

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENFERMAGEM DE RIBEIRÃO PRETO

CAMILA DE ALMEIDA AGUSTONI

Influência do polimorfismo do gene do CCR-5 na transmissão materno-
infantil do HIV-1

Ribeirão Preto
2011

CAMILA DE ALMEIDA AGUSTONI

Influência do polimorfismo do gene do CCR-5 na transmissão materno-infantil do
HIV-1

Dissertação apresentada à Escola de
Enfermagem de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Mestre em Ciências, Programa
de Pós Graduação em Enfermagem
Fundamental

Linha de Pesquisa: Ciência e Tecnologia
em Enfermagem

Orientador: Ana Paula Morais Fernandes

Ribeirão Preto
2011

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Agustoni, Camila de Almeida

Influência do polimorfismo do gene do CCR-5 na transmissão materno-infantil do HIV-1. Ribeirão Preto, 2011.

75 p. : il. ; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Enfermagem Fundamental

Orientador: Fernandes, Ana Paula Morais.

1. HIV-1. 2. Transmissão materno-infantil. 3. CCR-5

FOLHA DE APROVAÇÃO

AGUSTONI, Camila de Almeida

Influência do polimorfismo do gene do CCR-5 na transmissão materno-infantil do HIV-1

Dissertação apresentada à Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título Mestre em Ciências, Programa de Pós-Graduação em Enfermagem Fundamental.

Aprovada em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Esta conquista não seria possível sem o apoio das pessoas que mais amo, minha mãe DONILIA, meus avôs OSWALDO e JANDIRA, meus tios DJAIR e JOSÉ ROBERTO, minha irmã ANA CAROLINA, meus sobrinhos MARIA EDUARDA e JOÃO RICARDO e meu namorado ALBINO.

Obrigada pelo incentivo, paciência e por acreditarem em mim, até mesmo, quando eu já não acreditava.

*Nasceste no lar que precisavas,
Vestiste o corpo físico que merecias,
Moras onde melhor Deus te proporcionou, de acordo com teu adiantamento. Possuis os
recursos financeiros coerentes com as tuas necessidades, nem mais, nem menos, mas o justo
para as tuas lutas terrenas.*

*Teu ambiente de trabalho é o que elegeste espontaneamente para a tua realização. Teus
parentes, amigos são as almas que atraíste, com tua própria afinidade. Portanto, teu
destino está constantemente sob teu controle.*

*Tu escolhes, recolhes, eleges, atraís, buscas, expulsas, modificas tudo aquilo que te rodeia a
existência. Teus pensamentos e vontades são a chave de teus atos e atitudes... São as fontes
de atração e repulsão na tua jornada vivência.*

*Não reclames nem te faças de vítima. Antes de tudo, analisa e observa. A mudança está em
tuas mãos. Reprograme tua meta, busque o bem e viverás melhor.*

*"Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo, qualquer um pode começar
agora e fazer um novo fim".*

(Chico Xavier)

AGRADECIMENTOS

*A DEUS que tornou minha vida possível e permitiu que a saúde me ajudasse nessa
caminhada,*

Ao meu PAI, que me ensinou que tudo se pode conquistar com muito estudo e determinação,

*A minha FAMÍLIA, que em sua simplicidade é a mais perfeita descrição de união, amor e
perseverança,*

*Ao meu eterno namorado ALBINO, que suportou ao meu lado, todas as minhas lamurias,
sempre apoiando e incentivando as minhas decisões,*

*Aos anjos que Deus colocou em meu caminho, ANA LUCIA e ROBERTA, que me
socorreram nos momentos mais difíceis,*

*A minha orientadora Profa. Dra. ANA PAULA MORAIS FERNANDES, que tornou
possível a realização deste sonho,*

*Aos meus AMIGOS, que sempre estiveram presentes, colaborando cada um a sua maneira
com o desfecho desta história.*

“Bom mesmo é ir à luta com determinação, abraçar a vida com paixão, perder com classe e vencer com ousadia, porque o mundo pertence a quem se atreve. E a vida é muito para ser insignificante”

(Charles Chaplin)

RESUMO

AGUSTONI, C. A. **Influência do polimorfismo do gene do CCR-5 na transmissão materno-infantil do HIV-1**. 2011. 75 f. Dissertação (Mestrado) - Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

A principal via de infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV-1) em crianças é a transmissão materno-infantil (TMI). Diversos fatores podem estar associados com a TMI do HIV-1. Acredita-se que indivíduos homocigotos para o alelo CCR5- Δ 32 são resistentes à infecção pelo HIV-1. Considerando que ainda permanece controverso o papel dos mecanismos envolvidos, especificamente o de polimorfismos de genes associados à infecção do HIV-1, este estudo avalia a influência da deleção do gene CCR5 na TMI da infecção pelo HIV-1. Foram avaliadas 82 duplas de mães e filhos, sendo 56 duplas em que não ocorreu a TMI e 26 em que ocorreu a TMI do HIV-1. Na presente casuística, não detectamos diferenças significantes ao compararmos a presença da deleção do gene CCR5 na TMI, nas duplas de mãe e filhos, mas observamos que há uma predominância da presença da deleção nos filhos não infectados em comparação aos que foram verticalmente infectados. Relativo aos dados socio-demográficos, a utilização da terapia antirretroviral na gestação e parto foram significativamente associados com a proteção da TMI do HIV-1 ($p= 0,0001$ e $p= 0,014$, respectivamente). Assim, a promoção de intervenções que reduzam a carga viral materna são fundamentais para a redução da TMI do HIV-1. Várias são as estratégias de prevenção da TMI, entretanto, crianças ainda são infectadas, evidenciando-se que ainda há um amplo desafio na sua prevenção. Nesse contexto, a enfermagem pode contribuir com ações que envolvem o pré-natal, parto e puerpério, realizando aconselhamento quanto à realização do teste anti-HIV, utilização de antirretrovirais, promoção e o apoio de práticas ideais de alimentação infantil.

Palavras Chave: HIV-1, transmissão materno-infantil (TMI), CCR-5.

ABSTRACT

AGUSTONI, C. A. **The influence of polymorphism of the CCR-5 gene in the maternal-infant transmission of HIV-1.** 75f. Master Theses – Ribeirão Preto Nursing School, São Paulo University, Ribeirão Preto, 2011.

The main via of infection by Human Immunodeficiency Virus (HIV-1) in children is the maternal-infant transmission (MIT). Several factors can be associated to MIT of HIV-1. It's believed that the homozygote individual to the allele CCR5-Δ32 are resistant to the infection of HIV-1. Considering that the role of the mechanisms involved are still controversial, specifically the one of polymorphism of genes associated to the infection of HIV-1, this study evaluates the influence of deletion of the gene CCR5 in the MIT of the infection by HIV-1. It has been evaluated 82 couples of mothers and children, being 56 couples in which haven't occurred MIT and 26 in which have occurred MIT of HIV-1. In the current casuistry, it hasn't been detected meaningful differences when compared the presence of deletion of the gene CCR5 in MIT, in mother and children's couples, but it has been observed that there is a predominance of the presence of deletion in the not infected children to the ones vertically infected. Related to the social-demographic data, the use of antiretroviral therapy in the gestation and labor was meaningfully associated to the protection of MIT of HIV-1 ($p=0,0001$ e $p=0,014$, respectively). Therefore, the promotion of interventions that reduce the maternal viral load are fundamental for the reduction of MIT of HIV-1. There are several strategies to prevent the MIT, thus, children are still infected, becoming evident that there is still a wide challenge of its prevention. In this context, the nursing can contribute with actions that involve the prenatal, labor and puerperium, advising about the realization of the test of anti-HIV, the usage of antiretrovirals, promotion and support of ideal practices of infant nourishment.

Key Words: HIV, maternal-infant transmission (MIT), CCR-5.

RESUMEN

AGUSTONI, C. A. **Influencia del polimorfismo en el CCR-5 transmisión materno-infantil del HIV-1**. 2011. 75 f. Tesis (MA) - Escuela de Enfermería de Ribeirão Preto, Universidad de São Paulo, Ribeirão Preto, de 2011.

La principal vía de infección por el Virus de Inmunodeficiencia Humana (HIV-1) en los niños es la transmisión materno-infantil (TMI). Hay varios factores que pueden estar asociados con la (TMI) del HIV-1. Acreditase que los individuos homocigotos para el alelo CCR5-Δ32 son resistentes a la infección por el HIV-1. Considerando que sigue siendo polémico el papel de los mecanismos implicados, específicamente los polimorfismos de genes asociados con la infección de la TMI del HIV-1, este estudio evalúa la influencia de la delección del gen CCR5 en la transmisión vertical del HIV-1. Fueron evaluados 82 pares de madres e hijos, siendo que 56 pares donde no ocurrió a TMI y 26 donde ocurrió la TMI del HIV-1. En la presente casuística, no detectamos diferencias significativas al comparar la presencia de la delección del gen CCR5 en los pares de madres e hijos, pero observamos que hay un predominio de la presencia de la delección en los niños no infectados en comparación a los que habían sido infectados verticalmente. Concerniente a los datos socio-demográficos, el uso de la terapia antirretroviral durante el embarazo y el parto fueron asociados significativamente con la protección de las TMI del HIV-1 ($p = 0,0001$ y $p = 0,014$, respectivamente). Por lo tanto, la promoción de intervenciones que reducen la carga viral materna son esenciales para la reducción de la TMI del HIV-1. Hay varias estrategias para la prevención de la TMI, sin embargo, los niños todavía son infectados, lo que demuestra que hay un amplio desafío en la prevención. En este contexto, la enfermería puede contribuir con las acciones de que implican en el prenatal, parto y puerperio, realizando asesoramiento cuánto a la realización del examen del HIV, el uso de antirretrovirales, promoción y apoyo de las prácticas ideales de la alimentación infantil.

Palabras clave: HIV-1, transmisión materno-infantil (TMI), CCR-5

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação do agente HIV-1 com suas proteínas.....	19
Figura 2	Representação da ligação do HIV-1 aos receptores CD4, nos linfócitos T	22
Figura 3	Distribuição mundial do HIV-1	23
Figura 4	Modelo de distribuição dos casos de HIV-1 nos municípios brasileiros.....	24
Figura 5	Localização do gene CCR-5, no braço curto do cromossomo 3 ...	30
Figura 6	Gel de poliacrilamida a 10% não desnaturante mostrando a mobilidade dos alelos dos locos analisados no gene CCR-5.....	45

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	O uso de antirretroviral (ARV) durante o pré-natal na TMI do HIV-1 (em valores absolutos, $p=0,0001$).....	56
Gráfico 2	O uso de antirretroviral (ARV) intravenoso intraparto na TMI do HIV-1 (em valores absolutos, $p=0,014$).....	57
Gráfico 3	O conhecimento do <i>status</i> sorológico prévio a gestação (em valores absolutos, $p=0,0001$).....	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Descrição das sequencias iniciadoras, usadas para amplificar os segmentos do DNA	42
Tabela 2	Descrição do grupo de TMI negativa (n=56)	49
Tabela 3	Descrição do grupo de TMI negativa (n=26)	53
Tabela 4	Frequencia dos genótipos, referentes ao polimorfismo do gene CCR-5, e a presença ou não da TMI do HIV-1 nas duplas analisadas	55

LISTA DE SIGLAS

aids	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
AMIG	Ambulatório de Moléstias Infecciosas em Ginecologia
AMIGO	Ambulatório de Moléstias Infecciosas em Ginecologia e Obstetrícia
ARV	Antirretroviral
AZT	Zidovudina (azidotimidina)
CDC	<i>Center for Disease Control and Prevention</i>
CCR5	Co-receptor para HIV-1 (receptor de quimiocina)
CXCR4	Co-receptor para HIV-1
°C	Graus centígrados
DNA	Ácido desoxirribonucléico
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
EUA	Estados Unidos da América
et al	E outros
gp	Glicoproteína
FMRP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
HC	Hospital das Clínicas
Kg	Kilograma
LD	<i>Linkage disequilibrium</i>
Ig	Imunoglobulina
M	Molar
mM	Milimolar
mg	Miligrama
ml	Mililitro
nm	Nanômetro
OMS	Organização Mundial de Saúde
p	Proteína
pb	Pares de Bases
PCR	Reação em cadeia de polimerase
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphisms</i>
RNA	Ácido ribonucléico
rpm	Rotações por minuto

SIV	Vírus da Imunodeficiência Símia
TMI	Transmissão Materno-Infantil
UETDI	Unidade Especial de Tratamento de Doenças Infecto-contagiosas
µg	micrograma
µL	Microlitro
%	Porcentagem
Δ32	Deleção de 32 pares de bases

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
1.1 Histórico do HIV	19
1.1.1 Estrutura do HIV-1.....	21
1.2 O papel do HIV-1.....	21
1.3 Estimativas da aids	23
1.4 Transmissão Materno-Infantil do HIV-1	25
1.5 Gene CCR-5 (<i>C-C chemokine receptor 5</i>) e CCR5- Δ 32	28
1.6 Justificativa	32
2 OBJETIVOS.....	33
2.1 Objetivos Gerais	34
2.2 Objetivos Específicos	34
3 METODOLOGIA	35
3.1 Delineamento do Estudo	36
3.2 Local de Estudo.....	36
3.3 População de Estudo	37
3.4 Critérios de Inclusão.....	37
3.5 Critérios de Exclusão	38
3.6 Aspectos Éticos.....	38
3.7 Instrumento de Coleta de Dados	39
3.8 Coleta de Material Biológico.....	39
3.9 Extração do DNA - Células do Sangue	40
3.10 Extração do DNA de Células da Mucosa Oral.....	41
3.11 Amplificação dos segmentos de DNA	41
3.12 Programas utilizados para CCR5	42
3.13 Ensaio de RFLP-PCR.....	42
3.14 Visualização dos segmentos de DNA	43
3.15 Separação Eletroforética dos Produtos Amplificados.....	43
3.16 Coloração com Nitrato de Prata	44
3.17 Registro dos resultados.....	44
3.18 Análise Estatística	45

4. RESULTADOS.....	46
4.1 Caracterização da População de Estudo	47
4.2 Polimorfismo do gene CCR-5.....	55
5. DISCUSSÃO	59
6. CONCLUSÕES	64
REFERÊNCIAS.....	66
ANEXO	73

1. INTRODUÇÃO

1.1 Histórico do HIV

A aids (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida) é considerada uma das síndromes mais importantes das últimas décadas e é decorrente da infecção causada pelo Vírus da Imunodeficiência Humana tipo 1 e tipo 2 (HIV-1 e HIV-2), que se distinguem pelas suas propriedades antigênicas, moleculares e biológicas. O HIV-1 é o agente responsável pela pandemia em nível mundial, enquanto que o HIV-2 é responsável por epidemias localizadas, sobretudo em países da África Ocidental e por um número reduzido de casos na Europa e outros continentes, casos esses que ocorrem, sobretudo, em indivíduos oriundos da África Ocidental ou com ligações a esta região (HOGLUND et al., 1992). No presente estudo abordaremos a infecção causada pelo HIV-1.

Essa doença foi descrita pela primeira vez nos Estados Unidos da América, em 1981, o que causou amplo impacto epidemiológico (VERONESI; FOCCACIA; LOMAR, 2000). A descoberta do agente etiológico (Figura 1) foi realizada pela equipe do Dr. Jean Luc Montagnier, em 1983, no Instituto Pasteur de Paris (BARRÉ-SINOUSI et al., 1983).

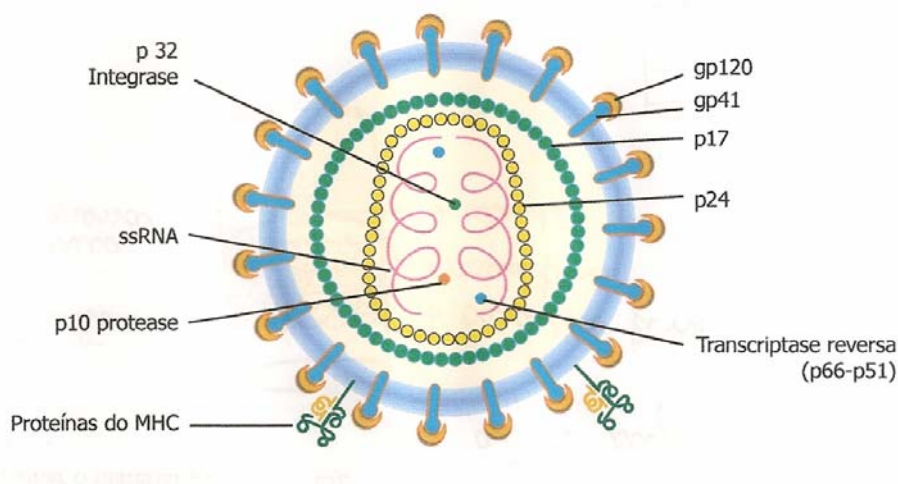


Figura 1 - Representação do agente HIV-1 com suas proteínas
Fonte: <http://huehuetotl.wordpress.com/2007>. Modificada

O HIV tem origem no SIV (Vírus da Imunodeficiência Símia). O SIV pode ser encontrado naturalmente em espécies de macacos dos gêneros *Cercopithecus* e *Cercocebus*, porém, esses não apresentam sintomas da síndrome. No entanto, em macacos do gênero *Rhesus*, o SIV pode causar a SAIDS, uma doença semelhante a aids. Nos anos 80, o HIV foi descoberto em macacas desse gênero, contaminadas pelo SIV, mantidas em cativeiro. Uma das hipóteses desenvolvidas para explicar a presença dessa zoonose no homem foi a caça predatória de chimpanzés no continente africano (HAHN et al., 2000). Mediante a possibilidade da existência desses vírus em primatas, alguns pesquisadores começaram, então, a analisar as fezes de gorilas, retiradas de áreas florestais africanas, onde foram encontrados vírus com a forma semelhante ao HIV que hoje é disseminado em todo o mundo. Diante dos resultados, os cientistas afirmaram que a possível transmissão do vírus para os humanos ocorreu no Sudeste da República de Camarões e se espalhou para todo o planeta (VAN HEUVERSWYN et al., 2006).

O Centro para o Controle de Prevenção de Doenças (*Center for Disease Control and Prevention* = CDC), localizado nos EUA, em 1981, relatou os primeiros casos de pneumonia com um quadro de imunodeficiência grave em homens homossexuais, que passaram a apresentar uma acentuada diminuição na quantidade de linfócitos T auxiliares (GOTTILIEB et al., 1981). Em 1982, já eram relatados casos semelhantes em usuários de drogas injetáveis, hemofílicos, usuários de hemoderivados e na prole cujas mães que faziam uso de drogas injetáveis (CDC, 1982a, 1982b).

Na ocasião da descoberta do HIV, em 1983, a síndrome já era descrita como sendo uma doença infecciosa que podia ser transmitida por contato sexual ou sanguíneo (BARRÉ-SINOUSI et al., 1983). Hoje, sabidamente, a transmissão do HIV pode ser consumada por três vias: a) relações sexuais não protegidas com parceiros (as) contaminadas; b) contaminação via sanguínea, típica em usuários de drogas intravenosas que partilham seringas com pessoas contaminadas ou indivíduos que fazem uso de transfusões sanguíneas ou hemoderivados sem um controle específico e c) transmissão materno-infantil que pode ocorrer durante a gravidez, no parto ou no aleitamento materno (NISHIMOTO; ELUF NETO; ROZMAN, 2005).

1.1.1 Estrutura do HIV-1

O HIV-1 é membro da família Retroviridae, sendo classificado como um lentivírus. Sua partícula madura possui cerca de 100nm de diâmetro, tem formato esférico, possuindo um envelope formado por uma dupla camada lipídica (Figura 2) (HOGLUND et al., 1992). A membrana externa possui 72 estruturas protuberantes, formadas por trímeros da proteína de superfície gp120, ligados à proteína transmembrana gp41 (ARTHUR et al., 1992). Em seu interior encontramos um nucleocapsídeo, com um core denso em forma de cone (HOGLUND et al., 1992). O core está envolto por uma matriz protéica, formada predominantemente pela proteína denominada p17, e é formado principalmente pelas proteínas p24 e p6.

Em seu interior encontram-se duas moléculas idênticas de RNA de fita simples, com orientação positiva, intimamente associada à proteína p7, que por sua vez liga-se à proteína p24. Outras proteínas virais, importantes nas fases iniciais do ciclo viral, também estão presentes no core, tais como: transcriptase reversa, responsável pela transcrição reversa do RNA viral no DNA pró-viral, a integrase, fundamental na integração deste ao genoma da célula humana, a protease que participa na maturação viral, um tRNA_{lys} na terminação 5' do RNA, que serve como primer para a iniciação da síntese da fita de DNA de polaridade negativa e a proteína Vpr (STREICHER; REITZ JR.; GALO, 2000).

1.2 O papel do HIV-1

A infecção é iniciada pela ligação da glicoproteína viral, gp120, à molécula CD4 encontrada na superfície de alguns linfócitos T, macrófagos e células da microglia. A ligação ao CD4 não é suficiente para a entrada do HIV-1, sendo necessária a presença de co-receptores. Foram identificados alguns receptores de citocinas, tais como o CXCR4, como um segundo receptor em células de linhagem T, e o receptor CCR5 em macrófagos (ALKHATIB et al., 1996).

O HIV-1 tem como principal alvo, os linfócitos T auxiliares, portadores do

receptor CD4 (Figura 2). Após a infecção, esses agentes patológicos causam um efeito devastador nessas células que, em associação com a destruição das células já infectadas, causam uma diminuição na quantidade de linfócitos T CD4⁺ que são indispensáveis para a imunidade. Assim, outros agentes denominados oportunistas podem se desenvolver, sem controle, no organismo contaminado pelo HIV-1, provocando infecções graves e, na maioria das vezes, fatais (CDC, 1982b).

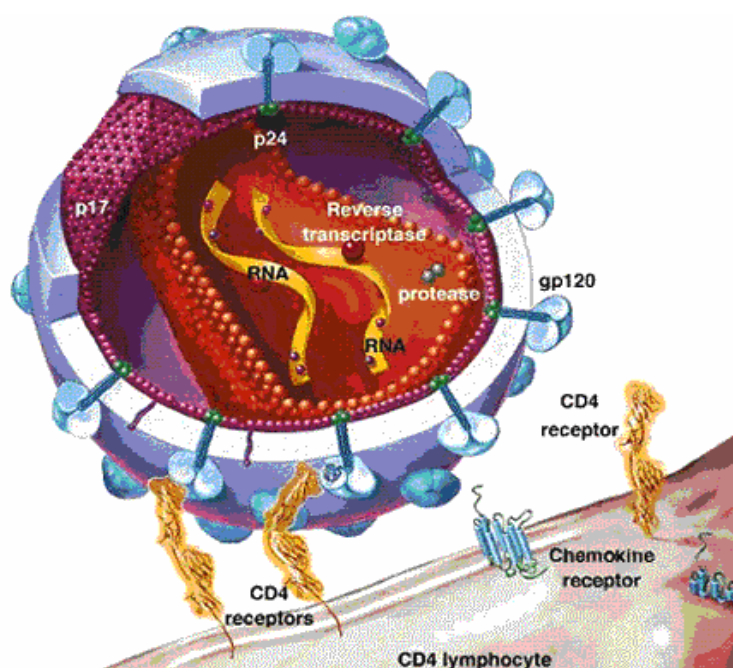


Figura 2 - Representação da ligação do HIV-1 aos receptores CD4, nos linfócitos T.
Fonte: <http://www.bnet.com>. Modificada.

É possível perceber que a evolução da infecção causada pelo HIV-1 varia em diferentes indivíduos. Em uma minoria das pessoas infectadas pelo HIV-1, a evolução da doença é relativamente lenta e essas são conhecidas como progressores lentos (LP). Alguns indivíduos não apresentam sintomas algum nos estágios iniciais da doença, isto é, os sintomas só são manifestados muito após o período de incubação. Esses são chamados moderadamente progressores (MP). A maioria dos indivíduos contaminados com o HIV-1 passa a apresentar os sintomas logo após o período de incubação da doença e são denominados RP, isto é, rapidamente progressores (ABE-SANDES et al., 2010).

1.3 Estimativas da aids

Atualmente o número de pessoas vivendo com HIV-1/aids em todo o mundo é de 33,4 milhões (UNAIDS, 2007).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), o levantamento de dados acerca da quantidade de indivíduos portadores de HIV-1, põe o continente africano na primeira posição, com cerca de 22,5 milhões de pessoas contaminadas, seguido da região Sul e Sudeste da Ásia, com 4 milhões de casos relatados. A América Latina encontra-se na terceira colocação, compartilhando a mesma posição com Europa Oriental e Ásia Central, apresentando 1,6 milhões de infectados (Figura 3).

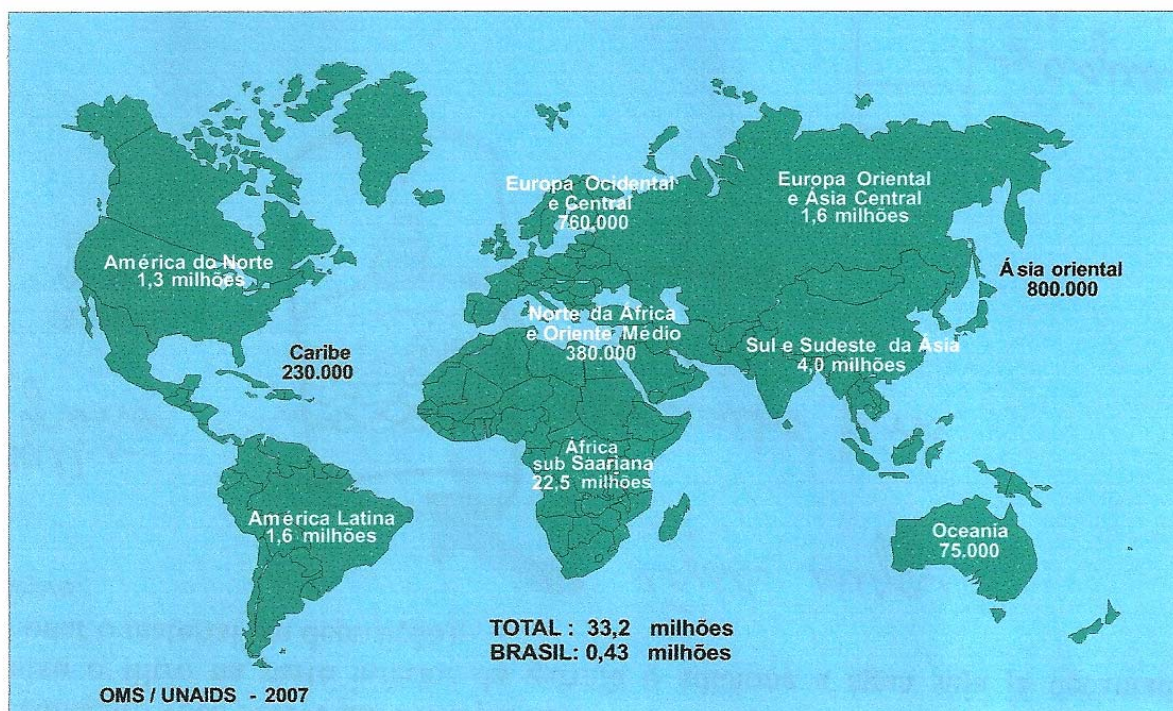


Figura 3 - Distribuição mundial do HIV-1
Fonte: UNAIDS (2007)

O Brasil é um dos países mais afetados pelo HIV-1 na América Latina. Os primeiros casos de aids em brasileiros foram oficialmente notificados em 1982, nas cidades de São Paulo e do Rio de Janeiro. O número de casos de aids, entre os anos de 1980 até 2010, no território brasileiro, divulgado pelo boletim epidemiológico do Ministério da Saúde, foi de 592.914 sendo que 58% dos casos encontram-se na região Sudeste, 19,5% no Sul, 12,5% no Nordeste, 4,2% na região Norte e 5,2% na região centro-oeste (BRASIL, 2010).

No final dos anos 80, a partir do eixo Rio-São Paulo, os casos de aids disseminaram-se para outras regiões como Porto Alegre, Recife, Curitiba, Belo Horizonte e Salvador. A partir daí houve uma difusão geográfica da doença em direção aos municípios de médio e pequeno porte do interior do País. Em 2004, a epidemia já atingia 79% dos 5.508 municípios brasileiros (BRITO, 2005). A figura 4 evidencia a distribuição do vírus HIV-1 nos municípios brasileiros.

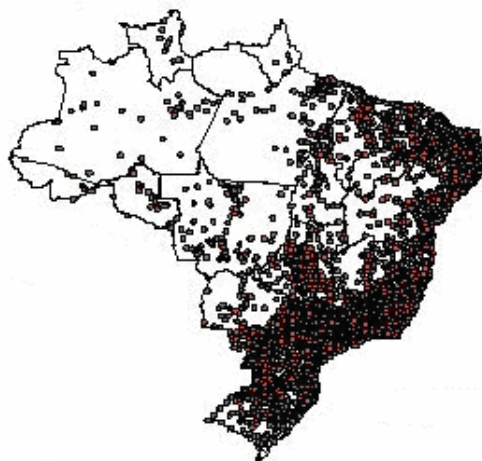


Figura 4 - Modelo de distribuição dos casos de HIV-1 nos municípios brasileiros (1980-2004)
Fonte: www.comciencia.com.br.

O município de Ribeirão Preto, situado na região nordeste do estado de São Paulo, registrou, desde o início da epidemia, de 1985 até setembro de 2009, cerca de 6.235 casos de aids (RIBEIRÃO PRETO, 2009).

A propagação da aids no território brasileiro, ao longo do tempo, vem sofrendo extensas transformações na sua evolução e distribuição social. Hoje, essa síndrome é marcada pelos processos de heterossexualização, feminização,

interiorização e pauperização. O aumento da transmissão por contato heterossexual tem resultado em um crescimento substancial de casos em mulheres, sendo apontado como o mais importante fenômeno para o atual momento da epidemia (BRITO, 2005; FELICIANO; KOVACS, 2003).

Em 1984, 71% dos casos de HIV-1 notificados referiam-se a homossexuais e bissexuais masculinos. Hoje, a via de transmissão heterossexual constitui a mais importante característica da dinâmica da epidemia no território brasileiro. Atualmente cerca de 60% dos casos notificados estão associados à transmissão sexual. A incidência entre as mulheres aumentou, em 1989 a razão de sexo era de cerca de 6 casos de aids no sexo masculino para cada 1 caso no sexo feminino. Em 2009, chegou a 1,6 casos em homens para cada 1 caso em mulheres. (BRASIL, 2009). Isso enfatiza que em apenas 20 anos houve uma crescente feminilização da doença, no Brasil (BRASIL, 2004). Segundo Feliciano e Kovacs (2003) esse aumento, nos casos femininos, está atrelado à população antes identificada como grupo não exposto, isto é, mulheres que tem um único parceiro e não usam drogas.

A pauperização também tem sido apontada como uma das características predominantes na infecção pelo HIV-1. Segundo o Ministério da Saúde (BRASIL, 2004), os casos de aids têm aumentado nas categorias de baixa escolaridade. Segundo os últimos dados encontrados, no ano de 2000 foi observado que 74% dos indivíduos contaminados eram analfabetos ou tinham cursado o ensino fundamental (BRASIL, 2004).

1.4 Transmissão Materno-Infantil do HIV-1

O primeiro caso de aids em crianças foi relatado em 1982, somente um ano após a descrição inicial da doença em adultos. Com o surgimento de mais casos de crianças com sintomatologia semelhantes evidenciou-se que tais indivíduos apresentavam, em comum, mães portadoras de HIV-1 (ORTIGÃO, 1995).

A principal via de infecção pelo HIV-1 em crianças é a transmissão materno-infantil (TMI) que se caracteriza pela transmissão da mãe infectada para o

seu conceito durante a gravidez, parto ou aleitamento materno. No Brasil, foi observado um aumento progressivo desta categoria em consequência direta da maior participação da mulher entre os casos de aids (BRITO, 2005). Em julho de 1994 havia um acumulado de 1748 casos nacionais de crianças com aids (ORTIGÃO, 1995). No entanto, desde 1997, após a introdução universal da terapia antirretroviral para gestantes de todo o país, observa-se uma redução significativa de novos casos de aids em crianças nascidas a partir daquele ano. Em 2004, foram notificados apenas 414 casos em menores de 13 anos (BRITO, 2005).

De acordo com o boletim epidemiológico do Ministério da Saúde, foram notificados no Brasil, entre os anos de 2000 e 2009, 54.218 casos de infecção pelo HIV-1 em gestantes, dos quais 40.999 (75,6%) se concentram nas Regiões Sul e Sudeste. Somente no ano de 2009, o número de casos no país foi de 6.104, sendo que a maioria das gestantes infectadas concentra-se na faixa etária de 20 a 29 anos, entre 4 e 11 anos de estudo e de raça/cor branca e parda (BRASIL, 2010).

Assim, estimativas para taxas de TMI do HIV-1 são de 3% entre gestantes sob terapia antirretroviral e 25 a 30 % para as não tratadas (THE INTERNATIONAL PERINATAL HIV GROUP, 1999).

Praticamente, todos os bebês portadores de HIV-1, após o nascimento apresentam anticorpos anti-HIV-séricos. Isso não se deve a produção de anticorpos pelo lactente, mas sim à passagem de anticorpos maternos via placenta. Espera-se que após 18 meses de idade, os anticorpos maternos sejam, definitivamente, substituídos pelos anticorpos naturais da criança (ORTIGÃO, 1995).

Na literatura existem evidências de que a infecção viral pode ocorrer até a oitava semana de gestação (LEWIS et al., 1990; SPRECHER et al., 1986). Os receptores CD4 dos linfócitos fetais começam a surgir ao final do primeiro trimestre de gestação, o que exclui a possibilidade de contágio embrionário. Os vírus que estão livres na corrente sanguínea da mãe cruzam a placenta por transporte ativo ou por meio de células trofoblásticas. Algumas dessas células expressam o receptor CD4 e, portanto, podem servir de alvo para o HIV-1 (MAURY et al., 1988 apud ORTIGÃO, 1995).

Lactentes que foram infectados por transmissão vertical, em geral, podem apresentar retardo neuropsicomotor e sinais clínicos mais precocemente do que aqueles infectados por via sanguínea (MANCHE et al., 1990 apud ORTIGÃO, 1995). A infecção periparto pode ocorrer por meio do contato com sangue ou secreções

maternas podendo contaminar o recém nascido através de mucosas ou microlesões cutâneas (VOGT et al., 1986).

Casos de contaminação pelo HIV-1 também têm sido atribuídos ao leite materno de mães que se soroconverteram no período pós-parto. Na literatura constam relatos de detecção de vírus em culturas de leite materno e em PCR (reação de polimerase em cadeia) no leite de mulheres soropositivas que apresentavam ou não sintomas (THIRY et al., 1985 apud ORTIGÃO, 1995).

O diagnóstico da infecção pelo HIV-1 em filho de mãe convivendo com HIV-1 é complexo, já que os anticorpos maternos do tipo IgG podem ser detectados até 18 meses após o parto. A imunoglobulina IgG anti-HIV mantida a partir desta idade é considerada indicadora de infecção na criança, e não mais passagem passiva de anticorpos maternos pela placenta. Contudo, este tipo de diagnóstico torna tardia a detecção de anticorpos (BRASIL, 2001). Nestas crianças, a avaliação mais precoce pode ser realizada utilizando-se a dosagem da glicoproteína p24, a amplificação do genoma viral através da polymerase chain reaction (PCR) ou a cultura do vírus. Quando o exame é realizado 30 dias após o nascimento, estas técnicas apresentam sensibilidade maior que 90%. Antes do 1º mês do nascimento, a positividade destes testes depende do momento da TMI. Se intra-útero, o vírus será detectado precocemente; se intra-parto, os testes somente serão positivos posteriormente (BRASIL, 2001).

Assim, o Ministério da Saúde recomenda que o diagnóstico da infecção neonatal seja realizado através da PCR com seis semanas, três meses e aos cinco meses de idade. Dois testes positivos ou negativos confirmam ou descartam, respectivamente, a infecção pelo HIV-1. Caso não se disponha destes exames específicos, o seguimento deverá ser realizado pela detecção de anticorpos anti HIV-1 (ELISA ou Western Blot), até que a criança complete 18 meses de idade, quando já não deve haver mais anticorpos maternos circulando no seu sangue (BRASIL, 1998).

Adicionalmente, foi proposto um fluxograma utilizando a quantificação da carga viral, visando à detecção da infecção pelo HIV-1 em crianças com idade entre dois meses e dois anos. Duas quantificações do RNA com resultado "indetectável" sugerem que a criança não está infectada, devendo-se, contudo, manter o acompanhamento clínico e realizar sorologia anti-HIV aos dois anos de idade (BRASIL, 2001).

Medidas para prevenir a TMI do HIV-1 passaram a ser implementadas no Brasil desde 1996. Atualmente, as medidas recomendadas são: 1) todas as gestantes devem receber o oferecimento do teste para o HIV-1, independente de qualquer avaliação de risco; 2) as gestantes soropositivas devem receber AZT via oral, em três doses diárias de 200mg, a partir da 14^a semana até o final da gestação e, durante o trabalho de parto, AZT intravenoso, na dose de 2mg/kg de peso na primeira hora e 1mg/kg/hora até o clameamento do cordão umbilical – em caso de cesárea programada, a infusão intravenosa deve começar três horas antes do início da cirurgia; 3) todos os recém-nascidos expostos ao HIV-1 devem receber AZT via oral, na dose de 2mg/kg, quatro vezes ao dia, durante seis semanas. O aleitamento materno é contra-indicado.

As gestantes que, pela evolução de sua condição clínica ou laboratorial, já estão em uso de terapia antirretroviral devem avaliar os riscos e benefícios da manutenção desta terapia, principalmente no primeiro trimestre da gravidez. Aquelas que não estão em uso de antirretrovirais, mas que se apresentam sintomáticas ou com parâmetros laboratoriais muito alterados, devem considerar o uso de terapia combinada. A cesariana é recomendada para as gestantes com carga viral desconhecida ou 1.000 cópias/mL (BRASIL, 2001).

Considerando que as estimativas para taxas de TMI do HIV-1 são de 25 a 30% para as gestantes que não utilizam o tratamento preventivo (THE INTERNATIONAL PERINATAL HIV GROUP, 1999), o fato de 70 a 75% dos recém-nascidos não serem verticalmente infectados, apesar da contínua exposição viral durante a gestação, sugere a existência de barreiras naturalmente protetoras que previnem a transmissão perinatal do HIV-1.

1.5 Gene CCR-5 (*C-C chemokine receptor 5*) e CCR5-Δ32

O receptor CCR5, membro da família das quimiocinas, está presente em células do sistema imunológico como os macrófagos e os linfócitos T, desenvolvendo um importante papel na migração de células para os locais de inflamação. As quimiocinas são proteínas sintetizadas pelas células do sistema

imunológico, que tem como principal função direcionar o tráfego de células de defesa para os locais de infecção, facilitando a resposta imunológica (MARRERO et al., 2006). O CCR5 serve como um correceptor para a infecção do HIV-1 (DENG et al., 1996). Uma variante dessa versão, o alelo CCR5- Δ 32 foi descrito no mesmo ano da descoberta do CCR5 (LIU et al., 1996).

A entrada do HIV-1 nas células-alvo dá-se pela fusão das glicoproteínas virais, gp41 e gp120, presentes no envelope viral, com o receptor de células humanas, o CD4, presentes nas membranas de linfócitos T e macrófagos, e com os correceptores CCR5 e CXCR-4, membros da família de quimiocinas, cujos genes estão localizados no braço curto do cromossomo 3 de humanos (Figura 7). No momento da infecção o correceptor CCR5 é via preferencial em relação ao CXCR-4 que, em geral, é utilizado por alguns isolados virais na fase final da doença (PHILPOTT, 2003).

O CCR5- Δ 32 é um alelo mutante resultante da deleção de 32 pares de bases (pb) da região codificadora do gene CCR5 acarretando em um códon de parada prematuro que produz um receptor não funcional na superfície celular. No caso do locus CCR5, a baixa frequência dos alelos mutados indica que esse genótipo protetor é de rara confirmação (CARVALHARES et al., 2005). Algumas investigações propõem que esse alelo tenha se originado de uma única mutação, ocorrida no Nordeste Europeu, há poucas centenas de anos (MARRERO, 2006). Isso explica a alta incidência desse alelo mutante em europeus (5-15%) e a incidência muito baixa em africanos e asiáticos (ABE-SANDES et al., 2010).

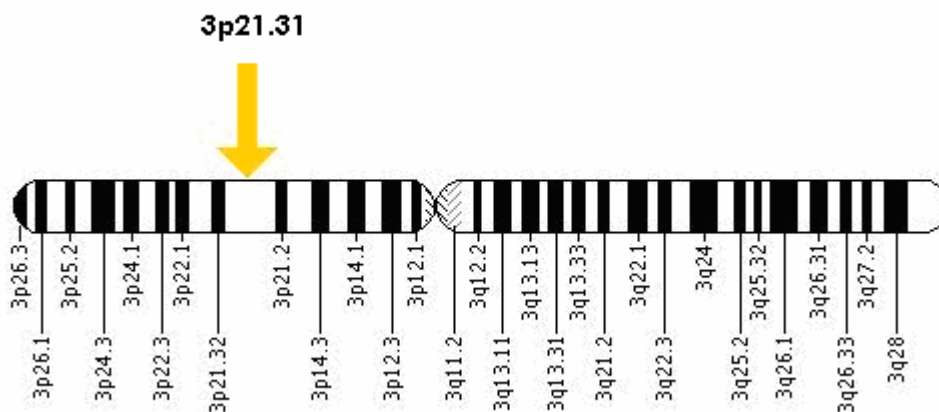


Figura 5 - Localização do gene CCR5, no braço curto do cromossomo 3
Fonte: <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/CCR5>. Adaptada.

A ocorrência de mutações nas sequências do gene que expressam as proteínas que constituem o receptor CD4 pode acarretar na ineficácia da célula alvo em apresentar um correceptor que seja reconhecido pelas proteínas ligantes dos vírus o que, em alguns casos, impossibilita a inserção do material genético viral no interior da célula (GRAY et al., 2006).

Recentemente, o gene CCR5 é um dos mais relatados casos de seleção natural no genoma humano e tem sido o foco de pesquisa de muitos geneticistas, pois uma variante desse gene (CCR5- Δ 32) demonstra um importante papel biológico na entrada do HIV-1 nas células (SABETI et al., 2005).

De início acredita-se que o gene CCR5 foi objeto de uma seleção positiva de altas proporções, sugerindo uma pressão de seleção para um aminoácido divergente (STEPHENS, 1998). A seleção positiva pode gerar uma alta frequência da mutação na população criando uma disparidade entre a idade do alelo mutado e a frequência desse na população, o que caracteriza uma ligação desequilibrada (LD = linkage disequilibrium), típico de alelos antigos (SABETI et al., 2002). Stephens (1998) relatou que a LD entre o CCR5- Δ 32 e dois marcadores microsatélites sugere que a idade do alelo mutado é de apenas 700 anos e que altas frequências desse já podem ser encontradas em caucasianos europeus (5-14% com gradiente norte-sul e leste-oeste). Segundo os autores, essa aparente alta frequência pode ser resultado de uma pressão seletiva causada por um agente seletivo, como ocorreu no caso da peste bubônica, na Europa Medieval.

A teoria mais aceita para o início da dispersão dessa mutação aponta para o norte da Europa com gradiente norte-sul, coincidindo com a migração dos Vikings, há cerca de 700 anos (LUCOTTE, 2001). Segundo Novembre, Galvani e Slatkin (2005) é possível que essa mutação estivesse associada com a capacidade adaptativa, das populações antepassadas da Europa, às infecções por vírus endêmicos como, por exemplo, formas ancestrais da varíola. Uma alta frequência do alelo mutante pode ser encontrada entre caucasianos da América do Norte e Europa. Cerca de 1% dos indivíduos dessas populações apresentam genótipo homozigoto.

Indivíduos homozigotos para o alelo CCR5- Δ 32 são resistentes à infecção ao HIV-1, pois nesses há ausência do correceptor CCR5 nos linfócitos, que é um pré-requisito para a entrada do HIV-1 (O'BRIEN; MOORE, 2000). Os heterozigotos expressam metade dos níveis de correceptores CCR5, o que causa diminuição da replicação, expansão e patogenicidade do HIV-1 (BENKIRANE et al., 1997).

Indivíduos heterozigotos para a mutação apresentam uma progressão mais lenta no desenvolvimento da infecção do HIV-1 (OH et al., 2008). Já, populações que não apresentam essa mutação demonstram uma taxa muito reduzida de não desenvolver a síndrome, como no caso de populações subsaarianas (LUCOTTE, 2001). De acordo com Gray et al. (2006) indivíduos que possuem a deleção em homozigose no gene CCR5 apresentam uma probabilidade elevada de não desenvolverem a patologia sendo, no entanto, portadores e transmissores dos vírus. No entanto, a forte resistência proporcionada pela homozigose não é absoluta. OH et al. (2008) relataram um número diminuto de indivíduos, que mesmo nessa condição, foram diagnosticados como soropositivo em estudos do tipo caso-controle. Os autores ainda relataram que uma parte considerável dos indivíduos analisados estavam contaminados com uma variante do vírus mais propenso a infectar as células por meio dos receptores CXCR-4, sendo que, nesses casos, há a possibilidade de que os vírus infecte monócitos ou células dendríticas diferenciadas usando essas células como reservatórios e permanecendo em latência por longos períodos.

1.6 Justificativa

Atualmente, no cenário da infecção pelo HIV-1/aids, destaca-se o aumento crescente de casos entre mulheres, principalmente aquelas em idade fértil, refletindo assim, para a maior possibilidade de ocorrência de TMI do HIV-1. Considerando que: 1) a principal via de infecção pelo HIV-1 em crianças é a transmissão materno-infantil, 2) permanece controverso o papel dos mecanismos envolvidos, especificamente o de polimorfismos de genes associados à infecção do HIV-1, 3) a influencia do CCR5 tem sido associada à resistência ou não da infecção pelo HIV-1, 4) os estudos acerca do CCR5 podem contribuir para elucidar parte dos mecanismos patogênicos envolvidos na TMI do HIV-1. Ademais, o estudo corrobora para que a enfermagem, fundamentada em ciências básicas, esteja envolvida e inserida no desenvolvimento de conhecimentos e tecnologias, oferecendo importantes contribuições para a aplicação dos resultados da investigação nas intervenções especializadas e prestação do cuidado.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

Avaliar a influência do polimorfismo do gene do CCR-5 na transmissão materno-infantil do HIV-1.

2.2 Objetivos Específicos

- a) Tipificar os alelos CCR-5 em mulheres portadoras do HIV-1 que possuam filhos que foram ou não infectados verticalmente;
- b) Tipificar os alelos CCR-5 em filhos portadores ou não do HIV-1, que possuam mães com sorologia positiva para o HIV-1;
- c) Analisar possíveis associações do polimorfismo do gene do CCR-5 na transmissão materno-infantil do HIV-1.

3.1 Delineamento do Estudo

Trata-se de um estudo tipo caso-controle, descritivo, incluindo mulheres e filhos, selecionados no Ambulatório de Moléstias Infecciosas em Ginecologia (AMIG), no Ambulatório de Moléstias Infecciosas em Ginecologia Obstetrícia (AMIGO) e no Ambulatório de Pediatria da Unidade Especial de Tratamento de Doenças Infecto-contagiosas (UETDI) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HC-FMRP/USP).

Além das análises em amostras biológicas, estas mulheres também foram entrevistadas, por intermédio de um questionário semi-estruturado (anexo 1) abordando questões relacionadas aos aspectos comportamentais, como utilização e aderência ao tratamento antirretroviral e aleitamento materno. As questões foram elaboradas e revisadas pelos pesquisadores, e ordenadas em uma sequência lógica para encorajar a colaboração, sinceridade e o comportamento natural das mulheres.

3.2 Local de Estudo

O estudo foi realizado no Ambulatório de Moléstias Infecciosas em Ginecologia (AMIG), no Ambulatório de Moléstias Infecciosas em Ginecologia e Obstetrícia (AMIGO) e no Ambulatório de Pediatria da Unidade Especial de Tratamento de Doenças Infecto-contagiosas (UETDI) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HCFMRP/USP). Trata-se de um hospital geral, universitário, situado na cidade de Ribeirão Preto, integrado ao Sistema Único de Saúde, onde são desenvolvidas atividades de assistência, ensino e pesquisa, desde 1956. Nos ambulatórios são realizadas consultas médicas, assistência de enfermagem, atendimento psicológico e assistência social. Estes ambulatórios constituem um serviço de referência para o atendimento de mulheres, gestantes ou não, e crianças portadoras de moléstias infecciosas para a cidade de Ribeirão Preto e região. O AMIGO funciona às segundas-feiras, das 14 às 17 horas, o AMIG, de terça-feira das 07 às 12 horas e o Ambulatório de Pediatria, de sexta-feira das 14 às 17 horas.

3.3 População de Estudo

Para analisar as possíveis associações do polimorfismo do gene CCR-5 na transmissão materno-infantil do HIV-1, foram avaliadas 82 duplas de mãe-filho, ou seja, mulheres portadoras do HIV-1 e seus respectivos filhos, sub-agrupadas em duas categorias:

- a) Grupo de transmissão positiva (TMI+), ou seja, 26 duplas de mãe e filho em que a transmissão materno-infantil da infecção pelo HIV-1 tenha ocorrido;
- b) Grupo transmissão negativa (TMI-), ou seja, 56 duplas de mãe e filho em que a transmissão materno-infantil da infecção pelo HIV-1 não tenha ocorrido.

3.4 Critérios de Inclusão

a) Grupo Transmissão Positiva (TMI+):

- Mulheres, acima de 18 anos de idade, soropositivas para anticorpos contra o HIV-1, que possuam pelo menos um filho que foi infectado verticalmente;
- Filho com sorologia positiva para anticorpos contra o HIV-1, após 18 meses de idade;
- Pacientes que utilizaram ou não a terapia antirretroviral durante a gestação/parto;
- Pacientes que aceitem participar do estudo.

b) Grupo Transmissão Negativa (TMI-):

- Mulheres, acima de 18 anos de idade, soropositivas para anticorpos contra o HIV-1, que possuam pelo menos um filho que foi não infectado verticalmente;
- Filho deve apresentar sorologia negativa para anticorpos contra o HIV-1, após 18 meses de idade;
- Pacientes que utilizaram ou não a terapia antirretroviral durante a gestação/parto;
- Pacientes que aceitem participar do estudo.

3.5 Critérios de Exclusão

- Mulheres soropositivas para anticorpos contra o HIV-1 que não possuam filhos;
- Filhos com menos de 18 meses de idade;
- Filhos com sorologia para anticorpos contra o HIV-1 indefinida;
- Pacientes que não concordarem em participar do estudo

3.6 Aspectos Éticos

Este projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa, do HCFMRP-USP, e aprovado sob protocolo 9060/2006.

Ademais, os aspectos éticos do estudo fundamentaram-se na Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde (BRASIL, 1996), que dispõe sobre as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos. Com base nesta resolução, os riscos desta pesquisa estão relacionados ao procedimento de punção venosa para coleta de sangue das gestantes, em que pode haver um leve desconforto durante sua realização.

Durante o desenvolvimento do estudo, foram respeitadas as exigências éticas e científicas fundamentais para pesquisa envolvendo seres humanos, a saber:

- 1) Respeito à autonomia, que exige que os indivíduos que a possuem, e são capazes de considerar os prós e contras de suas decisões sejam tratados com respeito por sua capacidade e autodeterminação. Os grupos cuja autonomia é diminuída devem ser resguardados contra dano e abuso.
- 2) Ponderação entre riscos e benefícios, tanto atuais como potenciais, individuais ou coletivos (beneficência), comprometendo-se com o máximo de benefícios e o mínimo de danos e riscos.
- 3) Não maleficência, com a garantia de que danos previsíveis sejam evitados.

Relevância social da pesquisa com vantagens significativas para os sujeitos da pesquisa e minimização do ônus para os sujeitos vulneráveis, o que garante a

igual consideração dos interesses envolvidos, não perdendo o sentido de sua destinação sócio-humanitária (justiça e equidade).

Foi solicitado das pacientes o consentimento por escrito, após explicação completa e pormenorizada sobre a pesquisa. As pacientes foram esclarecidas quanto à liberdade para se recusarem a participar do estudo, ou retirar seu consentimento, em qualquer fase do mesmo, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado.

3.7 Instrumento de Coleta de Dados

Para coleta de dados, foram utilizadas análise de prontuário e entrevista norteada por um questionário semi-estruturado, abordando perguntas relacionadas à gestação, parto, amamentação e ao tratamento antirretroviral, além de dados sócio-demográficos (anexo 1). As entrevistas foram realizadas, após a obtenção do consentimento livre e esclarecido, em uma das salas do serviço de saúde descrito anteriormente, antes ou após a consulta médica, sendo que o sigilo e o anonimato foram preservados. A análise de prontuário foi realizada na sala de pesquisa do serviço de arquivo médico (SAM) do HCFMRP-USP em até 15 dias após a entrevista e consentimento da paciente.

3.8 Coleta de Material Biológico

Foram colhidos 10 ml de sangue venoso periférico de cada indivíduo gestante, em tubos Vacutainer (Beckton & Dickinson, USA), contendo EDTA K3 (0.054ml/tubo), utilizado para a extração de DNA para posterior tipificação de genes polimórficos.

No que diz respeito aos filhos das gestantes, foi realizada coleta de células da mucosa oral através de "swab", por ser considerado um método menos doloroso e invasivo para a criança. Os Swabs bucais do tipo "escovinha" foram

colhidos fazendo-se movimentos de rotação na parte interna da cavidade oral e colocados em tubo Vacutainer, contendo aproximadamente 4 ml de Cloreto de Sódio 0,9%. Após a coleta, foi realizada a extração do DNA.

3.9 Extração do DNA - Células do Sangue

O DNA das gestantes foi extraído por "salting out" a partir das células do sangue periférico, utilizando-se o procedimento descrito por Miller, Dykes e Polesky (1988). Assim, cerca de 10 ml do sangue total foram transferidos para um tubo de polipropileno de 50 mL, sendo adicionado quatro volumes de tampão de lise de glóbulos vermelhos (sacarose 0,3 M, TRIS-HCl 10 mM pH 7,5, MgCl 5 mM e TRITON X100 646,87g/mol a 1%). A solução era homogeneizada por inversão e centrifugada a 2400xg, por cinco minutos, a 4 °C. O sobrenadante era cuidadosamente desprezado e ao precipitado, adicionado 5 ml de tampão de lise de glóbulos brancos (NaCl 0,075 M, Na-EDTA 0,024 M, pH 8,0) em seguida 125 µL de SDS 10% e 1,1 mL de perclorato de sódio. A preparação foi agitada vigorosamente por dez segundos à temperatura ambiente. Para a extração de proteínas, foram adicionados 2 ml de NaCl saturado, agitando-se os tubos vigorosamente por 15 segundos. Após a centrifugação a 1500xg por cinco minutos à temperatura ambiente, o sobrenadante foi recolhido em um tubo de polipropileno de 50 ml e adicionados 7 ml de isopropanol absoluto, misturando-se cuidadosamente. Como etapa final da extração, a precipitação do DNA ocorreu por inversão manual lenta. O DNA precipitado foi retirado com auxílio de uma pipeta Pasteur selada e transferido para um tubo do tipo eppendorf de 1 ml. O DNA foi lavado duas vezes em um ml de etanol a 70% e redissolvido em 100 a 300 µL de água bidestilada deionizada e esterilizada (H₂O_{dd}). O DNA assim extraído foi quantificado por espectrofotometria em 260 e 280 nm. O grau de pureza do DNA extraído foi calculado pela razão entre as absorvâncias obtidas em 260 e 280 nm (A₂₆₀:A₂₈₀), sendo considerada adequada entre os valores 1,65 a 1,80. Quando os valores dessa razão foram inferiores a 1,5, o DNA foi precipitado novamente com álcool isopropílico seguindo descrição acima (etapa final da extração).

3.10 Extração do DNA de Células da Mucosa Oral

O DNA dos filhos, foi extraído segundo a metodologia descrita por Higuchi (1989), com pequenas modificações. Após homogeneização de tubo Vacutainer, é colocado aproximadamente 1 ml da amostra em um microtubo de polipropilino de 1,5 ml (tipo eppendorf), utilizando-se uma micropipeta e ponteiros estéreis. O conteúdo dos microtubos é centrifugado a 6.000 rpm durante 2 minutos. Descatar o sobrenadante e ressuspender o precipitado em 300 µL de tampão de lise de leucócitos (TrisHCl 0,01 M pH 8,5; KCl 50 mM; MgCl₂ 2,5 mM; NP-40 0,45%; Tween 20,45%), e adiciona-se 5 µL de Proteinase K (10 mg/ml em água) em cada microtubo. Encubar por, pelo menos 1 hora a 65°C e ao final desta incubação, a amostra foi aquecida a 94°C, por 10 minutos, para inativação da proteinase K, e estocada a -20°C até o momento da análise. Os passos seguintes seguem como na extração de sangue.

3.11 Amplificação dos segmentos de DNA

Os ensaios de PCR foram realizados utilizando-se uma mistura de reação constituída por :

- 15,75 µL de água deionizada, autoclavada;
- 2,5 µL de tampão de reação (IOX), fornecido com a enzima;
- 0,25 µL de solução de dNTP (20 mM);
- 2 µL de cada amostra do DNA genômico;
- 2,0 µL de cada iniciador, específico para cada loco;
- 0,5 U da enzima Biotools DNA polimerase.

O volume de cada um dos componentes, utilizados na mistura de reação da PCR, foi multiplicado pelo número de amostras a serem analisadas e misturados em tubos de 1,5 ml para garantir a homogeneidade das reações.

Uma alíquota de 2 µL de cada amostra do DNA genômico estocado foi

distribuída em microtubos de 500 µL, devidamente identificados, aos quais foi adicionada uma gota de óleo mineral, antes de serem aquecidos no termociclador, por 10 minutos, a 94°C. Após esta etapa, foram adicionados 21 µL da mistura de reação da PCR e imediatamente submetidos ao programa correspondente ao loco a ser analisado (TABELA 1). Em todas as análises, foi utilizado como controle negativo um tubo com água autoclavada no lugar do DNA.

Tabela 1 - Descrição das sequências iniciadoras, usadas para amplificar os segmentos de DNA

Locus	Localização	Seqüência dos Primers
CCR-5	3p21.3	5'-ATCACTTGGGTGGTGGCTGTGTTTGCGTCTC-3' 5'-AGT AGCAGATGACCATGACAAGCAGCGGCAG-3'

3.12 Programas utilizados para CCR5

- Etapa 1: 94°C por 4 minutos;
- Etapa 2 (30 ciclos): 94°C por 1 minuto; 70°C por 30 segundos, aumentando segundo por ciclo;
- Etapa 3: 72°C por 10 minutos, 4°C indefinidamente.

3.13 Ensaio de RFLP-PCR

Uma alíquota de 2 µL do produto da PCR de cada amostra foi distribuída em microtubos de 500 µL, aos quais foram adicionados 8 µL da seguinte solução:

- 1 µL de tampão de clivagem (IOX), fornecido com a enzima;
- 0,5 µL (IOU) da enzima *MspI* da BioLabs;
- 6,5 µL de água deionizada autoclavada.

O volume de cada urn destes componentes foi multiplicado pelo número de amostras a serem analisadas e misturados em tubos de 1,5 ml antes de serem distribuídos nos microtubos. Os microtubos contendo o produto da PCR e a solução de clivagem foram colocados em banho-maria a 37°C, por um período de quatro horas, para que os segmentos contendo os sítios de restrição fossem clivados e, posteriormente, submetidos a separação eletroforética.

3.14 Visualização dos segmentos de DNA

Para visualizar os segmentos de DNA, os produtos das PCRs foram devidamente preparados e aplicados em géis verticais de poliacrilamida 10% não desnaturantes, os quais foram submetidos a condições eletroforéticas específicas para cada loco e corados de acordo com o método de Sanguinetti, Dias-Neto e Simpson (1994).

3.15 Separação Eletroforética dos Produtos Amplificados

Os produtos da amplificação do loco CCR5 foram submetidos à eletroforese não desnaturante e para tanto 5 µL foram misturados com 5 µL do Tampão de Amostra e aplicados diretamente em gel de poliacrilamida 10% não desnaturante, sem necessidade de tratamento prévio.

Os géis de poliacrilamida não desnaturantes 10% foram preparados utilizando-se os seguintes componentes:

- 9,8 ml de água deionizada;
- 6,7 ml de acrilamida + bis-acrilamida (29: 1);
- 1,4 ml de glicerol
- 2,0 ml de tampão TBE IOX.

Aos géis foram acrescentados 300 µL de uma solução saturada de

persulfato de potássio e 15 µL de TEMED como catalisadores da reação de polimerização e, imediatamente, vertidas em cassetes previamente montados. Esses cassetes foram compostos por duas placas de vidro, sendo uma com recorte na borda superior, separadas com espaçadores laterais de 0,4 mm de espessura e presas com grampos de aço. Logo após verter os géis entre as placas, foi colocado um pente na borda superior, como molde para os poços de aplicação das amostras e dos padrões. Cerca de 30 minutos após, os géis estavam polimerizados e foram lavados com água destilada para serem acoplados as cubas de eletroforese vertical, contendo TBE 1X em ambos os pólos. Feito isto, as amostras e os padrões foram aplicados nos poços e as cubas foram ligadas à fonte de alta voltagem, com mA constante e tempo determinado para cada marcador.

3.16 Coloração com Nitrato de Prata

Ao término da eletroforese, o gel foi posto em 100 ml de solução fixadora (250 ml de álcool etílico, 2 ml de ácido acético e 500 ml de água deionizada) e adicionados 1 ml de Nitrato de Prata 10%. O conjunto foi mantido sob agitação por 5 minutos, após os quais a solução fixadora foi desprezada e o gel lavado em água por 15 a 30 segundos. Imediatamente após a lavagem, o gel foi posto em 100 ml de solução reveladora (NaOH 2,5% mais 1 ml de formaldeído, adicionado na hora do uso) e mantido sob agitação até o aparecimento das bandas. Após isto, a Solução Reveladora era descartada e a reação bloqueada com solução fixadora para que a leitura fosse realizada.

3.17 Registro dos resultados

Todos os alelos encontrados foram comparados com os imediatamente menores e maiores para se obter os padrões de fenotipagem e cada amostra analisada foi comparada com estes padrões. As amostras que possuíam alelos

iguais foram, posteriormente, comparadas, lado a lado, em outro gel, para confirmar os resultados. Após esta confirmação, foi selecionada uma amostra de cada alelo para compor as escadas alélicas dos locos analisados.

Após a leitura dos géis, estes foram digitalizados e secos, para serem arquivados. A secagem foi feita colocando-se o gel entre duas folhas de papel celofane, embebidas em água, sobre uma placa de vidro, à temperatura ambiente, por 2 ou 3 dias.

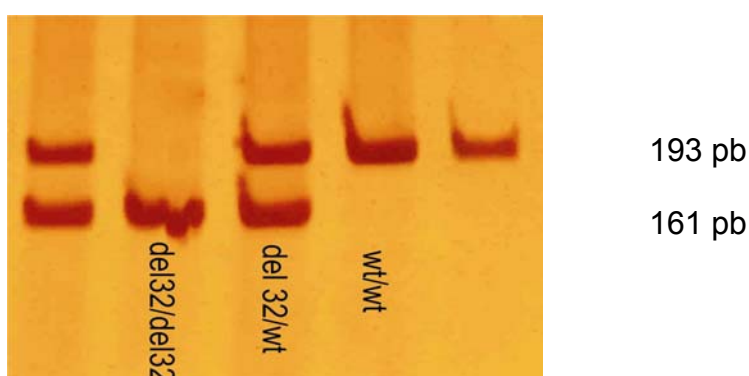


Figura 6 - Gel de poliacrilamida a 10% não desnaturante mostrando a mobilidade dos alelos dos locos analisados no gene CCR5

3.18 Análise Estatística

Após coleta dos dados os mesmos foram codificados e criou-se um banco de dados em EXCEL. Assim, para cada grupo de variáveis estudadas era realizada uma análise descritiva, na qual eram calculadas as medianas (SIEGEL, 1975).

As comparações das frequências dos grupos de alelos entre as duplas de mães e filhos com a TMI positiva e negativa foram realizadas utilizando-se o teste exato de Fisher. As análises estatísticas foram realizadas por meio do programa computacional GraphPad InStat (USA).

Para todos os testes utilizados, a hipótese de nulidade foi rejeitada, quando a possibilidade de ocorrência casual das diferenças observadas não excedia 5 % ($p < 0,05$).

4. RESULTADOS

4.1 Caracterização da População de Estudo

O grupo foi composto por 82 duplas de mães e filhos, sendo todas as mães portadoras de HIV-1. As mães apresentavam idades variando entre 18 e 43 anos ($\bar{x} = 26,28 \pm 5,70$ anos) e os filhos idades variando entre 1 e 17 anos ($x = 9,78 \pm 3,99$). De forma geral, 56/82 (68%) duplas formam o grupo de TMI negativa para o HIV-1 e 26/82 (31%) compõem o grupo de TMI positiva para o HIV-1.

Para o grupo de TMI negativa, no que se refere as mães, 34/56 (60,7%) consideravam-se brancas, 10/56 (17,8%) mulatas e 12/56 (21,4%) negras. No que se refere ao grau de escolaridade, 10/56 (17,8%) não concluíram o ensino fundamental, 16/56 (28,5%) possuem ensino fundamental completo, 17/56 (30,3%) possuem ensino médio incompleto, 13/56 (24%) concluíram o ensino médio e nenhuma possui ensino superior. Em relação a ocupação 45/56 (80,3%) não trabalham.

Considerando as relações afetivo-sexuais, houve predomínio de mulheres amasiadas, totalizando 22/56 (39,2%) das participantes, seguidas por 17/56 (30,3%) solteiras, 15/56 (26,7%) casadas, 1/56 (1,7%) viúva e 1/56 (1,7%) separada; 29/56 (51,7%) referem que seu relacionamento é estável (há mais de 5 anos) e residem com marido e filhos.

Em relação à descoberta da infecção pelo HIV-1, 32/56 (57,1%) das participantes relataram que ocorreu no momento do exame pré-natal, 11/56 (19,6%) descobriram após adoecimento por infecção oportunista, 8/56 (14,2%) realização de exames de rotina, 1/56 (1,7%) na sua infância, pois foi verticalmente infectada e 4/56 (7,1%) pela confirmação de soropositividade do cônjuge.

Referente ao parceiro, 14/56 (25,0%) relataram que seu parceiro também é portador do HIV-1, 20/56 (35,7%) relataram não ter conhecimento e 22/56 (39,2%) relataram que seu parceiro não é portador a infecção pelo HIV-1.

Quanto ao tratamento medicamentoso, 54/56 participantes (96,4%) aderiram ao tratamento com antirretrovirais durante o pré-natal e apenas 2/56 (3,5%) não aderiram ao tratamento. Durante o trabalho de parto, 41/56 (73,2%) referem ter recebido antirretroviral intravenoso, 9/56 (16%) não sabem informar e 6/56 (10,7%) referem que não receberam antirretroviral intravenoso durante o trabalho de parto.

Considerando o aleitamento materno, nenhuma das 56 mulheres referem ter amamentado seu filho.

Quando investigamos sobre a gravidez, 18/56 (32,1%) das mulheres disseram que a gravidez foi programada e 38/56 (67,8%) não pretendiam ter filhos. Como método contraceptivo 22/56 (39,2%) mulheres relatam uso do preservativo masculino, 2/56 (3,5%) utilizavam o anticoncepcional hormonal oral e 32/56 (57,1%) não faziam uso de nenhum método contraceptivo.

Para o grupo de TMI positiva, em relação às mães, 17/26 (65,3%) apresentam cor da pele branca, 7/26 (26,9%) mulatas e 2/26 (7,6%) negras. No que se refere ao grau de escolaridade, 15/26 (57,6%) não concluíram o ensino fundamental, 8/26 (30,7%) possuem ensino médio incompleto, 3/26 (11,5%) concluíram o ensino médio e nenhuma possui ensino superior. Em relação a ocupação 20/26 (76,9%) não trabalham.

Quanto às relações afetivo-sexuais, houve predomínio de mulheres amasiadas, totalizando 14/26 (53,8%) das participantes, seguidas por 6/26 (23,0%) solteiras, 5/26 (19,2%) casadas e 1/26 (3,8%) viúva; 12/26 (46,1%) relatam que seu relacionamento é estável (há mais de 5 anos) e residem com marido e filhos.

Em relação à descoberta da infecção pelo HIV-1, 19/26 (73,0%) descobriram após adoecimento por infecção oportunista e 7/26 (26,9%) pela confirmação de soropositividade do cônjuge. Em relação ao parceiro, 14/26 (53,8%) relataram que seu parceiro também é portador do HIV-1, 12/26 (46,1%) relataram não ter conhecimento.

Quanto ao tratamento medicamentoso apenas 4/26 (15,3%) participantes referem adesão ao tratamento com antirretrovirais durante o pré-natal e 22/26 (84,6%) não aderiram ao tratamento. Considerando o aleitamento materno apenas 1/26 (3,8%) mulheres refere ter amamentado seu filho. Durante o trabalho de parto 1/26 (3,8%) refere ter recebido antirretroviral intravenoso, 22/26 (84,6%) não sabem informar e 3/26 (11,5%) referem que não receberam antirretroviral intravenoso durante o trabalho de parto.

Quando investigamos sobre a gravidez, 23/26 (88,4%) mulheres não programaram ter filhos. Como método contraceptivo 5/26 (19,2%) mulheres relatam uso do preservativo masculino, 1/26 (3,8%) utilizava anticoncepcional hormonal oral e 20/26 (76,9%) não faziam uso de nenhum método contraceptivo.

Tabela 2 - Descrição do grupo de TMI negativa (n=56)

GRUPO DE TMI NEGATIVA							
Nº	SOROLOGIA	IDADE	COR DA PELE	ESTADO CIVIL	ARV GESTAÇÃO	ARV NO PARTO	AMAMENTOU
2	HIV-1+	35	BRANCA	SOLTEIRA	SIM	SIM	NÃO
2A	HIV-1-	1	BRANCA				
3	HIV-1+	25	BRANCA	AMASIADA	SIM	SIM	NÃO
3A	HIV-1-	1	BRANCA				
4	HIV-1+	32	BRANCA	SEPARADA	SIM	SIM	NÃO
4A	HIV-1-	1	BRANCA				
5	HIV-1+	21	BRANCA	AMASIADA	SIM	SIM	NÃO
5A	HIV-1-	1	BRANCA				
6	HIV-1+	35	BRANCA	SOLTEIRA	SIM	NÃO SABE	NÃO
6A	HIV-1-	9	BRANCA				
7	HIV-1+	38	BRANCA	AMASIADA	SIM	SIM	NÃO
7A	HIV-1-	1	BRANCA				
8	HIV-1+	30	BRANCA	SOLTEIRA	SIM	SIM	NÃO
8A	HIV-1-	1	BRANCA				
9	HIV-1+	23	BRANCA	CASADA	SIM	SIM	NÃO
9A	HIV-1-	1	BRANCA				
10	HIV-1+	30	BRANCA	CASADA	SIM	SIM	NÃO
10A	HIV-1-	1	MULATA				
11	HIV-1+	35	MULATA	VIUVA	SIM	SIM	NÃO
11A	HIV-1-	1	BRANCA				
12	HIV-1+	24	BRANCA	SOLTEIRA	SIM	SIM	NÃO
12A	HIV-1-	1	BRANCA				
13	HIV-1+	17	BRANCA	AMASIADA	SIM	SIM	NÃO
13A	HIV-1-	1	BRANCA				
14	HIV-1+	33	NEGRA	AMASIADA	SIM	SIM	NÃO
14A	HIV-1-	1	MULATA				
15	HIV-1+	22	BRANCA	CASADA	SIM	SIM	NÃO
15A	HIV-1-	21	BRANCA				
17	HIV-1+	37	BRANCA	AMASIADA	SIM	SIM	NÃO
17A	HIV-1-	1	BRANCA				
18	HIV-1+	32	BRANCA	AMASIADA	SIM	SIM	NÃO
18A	HIV-1-	1	BRANCA				

continua...

GRUPO DE TMI NEGATIVA							
Nº	SOROLOGIA	IDADE	COR DA PELE	ESTADO CIVIL	ARV GESTAÇÃO	ARV NO PARTO	AMAMENTOU
19	HIV-1+	40	BRANCA	AMASIADA	SIM	SIM	NÃO
19A	HIV-1-	1	BRANCA				
20	HIV-1+	22	BRANCA	SOLTEIRA	SIM	SIM	NÃO
20A	HIV-1-	1	BRANCA				
21	HIV-1+	29	BRANCA	AMASIADA	SIM	SIM	NÃO
21A	HIV-1-	1	BRANCA				
22	HIV-1+	33	BRANCA	CASADA	SIM	SIM	NÃO
22A	HIV-1-	1	MULATA				
23	HIV-1+	30	BRANCA	CASADA	SIM	SIM	NÃO
23A	HIV-1-	1	MULATA				
24	HIV-1+	29	BRANCA	SOLTEIRA	SIM	SIM	NÃO
24A	HIV-1-	1	BRANCA				
25	HIV-1+	26	NEGRA	AMASIADA	SIM	SIM	NÃO
25A	HIV-1-	2	MULATA				
29	HIV-1+	24	BRANCA	SOLTEIRA	SIM	SIM	NÃO
29A	HIV-1-	2	BRANCA				
30	HIV-1+	15	BRANCA	SOLTEIRA	SIM	SIM	NÃO
30A	HIV-1-	2	BRANCA				
31	HIV-1+	21	MULATA	SOLTEIRA	SIM	SIM	NÃO
31A	HIV-1-	2	BRANCA				
32	HIV-1+	28	BRANCA	CASADA	SIM	SIM	NÃO
32A	HIV-1-	2	BRANCA				
34	HIV-1+	35	BRANCA	AMASIADA	NÃO	NÃO	NÃO
34A	HIV-1-	2	MULATA				
35	HIV-1+	37	BRANCA	AMASIADA	SIM	SIM	NÃO
35A	HIV-1-	2	BRANCA				
36	HIV-1+	27	NEGRA	AMASIADA	SIM	SIM	NÃO
36A	HIV-1-	2	BRANCA				
39	HIV-1+	21	BRANCA	AMASIADA	SIM	SIM	NÃO
39A	HIV-1-	4	BRANCA				
40	HIV-1+	33	NEGRA	AMASIADA	SIM	SIM	NÃO
40A	HIV-1-	4	MULATA				
60	HIV-1+	26	NEGRA	AMASIADA	SIM	SIM	NÃO
60A	HIV-1-	2	BRANCA				

continuação...

GRUPO DE TMI NEGATIVA							
Nº	SOROLOGIA	IDADE	COR DA PELE	ESTADO CIVIL	ARV GESTAÇÃO	ARV NO PARTO	AMAMENTOU
61	HIV-1+	26	NEGRA	AMASIADA	SIM	SIM	NÃO
61A	HIV-1-	2	NEGRA				
62	HIV-1+	28	BRANCA	AMASIADA	SIM	NÃO SABE	NÃO
62A	HIV-1-	2	BRANCA				
66	HIV-1+	28	NEGRA	CASADA	SIM	SIM	NÃO
66A	HIV-1-	1	BRANCA				
67	HIV-1+	30	NEGRA	CASADA	SIM	SIM	NÃO
67A	HIV-1-	1	BRANCA				
69	HIV-1+	25	NEGRA	CASADA	SIM	SIM	NÃO
69A	HIV-1-	1	BRANCA				
70	HIV-1+	25	MULATA	CASADA	SIM	SIM	NÃO
70A	HIV-1-	1	BRANCA				
71	HIV-1+	25	MULATA	CASADA	SIM	SIM	NÃO
71A	HIV-1-	1	MULATA				
72	HIV-1+	25	MULATA	SOLTEIRA	SIM	SIM	NÃO
72A	HIV-1-	1	BRANCA				
73	HIV-1+	33	MULATA	SOLTEIRA	SIM	NÃO	NÃO
3A	HIV-1-	1	BRANCA				
74	HIV-1+	37	NEGRA	SOLTEIRA	SIM	NÃO SABE	NÃO
74A	HIV-1-	1	BRANCA				
76	HIV-1+	28	NEGRA	SOLTEIRA	SIM	NÃO	NÃO
76A	HIV-1-	1	BRANCA				
78	HIV-1+	37	NEGRA	SOLTEIRA	SIM	NÃO SABE	NÃO
78A	HIV-1-	1	MULATA				
79	HIV-1+	25	BRANCA	SOLTEIRA	SIM	SIM	NÃO
79A	HIV-1-	1	BRANCA				
80	HIV-1+	37	BRANCA	SOLTEIRA	SIM	NÃO	NÃO
80A	HIV-1-	1	BRANCA				
81	HIV-1+	28	BRANCA	SOLTEIRA	SIM	NÃO SABE	NÃO
81A	HIV-1-	1	BRANCA				
82	HIV-1+	32	MULATA	AMASIADA	SIM	NÃO	NÃO
82A	HIV-1-	2	BRANCA				
83	HIV-1+	32	MULATA	CASADA	SIM	NÃO	NÃO
83A	HIV-1-	2	BRANCA				

continuação...

GRUPO DE TMI NEGATIVA							
Nº	SOROLOGIA	IDADE	COR DA PELE	ESTADO CIVIL	ARV GESTAÇÃO	ARV NO PARTO	AMAMENTOU
84	HIV-1+	32	MULATA	CASADA	SIM	NÃO SABE	NÃO
84A	HIV-1-	2	BRANCA				
85	HIV-1+	23	MULATA	CASADA	SIM	NÃO SABE	NÃO
85A	HIV-1-	2	MULATA				
86	HIV-1+	28	BRANCA	AMASIADA	SIM	NÃO SABE	NÃO
86A	HIV-1-	2	BRANCA				
87	HIV-1+	23	BRANCA	CASADA	SIM	NÃO SABE	NÃO
87A	HIV-1-	2	MULATA				
88	HIV-1+	23	BRANCA	AMASIADA	SIM	SIM	NÃO
88A	HIV-1-	2	BRANCA				
89	HIV-1+	28	BRANCA	AMASIADA	NÃO	SIM	NÃO
89A	HIV-1-	2	BRANCA				

conclusão...

A. Descrição dos filhos

Tabela 3 - Descrição do grupo de TMI positiva (n=26)

GRUPO DE TMI POSITIVA							
Nº	SOROLOGIA	IDADE	COR DA PELE	ESTADO CIVIL	ARV GESTAÇÃO	ARV NO PARTO	AMAMENTOU
1	HIV-1+	29	MULATA	AMASIADA	NÃO	NÃO SABE	NÃO
1A	HIV-1+	8	MULATA				
16	HIV-1+	28	BRANCA	AMASIADA	NÃO	NÃO SABE	NÃO
16A	HIV-1+	6	BRANCA				
26	HIV-1+	33	BRANCA	CASADA	NÃO	NÃO SABE	NÃO
26A	HIV-1+	13	BRANCA				
27	HIV-1+	42	MULATA	AMASIADA	NÃO	NÃO SABE	NÃO
27A	HIV-1+	13	NEGRA				
28	HIV-1+	30	BRANCA	AMASIADA	NÃO	NÃO SABE	NÃO
28A	HIV-1+	11	BRANCA				
33	HIV-1+	33	BRANCA	AMASIADA	NÃO	NÃO SABE	NÃO
33A	HIV-1+	12	BRANCA				
37	HIV-1+	33	BRANCA	SOLTEIRA	NÃO	NÃO SABE	NÃO
37A	HIV-1+	13	BRANCA				
38	HIV-1+	24	NEGRA	SOLTEIRA	SIM	NÃO	NÃO
38A	HIV-1+	24	NEGRA				
41	HIV-1+	35	BRANCA	SOLTEIRA	NÃO	NÃO SABE	NÃO
41A	HIV-1+	13	BRANCA				
42	HIV-1+	38	BRANCA	SOLTEIRA	NÃO	NÃO SABE	NÃO
42A	HIV-1+	12	BRANCA				
43	HIV-1+	26	BRANCA	AMASIADA	SIM	NÃO SABE	NÃO
43A	HIV-1+	3	BRANCA				
44	HIV-1+	29	BRANCA	CASADA	NÃO	NÃO SABE	NÃO
44A	HIV-1+	8	BRANCA				
45	HIV-1+	32	BRANCA	CASADA	SIM	SIM	NÃO
45A	HIV-1+	1	MULATA				
46	HIV-1+	30	BRANCA	SOLTEIRA	NÃO	NÃO SABE	NÃO
46A	HIV-1+	24	BRANCA				
47	HIV-1+	35	BRANCA	SOLTEIRA	NÃO	NÃO SABE	NÃO
47A	HIV-1+	13	BRANCA				
48	HIV-1+	25	MULATA	CASADA	NÃO	NÃO SABE	NÃO
48A	HIV-1+	1	MULATA				

continua...

GRUPO DE TMI POSITIVA							
Nº	SOROLOGIA	IDADE	COR DA PELE	ESTADO CIVIL	ARV GESTAÇÃO	ARV NO PARTO	AMAMENTOU
49	HIV-1+	28	BRANCA	CASADA	NÃO	NÃO SABE	NÃO
49A	HIV-1+	8	BRANCA				
50	HIV-1+	30	BRANCA	AMASIADA	NÃO	NÃO SABE	NÃO
50A	HIV-1+	11	BRANCA				
51	HIV-1+	28	MULATA	AMASIADA	NÃO	NÃO SABE	NÃO
51A	HIV-1+	5	MULATA				
52	HIV-1+	30	BRANCA	VIUVA	NÃO	NÃO	SIM
52A	HIV-1+	12	BRANCA				
53	HIV-1+	34	MULATA	AMASIADA	NÃO	NÃO SABE	NÃO
53A	HIV-1+	14	MULATA				
54	HIV-1+	42	BRANCA	AMASIADA	SIM	NÃO SABE	NÃO
54A	HIV-1+	9	BRANCA				
55	HIV-1+	43	MULATA	AMASIADA	NÃO	NÃO SABE	NÃO
55A	HIV-1+	17	MULATA				
56	HIV-1+	29	MULATA	AMASIADA	NÃO	NÃO	NÃO
56A	HIV-1+	10	MULATA				
57	HIV-1+	26	NEGRA	AMASIADA	NÃO	NÃO SABE	NÃO
57A	HIV-1+	8	NEGRA				
58	HIV-1+	28	BRANCA	AMASIADA	NÃO	NÃO SABE	NÃO
58A	HIV-1+	8	BRANCA				

conclusão.

A. Descrição dos filhos

4.2 Polimorfismo do gene CCR-5

De acordo com a presença da TMI, 56/82 (68,2%) duplas apresentavam a TMI negativas (TMI -) e 26/82 (31,7%) TMI positivas (TMI +). De maneira geral, das 82 duplas de mães e filhos analisadas, 69/82 (84,1%) duplas não apresentavam a deleção de 32 pares de base ($\Delta 32$), ou seja, eram homozigotas para o CCR5 selvagem (wt/wt), 11/82 (13,4%) apresentaram heterozigose, ou seja, a presença da $\Delta 32$ para um dos membros, mãe ou filho, 1/82 (1,2%) apresentava heterozigose para ambos e 1/82 (1,2%) dupla apresentava a homozigose para o gene $\Delta 32$ no filho e a heterozigose para a mãe (Tabela 4).

Tabela 4 - Frequências dos genótipos, referentes ao polimorfismo do gene CCR-5, e a presença ou não da TMI do HIV-1 nas duplas analisadas

Quantidade de duplas	CCR-5 mãe	CCR-5 filho	TMI	TMI
69	(wt/wt)	(wt/wt)	47	22
6	(wt/wt)	($\Delta 32$ /wt)	5	1
5	($\Delta 32$ /wt)	(wt/wt)	3	2
1	($\Delta 32$ /wt)	($\Delta 32$ /wt)	0	1
1	($\Delta 32$ /wt)	($\Delta 32$ /wt)	1	0

Wt- selvagem, sem a presença da deleção no gene CCR5, $\Delta 32$ – presença da deleção no gene CCR5, TMI-transmissão materno-infantil

Foram realizadas várias análises, comparando os diferentes grupos incluídos neste estudo, estratificados de acordo com o *status* da transmissão materno-infantil do HIV-1 e presença ou não da deleção do gene CCR5.

Para a TMI positiva, apesar de encontrarmos 24/26 (92,3%) filhos, que foram infectados verticalmente, não apresentarem a deleção do gene CCR5 em comparação com 2/26 (7,7%) filhos que apresentavam a deleção do CCR5, não obtivemos diferença significativa ($p=1,0$). De maneira similar, ao compararmos a presença ou não da deleção do gene CCR5 nas mães, vimos que 23/26 (88,5%) das mães não apresentavam a deleção e 3/26 (11,5%) mães apresentavam a deleção

no gene CCR5, entretanto nenhuma diferença significativa foi detectada ($p=0,67$). Assim, quando as frequências referentes a presença ou não da deleção do gene CCR5 foram comparadas entre as duplas de mães e filhos, de acordo com o *status* da TMI do HIV-1, nenhuma diferença significativa foi observada.

Por outro lado, quando foi comparado o uso ou não da terapia antirretroviral com os grupos de TMI positiva ou negativa, durante a gestação e no momento do parto, diferenças significantes foram observadas. Houve significativa associação de mães que utilizaram a terapia antirretroviral, durante a gestação e no momento do parto, com a ausência da TMI do HIV-1 ($p = 0,0001$ e $p = 0,0146$, respectivamente). O conhecimento do diagnóstico da infecção pelo HIV-1, prévio à gestação também foi avaliado em relação a TMI. Foi significativa a associação de mães que tinham o conhecimento de seu *status* sorológico, prévio à gestação, com a ausência da TMI do HIV-1 ($p=0,0001$).

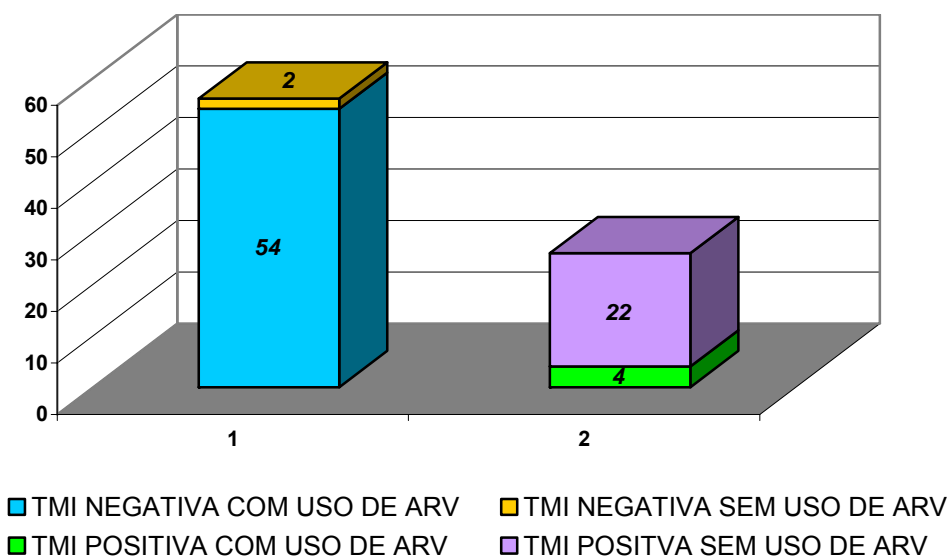


Gráfico 1 - O uso de antirretroviral (ARV) durante o pré-natal na TMI do HIV-1 (em valores absolutos, $p=0,0001$)

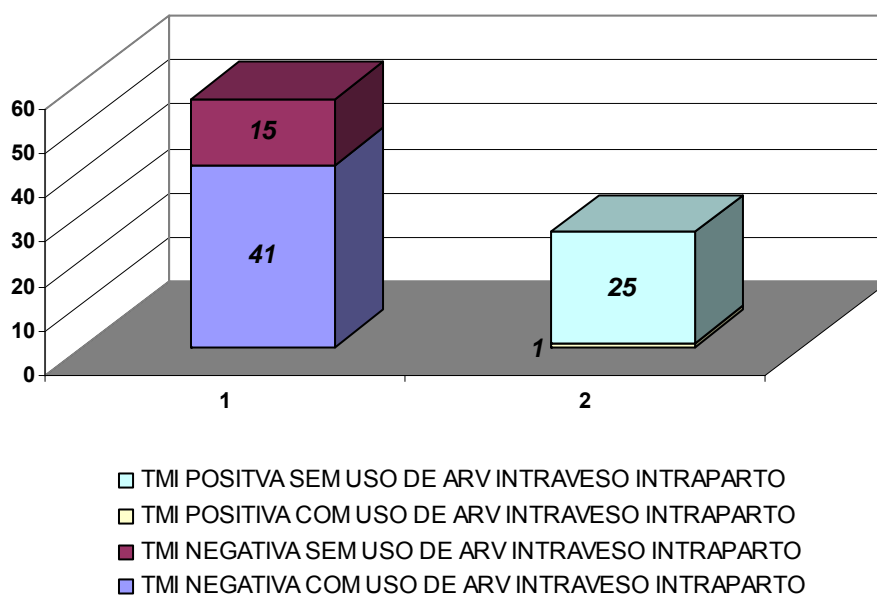
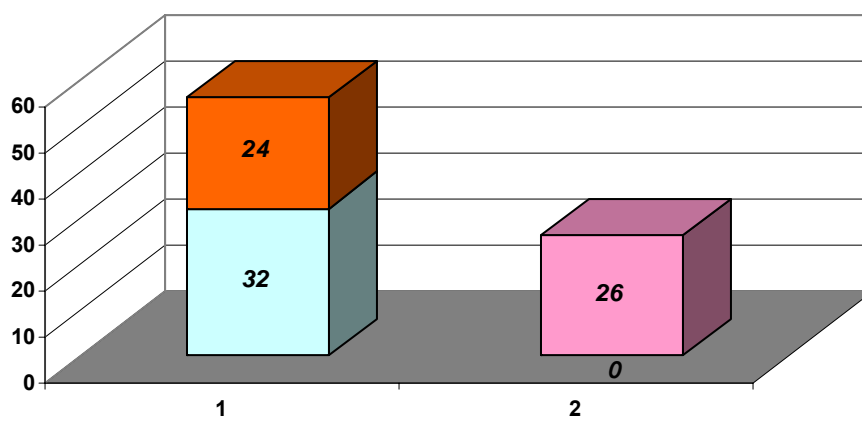


Gráfico 2 - O uso de antirretroviral (ARV) intravenoso intraparto na TMI do HIV-1 (em valores absolutos, p=0,014)



- GRUPO DE TMI POSITIVO: DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO PELO HIV-1 EM OUTROS MOMENTOS
- GRUPO DE TMI POSITIVO: DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO PELO HIV-1 NO PRÉ-NATAL
- GRUPO DE TMI NEGATIVA: DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO PELO HIV-1 EM OUTROS MOMENTOS
- GRUPO DE TMI NEGATIVA: DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO PELO HIV-1 NO PRÉ-NATAL

Gráfico 3 - O conhecimento do *status* sorológico prévio a gestação (em valores absolutos, $p=0,0001$)

5. DISCUSSÃO

A maioria dos estudos sobre a deleção do gene CCR5 é de cunho populacional. Tais estudos mostram que a alta frequência do alelo mutante pode ser encontrada entre caucasianos da América do Norte e Europa. Tem sido descrito que cerca de 1% dos indivíduos dessas populações apresentam genótipo homozigoto enquanto 10-20% exibem genótipo heterozigoto (SAMSON et al., 1996). De maneira similar, nossos resultados mostraram que nos 164 indivíduos analisados, a homozigose também foi detectada em apenas um indivíduo (0,7%) e a heterozigose em 14 indivíduos (10,1%). McNicholl et al. (1997 apud ANGELIS et al., 2007) relataram que a presença do alelo mutante pode estar associada à ascendência genômica, sendo que entre os afroamericanos essa proporção é de 6%, 7% entre os hispânicos, 13% entre os nativos americanos e 0,6% entre os asiáticos. Martinson et al. (1997) enfatizaram que em povos onde há altos índices de endogamia essa proporção pode chegar até 21%.

No Brasil, foram realizadas pesquisas sobre a frequência alélica da deleção do gene CCR5 (CCR5- Δ 32) em Alegrette (RS, Brasil). Não foram encontrados indivíduos homozigotos para a deleção, por outro lado, o genótipo heterozigoto foi encontrado em 14% de brancos, 8% de negros e 13% dos que se auto-declararam mulatos, indicando frequência alélicas de 6,8; 3,8 e 6,4%, respectivamente (MARRERO et al., 2006).

Alguns estudos sobre o gene CCR5 também tem sido feitos em relação à infecção pelo HIV-1. Carvalhares et al. (2005) estudando 110 indivíduos portadores do HIV-1 e 139 soronegativos, em Belém do Pará-Brasil, afirmou que a incidência do alelo CCR5- Δ 32 em pacientes soropositivos e soronegativos são similares, sendo 2,7% e 2,2% respectivamente.

Ainda em relação à deleção do CCR5 e a infecção pelo HIV-1, tem sido propostos estudos acerca da progressão da doença. Segundo Abe-Sandes et al. (2010) a frequência da mutação CCR5- Δ 32 poderia estar associada a diferentes tipos de progressão da aids. Em seus resultados, os autores estimaram a frequência da deleção CCR5- Δ 32 em 4,88% nos pacientes tipicamente progressores (TP) e em apenas 2,90% nos rapidamente progressores (RP). Angelis et al. (2007) estudaram a progressão da doença em 51 crianças, infectadas perinatalmente pelo HIV-1, que eram atendidas na Universidade Federal de São Paulo (SP, Brasil). Segundo os autores, 55% dos pacientes estudados exibiam um padrão da classe moderadamente progressor (MP), 35% eram rapidamente progressores (RP) e 10%

apresentaram progressão lenta (LP). Do total de pacientes estudados, 49 (96%) eram homozigotos para o tipo selvagem do gene CCR5 (wt/wt) e apenas 2 (4%) eram heterozigotos ($\Delta 32$ /wt), entretanto, os pesquisadores concluíram que não havia diferenças significativas entre as três classes estudadas em relação ao genótipo CCR5, idade e classificação imunológica, por outro lado, afirmaram que para a progressão clínica da aids, o alelo CCR5- $\Delta 32$ exibe uma tendência global não significativa no que diz respeito a proteção. Outro estudo sugere que o alelo mutante está associado com a diminuição do risco de morte entre crianças infectadas perinatalmente nos primeiros anos de vida (IOANNIDIS, 2003).

Na literatura podemos observar alguns estudos relacionados ao genótipo CCR5 com a progressão da aids (ABE-SANDES et al., 2010; AZEVEDO et al., 2003; CARVALHARES et al., 2005; MARTINSON et al., 1997; SAMSON et al., 1996); no entanto poucos trabalhos visam essa avaliação na TMI do HIV-1 (ANGELIS et al., 2007; IOANNIDIS, 2003; ROUSSEAU et al., 1997).

Mandl et al. (1998) analisando o impacto da presença da deleção do gene CCR5 na TMI do HIV-1 em 12 duplas de mães e filhos, sendo quatro duplas com a TMI positiva, não mostraram diferenças significantes, entretanto, sugeriram que há uma influência da deleção na transmissão vertical do HIV-1, pois sua presença estava maior entre as crianças não infectadas em comparação às infectadas. Este resultado foi similar aos nossos, visto que também não detectamos diferenças significantes ao compararmos a presença da deleção na TMI do HIV-1, mas observamos que há uma predominância da presença da deleção nos filhos não infectados em comparação aos que foram verticalmente infectados. Pedersen et al. (2007) também analisaram a influência da deleção do CCR5 e da carga viral materna na TMI do HIV-1 em Malawi e sugerem que a proteção esta mais relacionada com a carga viral materna reduzida do que a presença da deleção do gene CCR5. Rousseau et al. (1997) analisaram a presença da deleção do gene CCR5 em crianças que apresentaram ou não a TMI do HIV-1 e os resultados mostraram que não houve efeito protetor na amostra estudada. Por outro lado, Philpott et al. (1999) estudando filhos de mães portadoras do HIV-1, nos Estados Unidos, mostraram que as quatro crianças homozigotas para a deleção do CCR5 não foram verticalmente infectadas sugerindo proteção. Nosso resultado mostrou dado similar, pois foi detectado um filho homozigoto para a deleção do CCR5 que também não foi verticalmente infectado. Fortalecendo nossos achados, Edelstein et

al. (1997) também avaliaram a presença da deleção do CCR5 na TMI do HIV-1 e não encontraram associações com a heterozigose, visto que em sua amostra não foram encontradas crianças homozigotas para a deleção.

Relativo aos dados socio-demográficos de nossa amostra, salientamos que a utilização da terapia antirretroviral na gestação e parto foi significativamente associada à proteção da TMI do HIV-1. Assim, a promoção de intervenções que reduzam a carga viral materna é fundamental para a redução da TMI do HIV-1.

A TMI do HIV-1 tornou-se passível de prevenção desde 1994, quando os resultados do Protocolo 076 do *AIDS Clinical Trial Group* (ACTG 076) comprovaram que o uso da Zidovudina (AZT), reduz o risco da TMI do HIV-1 em 67,5%, quando usado durante a gestação (cápsulas), trabalho de parto e parto (intravenoso) e pelos recém-nascidos (solução oral) que foram alimentados exclusivamente com fórmulas infantil (CONNOR et al, 1994). Desde 1996 medidas para prevenir a TMI do HIV-1 passaram a ser implementadas no Brasil.

A taxa de transmissão do HIV-1 de mãe para filho durante a gravidez, sem qualquer tratamento, pode ser de 20% a 30%. Mas em situações em que a grávida segue todas as recomendações médicas, a possibilidade de infecção reduz para níveis menores que 3% (THE INTERNATIONAL PERINATAL HIV GROUP, 1999). Tais dados corroboram com nossa dificuldade em selecionar duplas de TMI positiva no ambulatório de pediatria da UETDI, visto que há cerca de dois anos não há inclusão de casos.

O conhecimento prévio da soropositividade materna também estava significativamente associado com a proteção a TMI em nossa amostra. Segundo o Ministério da Saúde a testagem para HIV-1 é recomendada no 1º trimestre, mas quando a gestante não teve acesso ao pré-natal adequado, o diagnóstico pode ocorrer no 3º trimestre ou até na hora do parto, o que aumenta os riscos para a TMI do HIV-1. (BRASIL, 2005).

Apesar do oferecimento da análise sorológica para detecção da infecção pelo HIV-1 e a distribuição gratuita do tratamento antirretroviral, no Brasil ainda existem problemas na identificação de gestantes soropositivas durante o pré-natal, fazendo com que muitas mulheres cheguem ao parto sem conhecer sua condição sorológica. Isto incide em parte devido ao baixo percentual de gestantes que realizam o pré-natal no Brasil, fato inquietante para a obtenção das metas recomendadas pelo Ministério da Saúde (NEVES, 2005).

No que diz respeito ao aleitamento materno, o risco de transmissão do HIV-1/aids pelo leite materno varia de 7% a 22%, sendo que a cada mamada, a criança fica mais exposta a adquirir o vírus (BRASIL, 2005). Em nossa casuística, em que houve a ocorrência da TMI do HIV-1, apenas uma mãe relatou ter amamentado seu filho.

Ainda, em relação aos aspectos sócio-afetivos, o fato de apenas 27/82 (32,9%) das participantes do estudo utilizarem preservativo como método contraceptivo, demonstra que, apesar da intensa divulgação, orientação e distribuição do método, este ainda é pouco utilizado entre casais com relacionamento estável, mesmo sendo o parceiro soropositivo para o HIV-1, destacando a necessidade de adotar estratégias que permeiem a cultura da população, visando barrar a evolução da infecção pelo HIV-1.

Nossos dados permitem observar que a maioria das mulheres participantes do estudo possuíam relacionamento afetivo estável, o que corrobora com a tendência do crescimento da epidemia entre mulheres, principalmente as com parceira sexual fixa.

O fato de a maioria das mulheres possuírem baixo nível educacional e não trabalharem corrobora o exposto por Herrera e Campera (2002), como fatores que contribuem para a vulnerabilidade feminina para a aids.

6. CONCLUSÕES

Este é o primeiro estudo brasileiro avaliando a influência da deleção do gene CCR5 na TMI do HIV-1.

Na presente casuística, não detectamos diferenças significantes ao compararmos a presença da deleção do gene CCR5 na TMI do HIV-1, nas duplas de mãe e filhos, mas observamos que há uma predominância da presença da deleção nos filhos não infectados em comparação aos que foram verticalmente infectados.

Ressaltamos a dificuldade para a identificação de duplas em que ocorreu a TMI do HIV-1, ou seja, filhos que foram verticalmente infectados pelo HIV-1. Fato este provavelmente relacionado ao tratamento medicamentoso com antirretrovirais e a suspensão do leite materno na alimentação, que podem estar relacionados ao baixo índice de TMI observado no estudo, demonstrando a importância do tratamento e orientação durante o pré-natal.

No que diz respeito à descoberta da infecção pelo HIV-1, 32/56 (57,1%) das mulheres, que compunham o grupo de TMI negativa, relataram que a descoberta ocorreu no pré-natal, destacando-o como importante estratégia para prevenção da TMI.

Em relação ao tratamento medicamentoso, os dados analisados comprovam que a adesão ao tratamento com antirretrovirais durante a gestação e o uso do antirretroviral intravenoso e intraparto diminuem as taxas de TMI para o HIV-1.

Várias são as estratégias de prevenção da TMI, entretanto, crianças ainda são infectadas, evidenciando-se que ainda há um amplo desafio na sua prevenção. Nesse contexto, a enfermagem pode contribuir com ações que envolvem o pré-natal, parto e puerpério, realizando aconselhamento quanto à realização do teste anti-HIV, utilização de antirretrovirais, promoção e o apoio de práticas ideais de alimentação infantil.

Destacamos que para enfermagem este projeto é de suma importância para a melhoria das estratégias de prevenção da disseminação do HIV-1 e para o desenvolvimento de tecnologias no cuidado de enfermagem.

REFERÊNCIAS

ABE-SANDES, K.; BOMFIM, F.T.; MACHADO, T.M.B; ABE-SANDES, C.; ACOSTA, A.X; ALVES, C.R.B.; FILHO, B.G.C. (2010). Ancestralidade genômica, nível socioeconômico e vulnerabilidade ao HIV/Aids na Bahia, Brasil. **Saúde Soc.**, São Paulo, v.19, p. 75-84, 2010. Suplemento 2.

ALKHATIB G.; COMBADIÈRE, C.; BRODER, C.C.; FENG, Y.; KENNEDY, P.E.; MURPHY, P.M. et al. CC CKR5: a RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV. **Science**, 1996 Jun 28;272(5270):1955-8.

ANGELIS, D.S.A.; FREIRE, W.S.; PANNUTI, C.S.; SUCCI, R.C.M.; MACHADO, D.M. (2007). CCR5 genotypes and progression to HIV disease in perinatally infected children. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 11, n. 2, p. 196-198, 2007.

ARTHUR, L.O.; BESS Jr., J.W.; SOWDER, R.C. 2nd.; BENVENISTE, R.E.; MANN, D.L.; CHERMANN, J.C. et al. Cellular proteins bound to immunodeficiency viruses: Implications for pathogenesis and vaccines. **Science**, v. 258, n. 5090, p. 1935-1938, Dec. 1992.

BARRÉ-SINOUSSE, F.; CHERMANN, J.C. ; REY, F.; NUGEYRE, M.T. ; CHAMARET, S. ; GRUEST, J. et al. Isolation of a T-tropic retrovirus from a patient at risk for acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). **Science**, v. 220, n. 4599, p. 840-842, 1983.

BENKIRANE, M.; JIN, D.Y.; CHUN, R.F.; KOUP, R.A. AND JEANG, K.T. (1997). Mechanism of transdominant inhibition of CCR5-mediated HIV-1 infection by ccr5Δ32. **Journal Biology Chemistry**, v. 2, n. 30, p. 603-606, 1997.

BRASIL. Ministério da Saúde. Coordenação Nacional de DST e Aids. **Boletim epidemiológico da aids – DST**. 2009. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/publicacao/boletim2009_preliminar.pdf>. Acesso em: 1 abr. 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Coordenação Nacional de DST e Aids. **Boletim epidemiológico da aids – DST**. 2010. Disponível em: <<http://www.aids.gov.br/publicacao/boletim-epidemiologico-2010>>. Acesso em: 10 jun. 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Coordenação Nacional de DST e Aids. **Guia de tratamento clínico da infecção pelo HIV em crianças**. Brasília, DF, 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Coordenação Nacional de DST/AIDS. **Guia de tratamento clínico da infecção pelo HIV em crianças**. Brasília, DF, 1998.

BRASIL. Ministério da Saúde. Mudanças na via de transmissão do HIV. **Boletim Epidemiológico AIDST**, Brasília, DF, v. 2, n. 1, 2005. Disponível em: <www.aids.gov.br>. Acesso em: 20 jun. 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Perfil socioeconômico dos casos de AIDS. **Boletim Epidemiológico AIDST**, Brasília, DF, v. 1, n. 1, 2004. Disponível em: <www.aids.gov.br>. Acesso em: 20 jun. 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS Sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa envolvendo seres humanos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 16 out. 1996. p. 21082-21085.

BRITO, A.M. **AIDS**: a evolução e a distribuição social da doença no país. 2005. Disponível em: <http://www.comciencia.br>. Acesso em: 20 jun. 2011.

CARVALHARES, F.A.P.L.; CARDOSO, G.L.; HAMOY, I.G.; LIU, Y.T. AND GUERREIRO, J.F. (2005). Frequencies of CCR5- Δ 32, CCR2-64 and SDF1-3'A mutations in Human Immunodeficiency Virus (HIV-1) seropositive Subjects and seronegative Individuals from the State of Pará in Brazilian Amazonia. **Genetics and Molecular Biology**, v. 28, n. 4, p. 665-669, 2005.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **Epidemiology notes and reports possible transfusion-associated acquired immune deficiency syndrome (AIDS)**. California, 1982a.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **Unexplained immunodeficiency and opportunistic infections in infants**. New York, 1982b.

CONNOR E.M.; SPERLING R.R.; GELBER, R.; KISELEY, P.; SCOTT, G.; O' SULLIVAN, M.J. et al. Reduction of maternal-infant transmission of human immunodeficiency virus type 1 with zidovudine treatment. **N Engl J Med.**, v. 331, n. 18, p. 1173-1180, 1994.

DENG H, LIU R, ELLMEIER W, et al. (1996). Identification of a major coreceptor for primary isolates of HIV-1. **Nature**, v. 381, p. 661-666, 1996.

EDELSTEIN, R.E.; ARCUINO, L.A.; HUGHES, J.P.; MELVIN, A.J.; MOHAN, K.M.; KING, P.D. et al. Risk of mother-to-infant transmission of HIV-1 is not reduced in CCR5/delta32ccr5 heterozygotes. **J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol.**, v. 16, n. 4, p. 243-246, Dec. 1997.

FELICIANO, K.V.O.; KOVACS, M.H. As necessidades comunicacionais das práticas educativas na prevenção da transmissão materno-fetal do HIV-1. **Revista Brasileira de Saúde Materna e Infantil**, v. 3, n. 4, p. 393-400, 2003.

GRAY, L.; CHURCHILL, M.J.; KEANE, N.; STERJOVSKI, J.; ELLETT, A.M.; PURCELL, D.F.J. et al. Genetic and functional analyses of R5X4 human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoproteins derived from two individuals homozygous for the CCR5_32 allele. **Journal of Virology**, v. 2, n. 1, p. 3684-3681, 2006.

HAHN, B.H.; SHAW, G.M.; COCK, K.M.; SHARP, P.M. AIDS as a zoonosis: scientific and public health implications. **Science**, v. 287, n. 5453, p. 607-614, 2000.

HERRERA, C.; CAMPERA, L. La vulnerabilidad e invisibilidad de las mujeres ante el VIH/SIDA: constantes y cambios en el tema. **Salud Pub Mex.**, v. 44, p. 555-564, 2002.

HIGUCHI, R. Simple and rapid preparation of samples for PCR. In: ERLICH, H.A. (Ed.). **PCR technology**. Stockton Press, 1989. p. 31-38.

HOGLUND, S.; OFVERSTEDT, L.G.; NILSSON, A.; LUNDQUIST, P.; GELDERBLOM, H.; OZEL, M. et al. Spatial visualization of the maturing HIV-1 core and its linkage to the envelope. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 8, p. 1-7, Jan. 1992.

IOANNIDIS, J.P. Effects of CCR5-delta32 and CCR2-641 alleles on disease progression of perinatally HIV-infected children: an international meta-analysis. **AIDS**, v. 86, n. 3, p. 367-377, 2003.

LEWIS, S.H.; FOX H.E.; REYNOLDS-KOHLER, C. and NELSON J.A. HIV-1 in trophoblastic and villous Hofbauer cell and haematological precursors in eight-week fetuses. **Lancet**, v. 335, p. 565-568, 1990.

LUCOTTE, G. Distribution of the CCR5 gene 32-pairbase deletion in West Europe: a hypothesis about the possible dispersion of the mutation by the Vikings in historical times. **Human Immunology**, v. 62, n. 1, p. 933-936, 2001.

LIU R, PAXTON WA, CHOE S, CERADINI D, MARTIN SR, HORUK R, MACDONALD ME, STUHLMANN H, KOUP RA, LANDAU NR 1996. Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. **Cell**, v. 86, p. 367-377, 1996.

Mandl CW, Aberle SW, Henkel JH, Puchhammer-Stockl E, Heinz FX. **Possible influence of the mutant CCR5 allele on vertical transmission of HIV-1.** *J Med Virol* 1998; 55:51–5.

MARRERO, A.E.V. Frequency of CCR5-Δ32 in Brazilian populations. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 39, p. 321-325, 2006.

MARTINSON, J.J.; CHAPMAN, N.H.; REES, D.C.; LIU, Y. and CLEGG, J.B. Global distribution of the CCR5 gene 32-basepair deletion. **Nat. Genetics**, v. 16, n. 1, p. 100-103, 1997.

MILLER, A.S.; DYKES, D.D.; POLESKY, H.F. A simple salting out procedure for extracting DNA for human nucleated cells. **Nucleic Acids Res.**, v. 16, n. 3, p. 1215, 1988.

NEVES, L.A.S. **Prevenção da transmissão vertical do HIV/aids: compreendendo as crenças e percepções das mães soropositivas.** 2005. 114 f. Dissertação (Mestrado) - Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2005.

NISHIMOTO, T.M.I.; ELUF NETO, J.; ROZMAN, M.A. Transmissão materno-infantil do vírus da imunodeficiência humana: avaliação de medidas de controle no município de Santos. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v. 51, n. 1, p. 54-60, 2005.

NOVEMBRE, J.; GALVANI, A.P.; SLATKIN, M. The geographic spread of the CCR5Δ32 HIV resistance allele. **Plos Biology**, v. 3, n. 11, p. 338-339, 2005.

O'BRIEN, S.J.; MOORE, J.P. The effect of genetic variation in chemokines and their receptors on HIV transmission and progression to AIDS. **Immunology Rev.**, v.4, n. 177, p. 99-111, 2000.

OH, D.Y.; JESSEN H.; KUCHERER C.; NEUMANN, K.; OH, N. and POGGENSEE, G. CCR5Δ32 genotypes in a German HIV-1 seroconverter cohort and reported HIV-1 infection in a CCR5Δ32 homozygous individual. **Plos One**, v. 3, n. 7, p. 2746-2747, 2008.

ORTIGÃO, M.B. AIDS em Crianças: considerações sobre a transmissão vertical. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 11, n. 1, p. 142-148, 1995.

PEDERSEN BR, KAMWENDO D, BLOOD M, MWAPASA V, MOLYNEUX M, et al. (2007) CCR5 haplotypes and mother-to-child HIV transmission in Malawi. **Plos One**, 2: e838. Find this article online

PHILPOTT, S.; BURGER, H.; CHARBONNEAU, T.; GRIMSON, R.; VERMUND, S.H.; VISOSKY, A. et al. CCR5 genotype and resistance to vertical transmission of HIV-1. **J Acquir Immune Defic Syndr.**, v. 21, n. 3, p. 189-193, Jul. 1999.

PHILPOTT, S.M. HIV-1 coreceptor usage, transmission and disease progression. **Curr HIV-Res**, v. 1, n. 2, p. 217-227, 2003.

RIBEIRÃO PRETO. (Cidade). Secretaria Municipal da Saúde. **Indicadores epidemiológicos 1985 a 2009**. 2009. Disponível em: <<http://www.cultura.ribeiraopreto.sp.gov.br/ssaude/programas/aids/dados-epidemiol-11-2006.pdf>>. Acesso em: 1 abr. 2010.

ROUSSEAU, C.M.; JUST, J.J.; ABRAMS, E.J.; CASABONA, J.; STEIN, Z.; KING, M.C. CCR5 Δ 32 in perinatal HIV-1 infection. **J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol.**, v. 16, n. 4, p. 239-242, Dec. 1997.

SABETI, P.C.; REICH, D.E.; HIGGINS, J.M.; LEVINE, H.Z.P.; RICHTER, D.J.; SCHSFFNER, S.F. et al. Detecting recent positive selection in the human genome from haplotype structure. **Nature**, v. 419, p. 832-837, 2002.

SABETI, P.C.; WALSH, E.; SCHSFFNER, S.F.; VARILLY, P.; FRY, B.; HUTCHESON, H.B. et al. The case for selection at CCR5- Δ 32. **Plos Biology**, v. 3, n. 11, p. 1-7, 2005.

SANGUINETT, C.J.; DIAS-NETO, E.; SIMPSON, A.J.G. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamid gels. **Biotechniques**, v. 17, p. 915-919, 1994.

SAMSON, M.; LIBERT, F.; DORANZ, B.J.; RUCKER, J.; LIESNARD, C.; FARBER, C.M. et al. Resistance to HIV-1 infection in Caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. **Nature**, v. 382, n. 6593, p. 722-725, 1996.

SIEGEL, S. **Estatística não-paramétrica para ciências do comportamento**. Rio de Janeiro: Macgraw Hill, 1975.

SPRECHER, S.; SOUMENKOFF, G.; PUISSANT, F.; DEGUELDRE, M. Vertical transmission of HIV in 15-week fetus, 1986. **Lancet**, v. 2, p. 288-289, 1986.

STEPHENS, J.C. Dating the origin of the CCR5- Δ 32 AIDs-resistance allele by the coalescence of haplotypes. **American Journal Human Genetics**, v. 62, p. 1507-1515, 1988.

STREICHER, H.Z.; REITZ Jr., M.S.; GALLO, R.C. Human immunodeficiency viruses. In: MANDELL, G.L.; BENNETT, J.E.; DOUGLAS, R.G. (Ed.). **Principles and practice of infectious diseases**. 5th ed. Florida: Churchill Livingstone, 2000. p. 1874-1887.

THE INTERNATIONAL PERINATAL HIV-1 GROUP. The mode of delivery and the risk of vertical transmission of human immunodeficiency virus type 1 – a meta-analysis of 15 prospective cohort studies. **New Engl J Med.**, v. 340, p. 977-987, 1999.

UNAIDS. **Aids epidemic uptade**. 2007. Disponível em: <unaid.org/en/>. Acesso em: 20 jun. 2011.

VAN HEUVERWYN, F.; LI, Y.; NEEL, C.; BAILES, E.; KEELE, B.F.; LIU, W. et al. Human imunodeficiency viruses: SIV infection in wild gorillas. **Nature**, v. 444, n. 7116, p. 164, 2006.

VERONESI, R.; FOCCACIA, R.; LOMAR, A.V. **HIV-1/AIDS**: etiologia, patogenia e patología clínica: tratamento e prevenção. São Paulo: Atheneu, 2000.

VOGT, M.W.; WITT, D.J.; CRAVEN, D.E.; BVINGTON, R.; CRAWFORD, D.F.; SCHOOLEV, R.T.; HIRSCH, M.S. Isolation of HTLV III/LAV from cervical secretions for women at risk for AIDS. **Lancet**, v. 1, n. 1, p. 525-527, 1986.

Anexo 1 – IDENTIFICAÇÃO

1-Iniciais: _____ Registro no HC _____

2- Estado civil:

- (1) Casado (2) Amasiado (3) Viúvo
(4) Desquitado (5) Solteiro (6) Outros _____

Há quanto tempo: _____ anos _____ meses

3- Naturalidade:

- (1) Ribeirão Preto (2) Região (3) Fora região (4) Outro Estado

4- Procedência:

- (1) Ribeirão Preto (2) Região (3) Fora região (4) Outro Estado

5- Data de nascimento: ____ / ____ / ____

6- Idade (anos):

- (1) 15 - 19 (4) 30 – 34 (7) 45 – 49 (10) 60 ou mais
(2) 20 – 24 (5) 35 – 39 (8) 50 - 54
(3) 25 – 29 (6) 40 – 44 (9) 55 - 59

7- Raça/cor:

- (1) Branca (2) Negra (3) Mulata (4) Amarela

8- Escolaridade:

- (1) Analfabeto (2) Fundamental Incompleto (3) Fundamental Completo
(4) Médio Incompleto (5) Médio Completo (6) Superior Incompleto
(7) Superior Completo (8) Pós-Graduação

TRABALHO

9- Profissão/Emprego: _____

MORADIA

10- Co-habitação

- (1) Esposa/Marido/Filhos (2) Mãe/Pai (3) Familiares
(4) Sozinho (5) Outros

DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO

11- Como você soube que era HIV-1 positiva? _____

12- Há quanto tempo você soube? _____

13- Você fez o exame pré-natal?

- (1) Sim (2) Não

14- Fez algum tipo de tratamento para o HIV-1 durante a gravidez?

(1) Sim (2) Não

15- Quais ARVs você usou e quando começou a usá-los? _____

16- Você usou algum ARV durante o parto?

(1) Sim (2) Não

17- Qual o tipo de parto realizado?

(1) Normal (2) Cesariana (3) Fórceps

ANTECEDENTES OBSTÉTRICOS

18- Nº de Gestações: G ()

Nº de Partos: N ()

Nº de Partos: C ()

Nº de Partos: F ()

Nº de abortos: A () Motivos: _____

19- Nº de filhos HIV-1 -, antes do diagnóstico ()

Nº de filhos HIV-1 -, após o diagnóstico ()

Nº de filhos HIV-1 +, após o diagnóstico ()

QUANTO À CRIANÇA

20- A criança fez tratamento anti HIV-1 após o nascimento?

(1) Sim (2) Não

Quais ARVs usou? _____

Por quanto tempo: início:.....término:.....atual:.....

ALEITAMENTO MATERNO:

21- A criança recebeu o seu leite?

(1) Sim (2) Não

Por quanto tempo? _____

STATUS SOROLÓGICO DA CRIANÇA

22- Sorologia atual: (1) HIV-1 + (2) HIV-1 - Colhida: ____/____/____

23- Período de Soroconversão: _____