estocado e da constatação de ausência de contaminação espermática nas amostras de LCV, 16 pacientes puderam ser avaliadas no presente estudo. A tabela 1 resume os períodos de coleta de amostras biológicas referentes ao dois ciclos menstruais avaliados, bem como informações relativas à terapia anti-retroviral a que se submetiam e os resultados das determinações de marcadores laboratoriais evolutivos da infecção pelo HIV (nº. de células CD4+ periféricas e carga viral plasmática) no momento de sua inclusão no estudo. Esses dados auxiliam na resposta do primeiro objetivo estabelecido no projeto.

Como se pode observar, 11 (68,8%) pacientes faziam uso de terapia anti-retroviral, sendo que destas, a maioria (n=7, 63,6%) recebia esquema medicamentoso composto por apenas dois anti-retrovirais inibidores da transcriptase reversa, enquanto às 4 restantes administrava-se esquema triplo composto por dois inibidores nucleosídicos e um inibidor não-nucleosídico da transcriptase reversa.

O grupo estudado apresentava número de células CD4+ periféricas variando entre 277 e 957 por mm³ (média= 640, mediana=607). No tocante à quantificação da carga viral plasmática, verificou-se que em metade das pacientes essa se encontrava indetectável.

As figuras 6 e 7 ilustram as concentrações séricas de estradiol e progesterona da população estudada a fim de permitir certificar-se a fase do ciclo menstrual na qual a coleta de material biológico estava sendo realizada. Consideraram-se como valores normais para a determinação de estradiol:

Fase Folicular: 1 – 30ng/dL

Fase Lútea: 5 – 30ng/dL

Figura 6. Concentrações séricas de estradiol durante um ciclo menstrual em 16 pacientes infectadas por HIV. HC – FMUSP, 2000.

Já no que se referem às concentrações séricas de progesterona, foram considerados valores normais:

Fase Folicular: até 105ng/dL

Fase Lútea: 400 – 2000ng/dL

Figura 7. Concentrações séricas progesterona durante um ciclo menstrual em 16 pacientes infectadas por HIV. HC – FMUSP, 2000.

Cabe destacar que 6 (37,5%) pacientes haviam apresentado evidência de co-infecção genital em momento anterior ao de sua inclusão no estudo, quando se submeteram à avaliação microbiológica. Nesses casos detectaram-

se diferentes patógenos genitais em amostras coletadas nos períodos detalhados na tabela 2.

PACIENTE	PERÍODO Meses 2000	AGENTE COINFECCIOSO
9	Abr-Mai	<i>Streptococcus</i>
10	Mai	<i>Ureaplasma</i>
11	Mai-Jun	<i>Candida</i>
12	Mai-Jun	<i>Mycoplasma</i>
13	Jul	<i>Gardnerella</i>
14	Abr-Mai	<i>Ureaplasma</i>

TABELA 2. Patógenos genitais detectados em amostras de 6 pacientes infectadas por HIV. HC – FMUSP, 2000.

4. Amplificação quantitativa de seqüências genômicas de HIV-RNA livre

Foram amplificadas amostras de 16 pacientes, num total de 128. Os resultados dessa quantificação são apresentados na tabela 3, que permite analisar cada paciente nas oito semanas de avaliação, referentes aos dois ciclos menstruais estudados. Deve-se destacar que a prevalência de excreção genital de RNA de HIV livre foi de 18,8% (IC 95%, 4,1 – 45,6%) na população estudada.

Apenas três pacientes apresentaram em quatro amostras resultados superiores ao limiar de detecção do teste, todas elas com excreção genital baixa. Todas as outras amostras mostraram-se abaixo do limite de 50 cópias/mL do teste. Estes resultados podem ser verificados em sua totalidade na tabela a seguir.

Particularmente na paciente na qual se demonstrou excreção genital de RNA viral livre em dois momentos do ciclo menstrual (paciente 8, no segundo ciclo menstrual avaliado), a diferença (0,35 Log) observada na intensidade da excreção viral nas fases folicular e lútea não pode ser considerada significativa, uma vez que se situa bastante próxima da variabilidade inter-teste esperada para essa determinação, que corresponde a 0,3 Log da carga viral.

Adicionalmente, o conjunto dos dados apresentados não permitiu identificar variações expressivas da excreção genital de HIV-RNA, quando se compararam as diferentes fases do ciclo menstrual analisadas.

PACIENTE	Fase Menstrual Ciclo 1	Fase Pré-Ovulatória Ciclo 1	Fase Folicular Ciclo 1	Fase Lútea Ciclo 1	Fase Menstrual Ciclo 2	Fase Pré-Ovulatória Ciclo 2	Fase Folicular Ciclo 2	Fase Lútea Ciclo 2
1	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind
2	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind
3	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind
4	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind
5	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind
6	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind
7	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind
8	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	1906 cp/mL 3,28	Ind	856 cp/mL 2,93
9	Ind	Ind	968 cp/mL 2,99	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind
10	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind
11	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind
12	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind
13	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind
14	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind
15	Ind	Ind	Ind	Ind	1760 cp/mL 3,24	Ind	Ind	Ind
16	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind

TABELA 3. Excreção genital do RNA-HIV livre durante o ciclo menstrual de 16 pacientes infectadas por HIV. HC – FMUSP, 2000.

Legenda:

cp – n° de cópias de HIV-RNA

Ind - indetectável

As 6 pacientes que apresentaram evidência de co-infecção genital no momento de sua inclusão no estudo, foram também avaliadas no tocante à excreção genital de RNA livre de HIV, no período em que tiveram amostras de LCV coletadas até que a infecção genital fosse diagnosticada. Com isso processaram-se adicionalmente 20 amostras de LCV para pesquisa de RNA-HIV livre. Contudo, em nenhuma dessas amostras coletadas na vigência de co-infecção genital verificou-se resultado detectável. Dessa forma não foi possível nesse grupo de pacientes demonstrar impacto da presença de infecção genital por *Mycoplasma*, *Ureaplasma*, *Streptococcus* e *Candida* na excreção genital de RNA livre de HIV.

5. Quantificação do número de células contido em amostras de LCV.

Todas as amostras apresentaram resultado detectável para a quantificação do gene da beta globina, confirmando então que as amostras efetivamente continham células. Os valores obtidos na quantificação celular dos lavados foram utilizados para cálculo da excreção genital de DNA proviral, conforme detalhado anteriormente.

As figuras 8 e 9 ilustram as curvas obtidas na PCR em tempo real para o conjunto das amostras estudadas e a figura 10 ilustra a curva de dissociação da reação.

Figura 8. Curva padrão da PCR em tempo real para o gene da beta-globina em amostras de LCV de 16 pacientes infectadas por HIV. HC – FMUSP, 2000.

Legenda:

Threshold cycle – Ciclo limiar

Figura 9. Curva de amplificação do gene da beta-globina por PCR em tempo real em amostras de LCV de 16 pacientes infectadas por HIV. HC – FMUSP, 2000.

Figura 10. Curva de dissociação da PCR em tempo real para amplificação do gene da beta-globina em amostras de LCV de 16 pacientes infectadas por HIV.
HC – FMUSP, 2000.

6. Avaliação quantitativa de seqüências genômicas provirais de HIV.

Foram amplificadas amostras das 16 pacientes, num total de 128. Seqüências genômicas provirais de HIV foram observadas em LCV de 5 pacientes, sendo que duas delas exibiram excreção de DNA proviral nos dois ciclos menstruais estudados. Com isso obteve-se uma prevalência de excreção de DNA proviral de 31,3% (IC 95%, 11,0 – 58,7%).

As figuras 11 e 12 ilustram as curvas obtidas na PCR em tempo real para amplificação do genoma proviral de HIV para o conjunto das amostras estudadas.

Coefficiente de correlação (R^2): 0,997

Slope: -3,446

Eficiência da PCR: 95,1%

Figura 11. Curva padrão da PCR em tempo real para o DNA-HIV em amostras de LCV de 16 pacientes infectadas por HIV. HC – FMUSP, 2000.

Legenda:

Threshold cycle – Ciclo limiar

Figura 12. Curva de amplificação da PCR em tempo real para o DNA-HIV em amostras de LCV de 16 pacientes infectadas por HIV. HC – FMUSP, 2000.

A avaliação quantitativa da excreção genital de DNA proviral encontra-se resumida na tabela 4.

PACIENTE	Fase Menstrual Ciclo 1	Fase Pré-ovulatória Ciclo 1	Fase Folicular Ciclo 1	Fase Lútea Ciclo 1	Fase Menstrual Ciclo 2	Fase Pré-ovulatória Ciclo 2	Fase Folicular Ciclo 2	Fase Lútea Ciclo 2
1	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind
2	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind
3	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind
4	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind
5	1 cp/10 ⁴ céls	Ind	Ind	Ind	1 cp/10 ⁴ céls	Ind	Ind	Ind
6	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind
7	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind
8	Ind	4 cp/10 ⁴ céls	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind
9	1 cp/10 ⁴ céls	Ind	Ind	Ind	1 cp/10 ⁴ céls	Ind	Ind	Ind
10	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind
11	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind
12	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind
13	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	3 cp/10 ⁴ céls	Ind	Ind
14	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind
15	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	8 cp/10 ⁴ céls	Ind	Ind
16	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind

TABELA 4. Excreção genital do DNA proviral do HIV o ciclo menstrual de 16 pacientes infectadas por HIV. HC – FMUSP, 2000.

Legenda:

cp – número de cópias

céls – células

Ind - indetectável

Conforme pode ser observado, houve duas pacientes nas quais a excreção de DNA proviral de HIV foi demonstrada apenas na fase menstrual dos dois ciclos estudados, enquanto em outros três casos tal excreção foi identificada na fase folicular. Apesar desses resultados se mostrarem acima do limite de detecção da técnica, a excreção genital do DNA proviral foi de baixa intensidade.

As 6 pacientes que apresentaram evidência de co-infecção genital no momento de sua inclusão no estudo, foram também avaliadas no tocante à excreção genital de DNA proviral de HIV, no período em que tiveram amostras de LCV coletadas até que a infecção genital fosse diagnosticada. Com isso processaram-se adicionalmente 20 amostras de LCV para pesquisa de DNA-HIV. Em duas dessas identificou-se excreção, como ilustra a tabela 5, sendo uma paciente na fase menstrual e outra na folicular. Cabe ressaltar que em ambos os casos a excreção genital do DNA proviral na vigência de co-infecção, seja por *Streptococcus* ou por *Ureaplasma*, foi superior à observada na respectiva fase do ciclo menstrual após a resolução do processo infeccioso.

PACIENTE	QUANTIFICAÇÃO	AGENTE COINFECCIOSO
9	19 cp/10 ⁴ céls Fase Menstrual	<i>Streptococcus</i>
10	Ind em todas as amostras	<i>Ureaplasma</i>
11	Ind em todas as amostras	<i>Candida</i>
12	Ind em todas as amostras	<i>Mycoplasma</i>
13	Ind em todas as amostras	<i>Gardnerella</i>
14	2 cp/10 ⁴ céls Fase Pré-ovulatória	<i>Ureaplasma</i>

TABELA 5. Excreção genital do DNA-HIV em 6 pacientes soropositivas que exibiram co-infecção genital. HC – FMUSP, 2000.

Legenda:

Ind - indetectável

7. Avaliação conjunta da excreção genital do HIV

Considerando-se que a transmissão sexual do HIV pode depender tanto da excreção genital de RNA viral livre como de células infectadas contendo o DNA proviral inserido em seu genoma, é relevante apresentar os resultados obtidos neste estudo de forma conjunta, de modo a permitir melhor avaliação da potencial infectividade das pacientes avaliadas. Nesse contexto, verificou-se excreção genital do HIV em 5 mulheres, perfazendo prevalência de 31,3% (IC 95%, 11,0 – 58,7%). Ressalta-se que todas as pacientes nas quais foi identificada excreção genital de RNA viral livre exibiram também excreção de DNA proviral.

Na tabela 6 são apresentados os resultados das determinações quantitativas de material genético viral nos LCV nas diferentes fases dos dois ciclos menstruais estudados.

PACIENTE	Fase Menstrual Ciclo 1	Fase Pré- ovulatória Ciclo 1	Fase Folicular Ciclo 1	Fase Lútea Ciclo 1	Fase Menstrual Ciclo 2	Fase Pré- ovulatória Ciclo 2	Fase Folicular Ciclo 2	Fase Lútea Ciclo 2
1	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind
2	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind
3	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind
4	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind
5	1 cp/10 ⁴ céls	Ind	Ind	Ind	1 cp/10 ⁴ céls	Ind	Ind	Ind
6	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind
7	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind
8	Ind	4 cp/10 ⁴ céls	Ind	Ind	Ind	1906 cp/mL 3,28	Ind	856 cp/mL 2,93l
9	1 cp/10 ⁴ céls	Ind	968 cp/mL 2,99	Ind	1 cp/10 ⁴ céls	Ind	Ind	Ind
10	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind
11	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind
12	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind
13	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	3 cp/10 ⁴ céls	Ind	Ind
14	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind
15	Ind	Ind	Ind	Ind	1760 cp/mL 3,24	8 cp/10 ⁴ céls	Ind	Ind
16	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind

TABELA 6. Excreção genital do HIV durante o ciclo menstrual de 16 pacientes infectadas por HIV. HC – FMUSP, 2000.

Legenda:

cp – número de cópias

céls – células

Ind - indetectável

DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

Avaliou-se neste estudo a excreção genital de HIV de 16 pacientes acompanhadas em serviço ambulatorial de São Paulo, especializado no cuidado a pessoas que vivem com HIV. A excreção viral foi estudada a partir de amostras biológicas de lavado cervicovaginal (LCV) coletadas ao longo de dois ciclos menstruais e estocadas em laboratório à temperatura de -70°C. Procurou-se identificar não apenas a excreção de RNA viral livre, como também a presença de DNA proviral inserido em células mononucleares presentes no material genital, uma vez que se sabe que a transmissibilidade do HIV pode estar relacionada à presença de qualquer material genético do vírus.

Na quantificação do RNA viral livre e do provírus associado à célula, encontraram-se as seguintes prevalências de excreção genital: 18,8% para RNA-HIV, 31,3% de DNA-HIV e 31,3% de excreção genital, considerando-se a presença de qualquer material genético viral, seja o provírus ou o RNA viral livre. Verificou-se que as prevalências observadas nesta série de casos refletiram dados demonstrados anteriormente na literatura, tanto para excreção de DNA proviral, como de RNA viral, particularmente em estudos que avaliaram mulheres em boas condições clínicas, com baixa viremia plasmática de HIV e,

principalmente, quando submetidas a tratamento anti-retroviral (Coombs et al., 2001; Cu-Uvin et al., 2006; Debiaggi et al., 2001; Fiore et al., 2003; Spinillo et al., 2001; Spinillo et al., 2005).

Um dado que chamou a atenção neste estudo, foi o fato de que as pacientes que exibiram excreção de RNA viral livre, em sua totalidade, apresentaram também a presença de provírus nos lavados cervicovaginais. Pode-se justificar a maior prevalência de DNA proviral, em relação à de RNA livre do HIV, levando-se em conta diversas questões.

Inicialmente, deve-se lembrar que o método de obtenção do material genital adotado neste estudo, ou seja, a realização de LCV, pode não ser ideal para pesquisa de RNA viral livre, tendo em vista que a amostra sofre intensa diluição no processo de coleta, reduzindo-se a sensibilidade de detecção de RNA. Embora se tenha efetuado correção dos valores obtidos na amplificação de RNA por RT-PCR, com base no fator de diluição, pelo simples fato das pacientes avaliadas apresentarem baixa viremia de HIV e, portanto, excreção genital do vírus supostamente reduzida, uma redução da sensibilidade da técnica poderia ser problemática. Mesmo assim, a escolha do LCV se deveu a características outras do procedimento, que o tornam indicado para estudos clínicos. Assim, por exemplo, podem-se enumerar: a facilidade da coleta, fator importante na condução de estudos clínicos, particularmente quando envolvem coleta de múltiplas amostras de uma mesma paciente, o fato do LCV permitir

avaliar todas as formas virais (DNA proviral, RNA livre, ou mesmo RNA associado a células) a partir de uma mesma amostra, e ainda a vantagem de ser possível com essa técnica obter-se maior volume de material biológico, de sorte a possibilitar diversos ensaios quantitativos (Andréoletti et al., 2003; Coombs et al., 2001; Coombs et al., 2003; Coombs et al., 2005; John et al., 2001; Spinillo et al., 1999; Webber et al., 2001).

Ao lado disso, deve-se ainda considerar que a prevalência de excreção genital do RNA-HIV está correlacionada à viremia plasmática, conforme anteriormente mencionado. Sendo assim, como as pacientes participantes deste estudo apresentavam baixa viremia, a excreção do vírus livre nos LCV já seria esperada que fosse de baixa intensidade. Cabe lembrar que metade das pacientes avaliadas encontrava-se em uso de terapia anti-retroviral. Essa condição é habitual na maioria das pacientes em seguimento ambulatorial em serviços de referência como o do HC-FMUSP, face à política adotada pelo Programa Nacional de DST/aids do Ministério da Saúde, que garante acesso universal e gratuito aos medicamentos anti-retrovirais a todas as pessoas que vivem com HIV que preencham critérios de indicação para terapia formulados por aquele órgão.

Além disso, deve-se considerar a limitação inerente ao manuseio de amostras biológicas estocadas por longo tempo. Particularmente no que se refere à conservação de RNA, sabe-se que esse pode ser facilmente

degradado pela ação da temperatura ou por RNAses presentes no material biológico. Para se garantir maior estabilidade desse material, recomenda-se o uso de conservantes como o Trizol e estocagem das amostras em baixas temperaturas. O Trizol é uma solução monofásica de Fenol e Isotiocianato de guanidina, disponível comercialmente e utilizada para extração de RNA e conservação de amostras biológicas contendo esse ácido nucléico. Há evidências na literatura de que a preservação de amostras biológicas de tecidos ou de plasma humano a -80°C , na presença de Trizol, pode garantir a recuperação de RNA sem perdas significativas por até 3 anos (Barbaric et al., 2002; Wong et al., 2004). Além disso, Eikmans e colaboradores (2000) demonstraram boa recuperação de RNA mensageiro para o gene do colágeno $\alpha 1(\text{IV})$ em amostras de biópsias renais conservadas a -70°C por até 10 anos. Sendo assim, acredita-se que a estabilidade biológica do material genético de HIV contido nas amostras de LCV analisadas neste estudo não deva ter sido comprometida significativamente, apesar do longo tempo de estocagem em laboratório.

No que concerne especificamente o objetivo geral deste trabalho, a saber, avaliar a excreção genital de HIV ao longo do ciclo menstrual de uma amostra de pacientes acompanhadas em serviço ambulatorial de referência do município de São Paulo, pode-se demonstrar excreção genital tanto de RNA viral livre, como de DNA proviral em amostras de LCV coletadas em diferentes fases do ciclo menstrual. Contudo, não foi possível identificar um padrão que

permita caracterizar determinada fase menstrual como de maior potencial de excreção genital do vírus. De acordo com a literatura, resultados encontrados em diferentes estudos prévios são por vezes conflitantes no tocante a essa questão.

Assim, analogamente ao observado neste estudo, Villanueva et al. (2002) não observaram influência do ciclo menstrual na excreção genital de HIV. Da mesma forma, Mostad et al. (1998) ao avaliarem diariamente durante um ciclo menstrual *swabs* endocervicais e vaginais de 17 mulheres infectadas por HIV, encontraram associação entre a excreção genital desse retrovírus e a carga viral plasmática. Porém, não puderam identificar nenhum padrão de excreção genital do HIV com relação às fases do ciclo menstrual.

Em contraste, Reichelderfer et al. (2000) analisaram amostras de sangue, LCV, fluido do canal endocervical coletadas com *Sno-strips* e *swabs* endocervicais de 55 mulheres infectadas por HIV por um período de oito semanas (dois ciclos menstruais). A quantificação do RNA-HIV dos LCV foi realizada pelo método Nasba (*Nuclisens, Organon Teknika*) e a quantificação do RNA-HIV presente no *swab* e *Sno-strips* pela técnica de RT-PCR (*Roche Monitor*). Observaram os autores um padrão definido na excreção genital de RNA-HIV durante o ciclo menstrual caracterizado por aumento gradual e progressivo na intensidade de excreção genital da fase folicular para a fase lútea.

As discrepâncias observadas na avaliação do impacto do ciclo menstrual sobre o potencial de excreção genital do HIV podem ser atribuídas a vários fatores. Dentre eles podem ser apontadas inicialmente diferenças na obtenção do material biológico genital, seja pelo sub-compartimento de onde provêm as amostras, ou ainda pela técnica de coleta propriamente dita. Podem ainda variar os métodos de quantificação do RNA viral livre e do DNA proviral empregados nos diferentes trabalhos. Além disso, nem sempre as populações estudadas e os desenhos de estudo são comparáveis. Finalmente, as diferenças observadas podem ser decorrentes da forma de análise dos resultados (Reichelderfer et al., 2002, Villanueva et al., 2002).

Caberia apontar ainda as limitações que se podem reconhecer no presente estudo. A série de casos analisada nesta dissertação incluiu número pequeno de pacientes, o que pode ter reduzido o poder estatístico da investigação em identificar possíveis variações na excreção genital do HIV ao longo do ciclo menstrual. Entretanto, a própria revisão da literatura sugere que estudos epidemiológicos com maior número de casos não são freqüentes na abordagem dessa questão. Talvez isso se deva às dificuldades próprias de estudos dessa natureza, que requerem logística complexa em função dos rígidos critérios de inclusão e exclusão, além da exigência de comparecimento da paciente ao serviço por diversas vezes para coleta de material biológico em exame ginecológico.

Outro aspecto relevante quando se estuda a excreção genital de HIV diz respeito à ocorrência de outras infecções concomitantes no trato genital. Diversos autores investigaram o papel das co-infecções genitais na excreção de HIV nesse território, observando incremento da eliminação de RNA viral livre na presença de vaginose bacteriana (Coleman et al., 2007; Sha et al., 2005; Spinillo et al., 2001), de infecção por *Candida sp* (Sha et al., 2005; Spinillo et al., 2005) ou por agentes virais como, por exemplo, o HSV-2 (Sha et al., 2005). Já em relação à excreção de provírus, há também evidências de que esta possa ser potencializada na presença de *Candida sp*, *Trichomonas vaginalis* ou de vaginose bacteriana (Debiaggi et al., 2001). Se por um lado a maior excreção de HIV na vigência de co-infecções genitais pode estar relacionada a maior aporte de células inflamatórias ao micro-ambiente do trato genital, por outro, deve-se destacar o papel de alguns patógenos em estimular a replicação de HIV, como já descrito *in vitro* para agentes associados à vaginose bacteriana, tais como *Mycoplasma hominis*, *Gardnerella vaginalis*, *Peptostreptococcus sp* e *Streptococcus sp* e, também, para *Chlamydia trachomatis* (Al-Harthi et al., 1999; Hashemi et al., 1999; Hashemi et al., 2000; Mostad, 1998).

Neste estudo abordou-se também a influência de co-infecções sobre a excreção de HIV no trato genital. Procurou-se enfocar infecções genitais freqüentemente observadas entre mulheres que vivem com HIV, utilizando-se métodos diagnósticos sensíveis. Foram incluídas na avaliação microbiológica

pesquisas de infecções bacterianas vaginais e cervicais, de infecção por *Ureaplasma*, *Mycoplasma* ou *Chlamydia*, além de candidíase vaginal e tricomoniase. Verificou-se evidência de co-infecção genital em número expressivo de pacientes, correspondendo a 37,5% da população estudada. Nessas mulheres, pode ser comparada a excreção de HIV no trato genital na vigência de co-infecção e após resolução do processo infeccioso. Duas delas exibiram excreção de provírus na vigência de co-infecção, ambas com quantificação superior à observada no LCV coletado após tratamento e negatificação da pesquisa do patógeno, sendo em um caso, *Streptococcus sp.* e em outro, *Ureaplasma*. Confirmaram-se assim dados anteriormente apresentados, obtidos por outros pesquisadores do papel dessas co-infecções em potencializar a eliminação genital do provírus. No tocante à pesquisa de RNA viral livre nos LCV, todavia, não se verificou excreção viral na presença de co-infecção genital em nenhuma das pacientes estudadas nesta dissertação. Assim sendo, a associação entre essas variáveis não pode ser avaliada.

Com o presente estudo pode-se avaliar a excreção genital do HIV ao longo de dois ciclos menstruais em uma série de pacientes soropositivas acompanhadas em serviço especializado do HC-FMUSP. Demonstrou-se haver excreção de RNA viral livre e de DNA proviral em amostras de LCV, mesmo em paciente com supressão da viremia plasmática. Os resultados obtidos podem contribuir para o entendimento do potencial de transmissibilidade sexual dessa

infecção retroviral e reiteram a necessidade de adesão às práticas de sexo protegido com o intuito de se evitar a transmissão inter-humana do HIV.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Al-Harthi L, Kovacs A, Coombs RW, Reichelderfer PS, Wright DJ, Cohen M, Cohn J, Cu-Uvin S, Watts H, Lewis S, Beckner S, Landay A; WHS 001 Study Team. A menstrual cycle pattern for cytokine levels exist in HIV-positive women: implication for HIV vaginal and plasma shedding. *AIDS*. 2001; 15: 1535-43.

Andreoletti L, Chomont N, Gresenguet G, Matta M, de Dieu Longo J, Carreno MP, Si-Mohamed A, Legoff J, Kazatchkine MD, Belec L. Independent levels of cell-free and cell-associated human immunodeficiency virus-1 in genital tract secretions of clinically asymptomatic, treatment-naïve African women. *J Infect Dis*. 2003; 188: 549-54.

Andreoletti L, Skrabal K, Perrin V, Chomont N, Saragosti S, Gresenguet G, Moret H, Jacques J, Longo Jde D, Matta M, Mammano F, Belec L. Genetic and phenotypic features of blood and genital viral populations of clinically asymptomatic and antiretroviral-treatment-naïve clade A human immunodeficiency virus type 1-infected women. *J Clin Microbiol*. 2007; 45: 1838-42.

Benki S, Mostad SB, Richardson BA, Mandaliya K, Kreiss JK, Overbaugh J. Cyclic shedding of HIV-1 RNA in cervical secretions during the menstrual cycle. *J Infect Dis*. 2004; 189: 2192-201.

Brasil. Ministério da Saúde. *Boletim Epidemiológico - AIDS*. - Ano III nº 1 - Janeiro a Junho de 2006. 2006. Disponível em: <http://www.aids.gov.br>

Chan-Chee C, De Vicenzi I, Sole-Pla MA, Ancelle-Park R, Brunet JB. Use and misuse of condoms. *Genitourin Med*. 1991; 67: 173 [Letter].

Chomont N, Grésenguet G, Lévy M, Hocini H, Becquart P, Matta M, Tranchot-Diallo J, Andreoletti L, Carreno MP, Kazatchkine MD, Bélec L. Detection of Y chromosome DNA as evidence of semen in cervicovaginal secretions of sexually active women. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2001 ; 8: 955-8.

Chomont N, Hocini H, Gresenguet G, Brochier C, Bouhlal H, Andreoletti L, Becquart P, Charpentier C, de Dieu Longo J, Si-Mohamed A, Kazatchkine MD,

Belec L.. Early archives of genetically-restricted proviral DNA in the female genital tract after heterosexual transmission of HIV-1. *AIDS*. 2007; 21: 153-62.

Coleman JS, Hitti J, Bukusi EA, Mwachari C, Muliro A, Nguti R, Gausman R, Jensen S, Patton D, Lockhart D, Coombs R, Cohen CR. Infectious correlates of HIV-1 shedding in the female upper and lower genital tracts. *AIDS*. 2007; 21: 755-9.

Coombs RW, Wright DJ, Reichelderfer PS, Burns DN, Cohn J, Cu-Uvin S, Baron PA, Cohen MH, Landay AL, Lewis S, Kovacs A. Variation of human immunodeficiency virus type 1 viral RNA levels in the female genital tract: implications for applying measurements to individual women. *J Infect Dis*. 2001; 184: 1187-91.

Coombs RW, Reichelderfer PS, Landay AL. Recent observations on HIV type-1 infection in the genital tract of men and women. *AIDS*. 2003; 17: 455-80.

Coombs R. Overview on source of the virus, viral measurement and variability. *J Acquir Immune Def Syndr*. 2005; 38(Suppl 1): S31-S32.

Cu-Uvin S, Snyder B, Harwell JI, Hogan J, Chibwesha C, Hanley D, Ingersoll J, Kurpewski J, Mayer KH, Caliendo AM. Association between paired plasma and cervicovaginal lavage fluid HIV-1 RNA levels during 36 months. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2006; 42: 584-7.

Debiaggi M, Zara A, Spinillo A, De Santolo A, Maserati R, Bruno R, Sacchi P, Achilli G, Pistorio A, Romero E, Filice G. Viral excretion in cervicovaginal secretions of HIV-1-infected women receiving antiretroviral therapy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2001; 20: 91-96.

Fiore JR, Suligoi B, Monno L, Angarano G, Pastore G. HIV-1 shedding in genital tract of infected women. *Lancet*. 2002; 359: 1525-6.

Fiore JR, Suligoi B, Saracino A, Di Stefano M, Bugarini R, Lepera A, Favia A, Monno L, Angarano G, Pastore G. Correlates of HIV-1 shedding and effects of antiretroviral therapies. *AIDS*. 2003; 17: 2169-76.

Fontaine J, Gravitt P, Duh L, et al. High level of correlation of Human Papillomavirus-16 DNA viral load estimates generated by three real-time PCR assays applied on genital specimens. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*. 2005; 14(9): 2200-07.

García-Bujalance S, Ruiz G, De Guevara CL, Peña JM, Bates I, Vázquez JJ, Gutiérrez A. Quantitation of human immunodeficiency virus type 1 RNA loads in cervicovaginal secretions in pregnant women and relationship between viral loads in the genital tract and blood. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2004 ; 23 : 111-5.

Gartner LP, Hiatt JL. *Atlas Colorido de Histologia*. 3ª ed. Editora Guanabara Koogan; 2002.

Ghanem KG, Shah N, Klein RS, Mayer KH, Sobel JD, Warren DL, Jamieson DJ, Duerr AC, Rompalo AM. Influence of sex hormones, HIV status and concomitant sexually transmitted infection on cervical inflammation. *J Infect Dis*. 2005; 191: 358-66.

Goulston C, Stevens E, Gallo D, Mullins JI, Hanson CV, Katzenstein D. Human immunodeficiency virus in plasma and genital secretions during the menstrual cycle. *J Infect Dis*. 1996; 174: 858-61.

Hashemi FB, Ghassemi M, Roebuck KA, Spear GT. Activation of human immunodeficiency virus type 1 expression by *Gardnerella vaginalis*. *J Infect Dis*. 1999 Apr;179(4):924-30.

Hashemi FB, Ghassemi M, Faro S, Aroutcheva A, Spear GT. Induction of human immunodeficiency virus type 1 expression by anaerobes associated with bacterial vaginosis. *J Infect Dis*. 2000 May;181(5):1574-80

Huang Y, Paxton WA, Wolinsky SM, Neumann AU, Zhang L, He T, Kang S, Ceradini D, Jin Z, Yazdanbakhsh K, Kunstman K, Erickson D, Dragon E, Landau NR, Phair J, Ho DD, Koup RA. The role of a mutant CCR5 allele in HIV-1 transmission and disease progression. *Nat Medicine*. 1996; 2 (11): 1240-43.

John GC, Sheppard H, Mbori-Ngacha D, Nduati R, Maron D, Reiner M, Kreiss J. Comparison of techniques for HIV-1 RNA detection and quantitation in cervicovaginal secretions. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2001; 26: 170-5.

Larsen LA, Christiansen M, Norgaard-Pedersen B, Vuust J. Quantitative detection of male DNA by Polymerase Chain Reaction using a single primer set: application to Sex determination and counting of rare fetal cells. *Anal Biochem*. 1996 ; 240: 148-50.

Levy JA. *HIV and the Pathogenesis of AIDS*. 2^a ed . Editora American Society for Microbiology; 1998.

Lurain NS, Robert ES, Xu J, Camarca M, Landay A, Kovacs AA, Reichelderfer PS. HIV type 1 and cytomegalovirus coinfection in the female genital tract. *J Infect Dis*. 2004; 190: 619-23.

Macedo IZ. *Frequência de coronavírus e rinovírus como causa de infecções respiratórias agudas em crianças* [dissertação]. Ribeirão Preto: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2002.

Mantell JE, Dworkin SL, Exner TM, et al. The promises and limitations of female-initiated methods of HIV/STI protection. *Soc Sci Med*. 2006; 63(8): 1998–2009.

Martinez J, Coplan P, Wainberg MA. Is HIV drug resistance a limiting factor in the development of anti-HIV NNRTI and NRTI-based vaginal microbicide strategies? *Antiviral Res*. 2006; 2123.

McClelland RS, Lavreys L, Katingima C, Overbaugh J, Chohan V, Mandaliya K, Ndinya-Achola J, Baeten JM. Contribution of HIV-1 infection to acquisition of sexually transmitted disease: a 10-year prospective study. *J Infect Dis*. 2005; 191: 333-8.

Money DM, Arikan YY, Remple V, Sherlock C, Craib K, Birch P, Burdge DR. Genital tract and plasma human immunodeficiency virus viral load throughout the menstrual cycle in women who are infected with ovulatory human immunodeficiency virus. *Am J Obstet Gynecol*. 2003; 188 (1): 122-8.

Moroney S, Heller L, Widen R. Evaluation of two TaqMan PCR assays for the detection of HIV-1 proviral DNA in blood samples. *J Microbiol Methods*. 2006; 65: 350-3.

Mostad SB, Jackson S, Overbaugh J, Reilly M, Chohan B, Mandaliya K, Nyange P, Ndinya-Achola J, Bwayo JJ, Kreiss JK. Cervical and vaginal shedding of human immunodeficiency virus type 1-infected cells throughout the menstrual cycle. *J Infect Dis*. 1998; 178: 983-91.

Natividad-Villanueva GU, Santiago E, Manalastas RM Jr, Brown HW, Ingersoll J, Caliendo AM, Mayer KH, Cu-Uvin S. Human Immunodeficiency virus in plasma and cervicovaginal secretions in Filipino women. *Int J STD AIDS*. 2003; 14: 826-9.

Nowicki MJ, Laskus T, Nikolopoulou G, Radkowski M, Wilkinson J, Du WB, Rakela J, Kovacs A. Presence of Hepatitis C virus (HCV) RNA in the genital tracts of HCV/HIV -1-Coinfected women. *J Infect Dis*. 2005; 192:1557-65.

Nunnari G, Sullivan J, Xu Y, Nyirjesy P, Kulkosky J, Cavert W, Frank I, Pomerantz RJ. HIV type 1 cervicovaginal reservoirs in the era of HAART. *AIDS*. 2005; 21(8): 714-8.

Philpott S, Burger H, Tsoukas C, Foley B, Anastos K, Kitchen C, Weiser B. Human immunodeficiency virus type 1 genomic RNA sequences in the female genital tract and blood: compartmentalization and intrapatient recombination. *J Virol*. 2005; 79: 353-63.

Pope M, Haase AT. Transmission, acute HIV infection and the quest for strategies to prevent infection. *Nat Med*. 2003; 9: 847-52.

Reichelderfer PS, Coombs RW, Wright DJ, Cohn J, Burns DN, Cu-Uvin S, Baron PA, Coheng MH, Landay AL, Beckner SK, Lewis SR, Kovacs AA. Effect of menstrual cycle on HIV-1 levels in the peripheral blood and genital tract. *AIDS*. 2000; 14: 2101-7.

Reichelderfer PS, Kovacs A, Wright DJ, Landay A, Cu-Uvin S, Burns DN, Cohn J, Coombs RW. The menstrual cycle does not affect human immunodeficiency virus type 1 levels in vaginal secretions. *J Infect Dis*. 2002; 186: 726-8.

Saiki RK, Bugawan TL, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLA-DQ alpha DNA with allele-specific oligonucleotide probes. *Nature*. 1986; 324: 163-6.

Saracino A, Di Stefano M, Fiore JR, Lepera A, Raimondi D, Angarano G, Pastore G. Frequent detection of HIV-1 RNA but low rates of HIV-1 isolation in cervicovaginal secretions from infected women. *New Microbiol*. 2000; 23: 79-83.

Segurado AAC, Fink MC, Miranda S. Determinação quantitativa da excreção vaginal de HIV baseada em amplificação de RNA viral e de DNA proviral. *Revista da Soc. Bras. de Med Tropical*. 1999; 32: 441 [Abstract].

Sha BE, Chen HY, Wang QJ, Zariffard MR, Cohen MH, Spear GT. Utility of Amsel criteria, Nugent score and quantitative PCR for *Gardnerella vaginalis*, *Mycoplasma hominis* and *Lactobacillus* spp. for diagnosis of bacterial vaginosis in Human Immunodeficiency Virus-infected women. *J. Clin. Microbiol*. 2005 ; 4607-12.

Si-Mohamed A, Andreoletti L, Colombet I, Carreno MP, Lopez G, Chatelier G, Kazatchkine MD, Belec L. Quantitation of Human Immunodeficiency Virus type 1

(HIV-1) RNA in cell-free cervicovaginal secretions: comparison of reverse transcription – PCR amplification (Amplicor HIV-1 Monitor 1.5) with enhanced-sensitivity Branched – DNA assay (Quantiplex 3.0). *J Clin Microbiol.* 2001; 39: 2055-9.

Snell RS. *Histologia Clínica*. 1ª ed. Editora Interamericana; 1985.

Spinillo A, Zara F, De Santolo A, Brerra R, Maserati R, Romero E, Filice G. Quantitative assessment of cell-associated and cell-free virus in cervicovaginal samples of HIV-1-infected women. *Clin Microbiol Infect.* 1999; 5: 605-11.

Spinillo A, Debiaggi M, Zara F, Maserati R, Polatti F, De Santolo A. Factors associated with nucleic acids related to human immunodeficiency virus type 1 in cervico-vaginal secretions. *Brit J Obst and Gyn.* 2001; 108: 634-41.

Spinillo A, Zara F, Gardella B, Preti E, Mainini R, Maserati R. The effect of vaginal candidiasis on the shedding of Human Immunodeficiency Virus in cervicovaginal secretions. *J Obstet Gynecol.* 2005; 192 (3) : 774-9.

Spinillo A, Zara F, Gardella B, Preti E, Gaia G, Maserati R. Cervical intraepithelial neoplasia and cervicovaginal shedding of human immunodeficiency virus. *Obstet Gynecol.* 2006; 107: 314-20.

Stover CT, Smith DK, Schmid DS, Pellett PE, Stewart JA, Klein RS, Mayer K, Vlahov D, Schuman P, Cannon MJ. Prevalence of and risk factors for viral infections among HIV-infected and high-risk HIV-uninfected women. *J Infect Dis.* 2003; 187: 1388-96.

Strick L, Wald A, Celum C. Management of herpes simplex virus type2 infection in HIV type 1-infected persons. *Clin Infect Dis.* 2006; 43: 347-56.

Tevi-Bénissan C, Bélec L, Lévy M, Schneider-Fauveau V, Si Mohamed A, Hallouin MC, Matta M, Grésenguet G. In vivo semen-associated pH neutralization of cervicovaginal secretions. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1997; 4: 367-74.

Tuomala RE, O'Driscoll PT, Bremer JW, Jennings C, Xu C, Read JS, Matzen E, Landay A, Zorrilla C, Blattner W, Charurat M, Anderson DJ. Cell-associated genital tract and vertical transmission of Human Immunodeficiency Virus Type 1 in antiretroviral-experienced women. *J Infect Dis.* 2003; 187: 375-84.

UNAIDS/WHO. 2006 AIDS Epidemic Update. Available from: http://www.unaids.org/en/HIV_data/2006GlobalReport/

Vettore MV, Schechter M, Melo MF, Boechat LJ, Barroso PF. Genital HIV-1 viral load is correlated with blood plasma HIV-1 viral load in Brazilian women and is reduced by antiretroviral therapy. *J Infect*. 2005; 1-4.

Villanueva JM, Ellerbrock TV, Lennox JL, Bush TJ, Wright TC, Pratt-Palmore M, Evans-Strickfaden T, Conley LJ, Schnell C, Hart CE. The menstrual cycle does not affect human immunodeficiency virus type 1 levels in vaginal secretions. *J Infect Dis*. 2002; 185: 170-7.

Watts DH, Fazzari M, Minkoff H, Hillier SL, Sha B, Glesby M, Levine AM, Burk R, Palefsky JM, Moxley M, Ahdieh-Grant L, Strickler HD. Effects of bacterial vaginosis and other genital infections on the natural history of Human Papillomavirus infection in HIV-1-infected and high-risk HIV-1-uninfected women. *J Infect Dis*. 2005; 191: 1129-39.

Webber MP, Schoenbaum EE, Farzadegan H, Klein RS. Tampons as a self-administered collection method for the detection and quantification of genital HIV-1. *AIDS*. 2001; 15: 1417-20.

Yun Z, Fredriksson E, Sönnnerborg A. Quantification of human immunodeficiency virus type 1 proviral DNA by the TaqMan real time PCR assay. *J Clin Microbiol*. 2002; 40: 3883-4.

Zárate S, Pond S, Shapshak P. Comparative study of methods for detecting sequence compartmentalization in human immunodeficiency virus type 1. *J Virol*. 2007; 81: 6643-51.

Zhao Y, Yu M, Miller JW, Chen M, Bremer EG, Kabat W, Yogev R. Quantification of human immunodeficiency virus type 1 proviral DNA by using TaqMan technology. *J Clin Microbiol*. 2002; 40: 675-8.