

UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE MEDICINA

Departament d'Anatomia Patològica, Farmacologia i Microbiologia

**EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR
Y CONTROL DE LA TRANSMISIÓN
VERTICAL DEL VIH-1
EN UN ÁREA ENDÉMICA DE MALARIA DEL SUR DE MOZAMBIQUE**

Memoria presentada por María Lahuerta Sanaú para aspirar al grado de Doctor por la Universitat de Barcelona, bajo la dirección de los doctores Denise Naniche y Clara Menéndez.

Barcelona, Enero 2009



La Dra. Denise Naniche y la Dra. Clara Menéndez, del Centro de Investigación en Salud Internacional Barcelona certifican que la tesis doctoral titulada **"Epidemiología molecular y control de la transmisión vertical del VIH-1 en un área endémica de malaria del sur de Mozambique"** presentada por María Lahuerta Sanaú ha sido realizada bajo su dirección y cumple todos los requisitos que dicta la normativa para la presentación de tesis doctorales como compendio de publicaciones vigente en la Universitat de Barcelona y en la Facultat de Medicina desde el 24 de julio de 2008.

Dra. Denise Naniche

Dra. Clara Menéndez

Barcelona, Enero 2009

A mis padres

"Qué grande el mundo y qué pequeño..."

Qué lejos los amigos y qué cerca..."

Liber Falco

Como muchos ya sabéis, esta aventura empezó con un País semanal...Tras muchas mudanzas y nuevos amigos en el camino, esta Tesis llega a su fin...

En primer lugar, quiero agradecer a Clara y a Pedro por haberme dado la oportunidad de realizar la tesis doctoral en su grupo y por su continuo ejemplo de lucha para conseguir un mundo sin malaria. A Clara, codirectora de mi tesis, por su gran ayuda durante estos años.

A Denise, codirectora, supervisora y amiga, por todo lo que me ha enseñado profesional y personalmente, por su calidad humana y por haberme mostrado su apoyo hasta en los momentos más difíciles. En el fondo, Watson no existiría si no fuera por Sherlock!

A mi tutor, Julià González, por ayudarme junto con Quim Ruiz con las cuestiones burocráticas de la tesis.

Y como no, a todos mis compañeros de trabajo de Barcelona y Mozambique por haber hecho posible esta tesis doctoral y haber compartido conmigo tantos buenos momentos. Especialmente a mis compañeros del laboratorio de malaria por aguantarme y escucharme con una paciencia infinita desde cualquier rincón del mundo y por haberme regalado uno de los mejores cortometrajes del mundo... Déu n'hi do!!!

A mis amigos, en Valencia, Barcelona, Madrid, Guatemala y Nueva York, que me han animado con la tesis durante todos estos años. Gracias por estar siempre ahí!

A Juan, por enseñarme que nada es imposible y ayudarme a entender que nuestros sueños no tienen más límites que los que nos ponemos nosotros mismos.

A toda mi familia, y en especial a mi hermano Jorge por el diseño de esta tesis y a mis padres por su apoyo incondicional y por animarme siempre a seguir mis ilusiones.

Por último, a las mujeres y niños que participaron en estos estudios con la esperanza de que algún día el VIH/SIDA y la malaria sean un simple recuerdo del pasado.

ABREVIATURAS

AZT	Zidovudina
CRF	Formas recombinantes circulantes <i>Circulating Recombinant Forms</i>
d3T	Estavudina
IPT _p	Tratamiento intermitente preventivo en embarazo <i>Intermittent Preventive Treatment in Pregnancy</i>
ITN	Mosquiteras impregnadas con insecticida <i>Insecticide Treated Nets</i>
LBW	Bajo peso al nacer <i>Low Birth Weight</i>
MTCT	Transmisión de madre a hijo <i>Mother-to-Child Transmission</i>
NNRTI	Inhibidor de la transcriptasa reversa no nucleósido <i>Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor</i>
PM	Malaria placentaria <i>Placental Malaria</i>
sdNVP	Dosis única de nevirapina <i>Single Dose Nevirapine</i>
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
SP	Sulfadoxina-Pirimetamina
TARGA	Terapia antiretroviral de gran actividad
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana

PUBLICACIONES INTERNACIONALES QUE COMPONEN EL CUERPO DE LA TESIS DOCTORAL

Rapid spread and genetic diversification of HIV-1 subtype C in a rural area of southern Mozambique

Maria Lahuerta, Ester Aparicio, Azucena Bardaji, Sandra Marco, Jahit Sacarlal, Inacio Mandomando, Pedro Alonso, Miguel Angel Martinez, Clara Menendez, Denise Naniche.
AIDS Research & Human Retroviruses 2008, 24: 327-335

Factor de impacto (2007): 2,022

Cuartil: 1º

Mother-to-child transmission of HIV-1: association with malaria prevention, anaemia and placental malaria

Denise Naniche, Maria Lahuerta, Azucena Bardaji, Betuel Sigauque, Cleofe Romagosa, Anna Berenguera, Inacio Mandomando, Catarina David, Sergi Sanz, John Aponte, Jaume Ordi, Pedro Alonso, Clara Menendez.
HIV Medicine 2008, 9: 757-764

Factor de impacto (2007): 3,347

Cuartil: 1º

Resultados adicionales: Evaluación del impacto de la malaria materna en los niveles de citoquinas plasmáticas de mujeres VIH-positivas en el momento del parto

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1. VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA	1
1.1. Epidemiología de la infección por VIH	1
1.2. Epidemiología molecular del VIH	3
1.3. Transmisión del VIH-1 de madre a hijo	8
1.4. Epidemiología del VIH-1 en Mozambique	13
2. MALARIA	14
2.1. Epidemiología de la malaria	14
2.2. Malaria en el embarazo	15
3. INTERACCIÓN VIH-MALARIA	20
3.1. Impacto de la infección por VIH-1 en la infección por <i>P. falciparum</i>	20
3.2. Impacto de la malaria en la infección por HIV	22
OBJETIVOS	29
RESULTADOS	33
PRIMER ARTÍCULO	33
SEGUNDO ARTÍCULO	43
RESULTADOS ADICIONALES	57
DISCUSIÓN	63
CONCLUSIONES	79
REFERENCIAS	83

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA

1.1. Epidemiología de la infección por VIH

El África subsahariana sigue siendo la región más afectada por la epidemia del VIH/SIDA. Según las estimaciones de ONUSIDA/OMS del 2008, aproximadamente 33,2 millones [Intervalo de confianza (IC) 95%: 30,6-36,1 millones] de personas viven infectadas por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH-1), de las cuales las dos terceras partes (68%) viven en el África subsahariana [1]. De hecho, los 1,6 millones [IC 95%: 1,5-2,0 millones] de fallecimientos por SIDA en el África subsahariana representan el 76% de todos los fallecimientos por SIDA en el mundo. Además, y a diferencia de otras regiones, la pandemia del VIH/SIDA en esta región tiene un marcado cariz de género, ya que el 61% de las personas VIH-positivas y el 75% de infectados jóvenes (menores de 25 años) en el África subsahariana son mujeres [1].

A pesar de la reducción sustancial de la transmisión de VIH-1 de madre a hijo en los países desarrollados, la epidemia del VIH-1 sigue siendo especialmente devastadora en la población infantil en países en vías de desarrollo. Se calcula que aproximadamente 2,1 millones [IC 95%: 1,9- 2,4 millones] de niños menores de 15 años viven con el VIH-1 y 290.000 [IC 95%: 270.000-320.000] mueren cada año por la infección de VIH-1 [1]. Asimismo, se estima que cada día 1.800 niños se infectan con el VIH-1, casi la totalidad por transmisión de madre a hijo [2].

Las estimaciones de ONUSIDA/OMS para calcular el número de personas infectadas por el VIH-1 se basan en los datos de prevalencia de la infección en las mujeres embarazadas que acuden a las consultas prenatales, estudios comunitarios y vigilancia centinela en poblaciones con mayor riesgo de infección por el VIH-1. Para epidemias *generalizadas* (prevalencia del VIH-1 mayor del 1% y transmisión mayoritariamente heterosexual), las estimaciones se basan en los datos de las clínicas antenatales y, si están disponibles, en las encuestas de población.

Por el contrario, para epidemias *concentradas* (baja prevalencia), las estimaciones se basan en la vigilancia centinela de los grupos de riesgo.

Recientemente, ONUSIDA/OMS ha realizado revisiones de los métodos de recolección de datos y de la metodología para caracterizar la epidemia mundial de VIH-1. Las estimaciones del número de personas que viven con el VIH-1 a partir del 2007 presentan una reducción de 6,3 millones con respecto a las estimaciones del 2006, debido a la revisión y mejora de los datos de la India y de algunos países africanos. Además, la disponibilidad de encuestas nacionales de población está permitiendo una mejor estimación y conocimiento de la epidemia del VIH-1.

Las estimaciones del 2008 apuntan hacia una aparente estabilización de las tasas de prevalencia de VIH-1 en la mayoría de los países del África subsahariana excepto en Mozambique, donde se ha observado un aumento de la prevalencia del VIH con respecto a los datos anteriores del 2005 [1], probablemente debido a que sigue aumentando el número de nuevas infecciones en gente joven (15-24 años) [3]. Sin embargo, la epidemia del VIH-1 en el África subsahariana está lejos de estar bajo control. La causa de esta aparente estabilización en las tasas de prevalencia en la región del África subsahariana puede ser debida a que las altas tasas de incidencia de VIH-1 existentes en esta región quedan contrarrestadas por las altas tasas de mortalidad por SIDA [1]. Por otro lado, es de esperar que en el futuro aumente la prevalencia de VIH/SIDA a medida que aumente el número de personas con acceso a tratamiento antiretroviral, ya que aumentará el tiempo de supervivencia de las personas infectadas.

La Figura 1 muestra la distribución geográfica y la prevalencia del VIH-1 por regiones. Como se puede observar, la prevalencia del VIH-1 en África varía enormemente según la región, desde un 0.9% en Senegal, hasta 16% en Mozambique o 24,2% en Botswana [1]. El tipo de transmisión predominante también varía según la región. En Europa, Estados Unidos y

Asia predomina la transmisión homosexual y por el uso de drogas intravenosas, mientras que en África predomina la transmisión heterosexual.

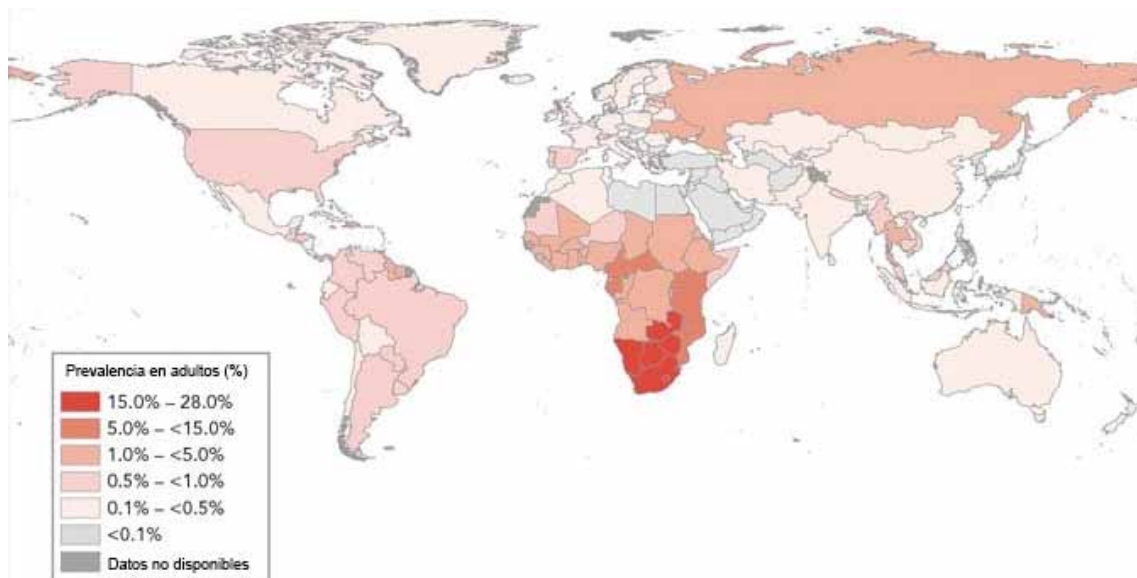


FIGURA 1- Prevalencia del VIH-1 en adultos en 2007 (UNAIDS 2008 Report on the Global AIDS epidemic)

1.2. Epidemiología molecular del VIH

1.2.1. Estructura y ciclo de vida del VIH-1

El VIH, con un diámetro de aproximadamente 120nm, está compuesto por dos copias de ARN monocatenario rodeadas por una serie de proteínas que forman la cápside. Dentro de la cápside se encuentran también varias proteínas propias del virus, como la transcriptasa reversa (necesaria para la retrotranscripción), la integrasa y la proteasa. A su vez, la cápside está rodeada por una envoltura de bicapa lipídica, el fundamento de las membranas celulares (Figura 2).

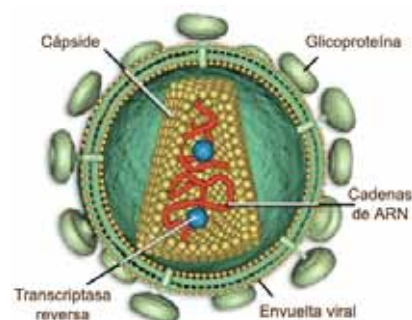


FIGURA 2- Estructura del VIH (Molecular Expression-Florida State University)

El VIH empieza su ciclo de vida cuando se **une** a un receptor CD4 y a uno de los dos correceptores en la superficie de un linfocito CD4 (CCR5 o CXCR4) (Figura 3- Paso 1). El virus se fusiona y libera el ARN viral, su material genético, dentro de la célula huésped. La enzima **transcriptasa reversa** transcribe la cadena simple del ARN viral en una cadena doble de ADN, que entra en el núcleo de la célula (Paso 2). La enzima integrasa permite la **integración** del ADN viral dentro del propio ADN de la célula, dando lugar al ADN proviral (Paso 3). A partir de ahí, el virus es capaz de replicarse mediante la **transcripción** del ADN proviral, que da lugar a copias de ARN que se **traducen** para formar cadenas largas de proteínas (Paso 4). La enzima del VIH llamada proteasa divide las cadenas largas de proteínas del VIH en pequeñas proteínas individuales (Paso 5). A medida que las proteínas pequeñas del VIH se unen a las copias del material genético del ARN del VIH, se **ensambla** una nueva partícula del virus que es capaz de infectar una nueva célula (Paso 6).

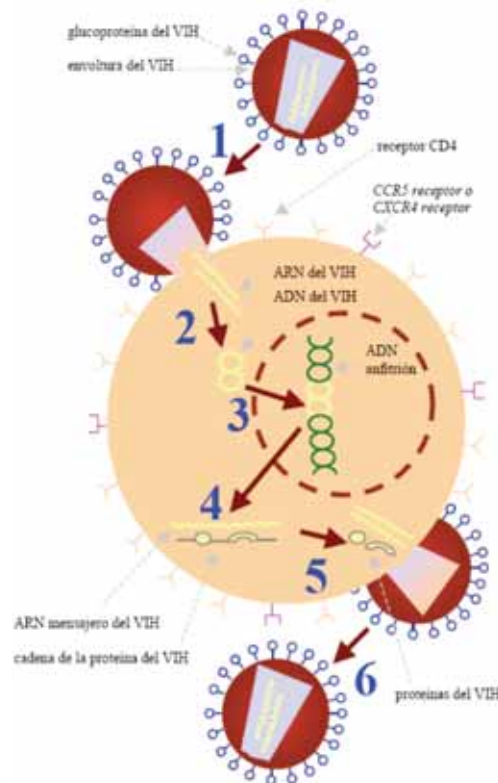


FIGURA 3- Ciclo de vida del VIH (AIDSinfo-National Institutes of Health)

1.2.2. Diversidad genética del VIH

El genoma del VIH, con 9.800 pares de nucleótidos, contiene 9 genes (Figura 4). Tres de ellos codifican para proteínas estructurales (los genes *gag*, *pol* y *env*), dos para proteínas reguladoras (genes *tat* y *rev*) y cuatro para proteínas accesorias (genes *vpu*, *vpr*, *vif* y *nef*). Ambos extremos aparecen además flanqueados por secuencias repetitivas (LTR, *long terminal repeats*).

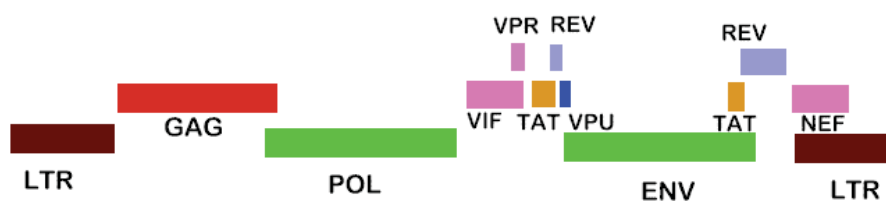


FIGURA 4- Genoma del VIH

El VIH es un virus muy lábil con gran facilidad para mutar. Basado en las similitudes genéticas, las distintas cepas se pueden clasificar en tipos, grupos, subtipos y recombinantes. De los dos tipos de VIH existentes (VIH-1 y VIH-2), el VIH-1 causa más del 99% de las infecciones. A su vez, las cepas de VIH-1 pueden clasificarse en tres grupos: el grupo M (“major”), el grupo O (“outlier”) y el grupo N (“new”). La mayoría de las cepas circulantes pertenecen al grupo M del VIH-1 (Figura 5).

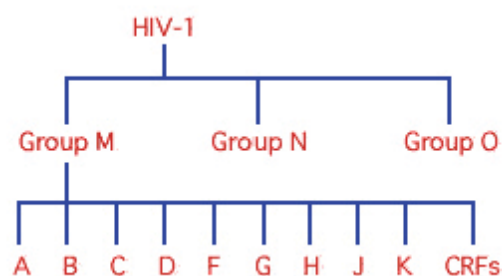


FIGURA 5- Niveles de clasificación del VIH-1 (tipo, grupos y subtipos)

Existen distintos subtipos y formas recombinantes circulantes (en inglés *circulating recombinant forms CRFs*) de VIH-1 grupo M que se distribuyen de forma distinta por región y por país. Cada subtipo presenta diferentes patrones clínicos, epidemiológicos y virológicos en

cuanto a transmisión, progresión de la enfermedad o generación de mutaciones de resistencias frente a los antiretrovirales [4, 5].

En África subsahariana, los subtipos A y D predominan en África oriental (Tanzania, Uganda, Ruanda y Kenia) mientras que el C y en menor extensión el B son subtipos predominantes en África del Sur (Figura 6). En algunas regiones, los recombinantes del VIH llegan a ser los subtipos predominantes, como el CRF01-AG en Senegal. Sin embargo, el subtipo C es ya el subtipo predominante de la epidemia del VIH-1, siendo el responsable del 56% de las infecciones por VIH-1 en todo el mundo [6, 7]. Se ha sugerido que la rápida expansión del subtipo C podría ser debida a una menor virulencia de este subtipo en comparación con el resto. La menor virulencia produciría una progresión más lenta de la infección, un período asintomático más prolongado y por tanto, mayores oportunidades para transmitir el virus [8]. Sin embargo, son necesarios más estudios para aclarar este punto.

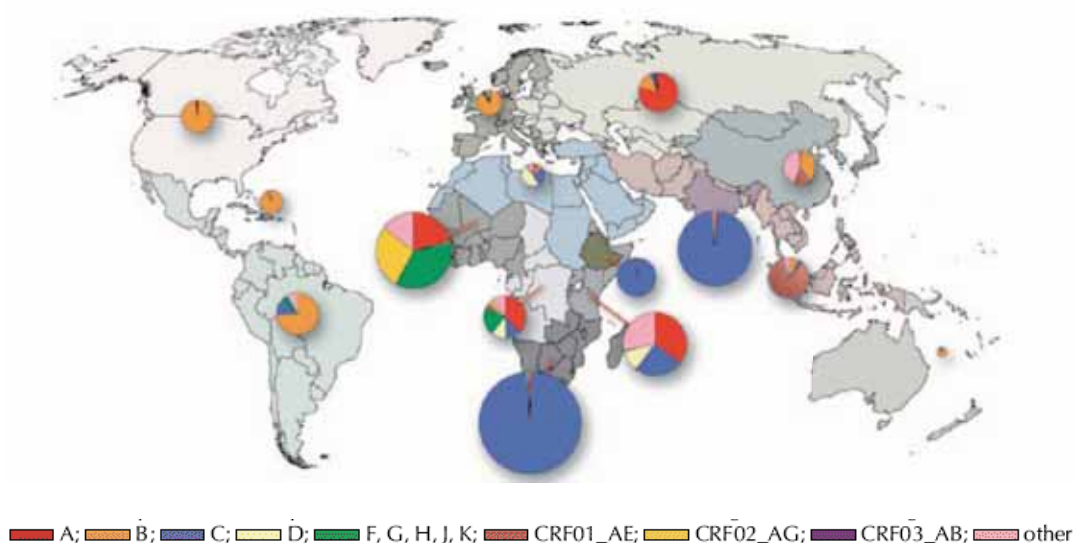


FIGURA 6- Patrón de distribución de subtipos de VIH-1 M (ONUSIDA Diciembre 2006)

1.2.3. Mutaciones de resistencia frente a antiretrovirales

La gran tasa de replicación del VIH-1 unida a la alta tasa de error de la transcriptasa reversa permite la aparición de múltiples variantes del virus salvaje que se conocen como cuasiespecies minoritarias. La selección de las cuasiespecies del virus representa un

importante mecanismo de escape del control del sistema inmunológico y de generación de resistencia a agentes antivirales.

El tratamiento antiretroviral es capaz de reducir la carga viral plasmática del VIH y la cantidad de cuasiespecies. Sin embargo, algunas variantes del VIH pueden presentar mutaciones de resistencia adquiridas de forma espontánea que disminuyen la susceptibilidad del virus a los antiretrovirales. Con el tiempo, el virus es capaz de adaptarse a esta presión selectiva y las variantes resistentes a los antiretrovirales son seleccionadas, pasando a ser la variante mayoritaria. No obstante, los pacientes que desarrollan virus resistentes a fármacos antiretrovirales siguen manteniendo la cuasiespecie de tipo salvaje (inicial), que puede volver a superar a las variantes resistentes una vez se interrumpe el tratamiento.

Las mutaciones (sustituciones de nucleótidos en genes que codifican a proteínas) pueden ser sinónimas (sin cambio de aminoácido, llamado ds) o no-sinónimas (con cambio de aminoácido, llamado dn). El cálculo de la proporción de mutaciones no-sinónimas frente a las sinónimas, dn/ds, proporciona información sobre el grado de presión de selección que opera en el virus, aunque no deja de ser una aproximación dado que un cambio de aminoácido puede ser también neutro (no afecta a la función final). De esta forma, un valor dn/ds=1 indica selección neutral, mientras que dn/ds>1 indica selección positiva (las mutaciones de aminoácido son beneficiosas para el virus ya que aumenta su *fitness* o buen estado).

Recientemente, la caracterización genética de genes de proteasa y transcriptasa reversa de subtipos diferentes al B ha revelado que es frecuente encontrar mutaciones menores en las variantes naturales, lo que se conoce como polimorfismos naturales. Sin embargo, no se sabe si la presencia de estos polimorfismos puede facilitar la generación de resistencias durante el tratamiento con inhibidores de proteasa [9].

Existe muy poca información sobre como la susceptibilidad y resistencia del virus frente a los antiretrovirales puede variar según los subtipos. Un estudio llevado a cabo por Eshleman et

al. [10] sugiere que la aparición de mutaciones de resistencia frente a un fármaco antiretroviral de la clase de los inhibidores de la transcriptasa reversa no nucleósidos (NNRTI) como la nevirapina (Ver sección 1.3.2.) puede ser dependiente del subtipo, al observar que las mujeres embarazadas portadoras del subtipo D tratadas con nevirapina tenían mayor incidencia de mutaciones de resistencia que las portadoras de virus del subtipo A.

Dado que el subtipo C es responsable del mayor número de infecciones en el mundo, es de suma importancia realizar estudios básicos sobre la aparición de recombinantes y de resistencia a fármacos, así como establecer si otras infecciones y la activación inmune crónica pueden impactar diferencialmente en la evolución de distintos subtipos africanos de VIH-1 como el subtipo A, D, CRF01-AG y en especial el subtipo C dado que es el predominante en esta región. Igualmente, la descripción de la epidemiología molecular del VIH-1 y el conocimiento de la dinámica de los virus circulantes resulta crucial para el desarrollo de futuras vacunas frente al VIH-1.

1.3. Transmisión del VIH-1 de madre a hijo

La transmisión de madre a hijo del VIH-1 (en inglés *mother-to-child transmission*: MTCT) puede producirse durante el embarazo, en el momento del parto y durante la lactancia materna. Sin ningún tipo de intervención, el riesgo de transmisión perinatal (últimas semanas de embarazo y durante el parto) por VIH-1 es del 15-30%, siendo la mayoría de las infecciones perinatales por VIH-1 a partir de la semana 36 de embarazo [11]. La lactancia materna aumenta el riesgo de MTCT del VIH-1 durante el primer año de vida hasta un 35-50% [11].

Varios estudios en África subsahariana han señalado que las mujeres embarazadas VIH-positivas tienen además mayor riesgo de complicaciones durante el embarazo, como aborto espontáneo, parto prematuro o nacido muerto [12-14] y bajo peso al nacer del recién nacido [15-17]. La alta carga viral plasmática del VIH-1 materna [15, 18, 19], el bajo recuento de CD4 [15, 20] y la malnutrición [21, 22] han sido descritos como factores de riesgo independientes de la MTCT del VIH-1. Además, se ha sugerido que infecciones comunes en África subsahariana

como malaria [16, 19, 23], sífilis [17] o infección por helmintos [23] pueden tener también un impacto en la MTCT del VIH-1. Para poder entender cómo actúan estos factores de riesgo, es necesario conocer en profundidad los distintos mecanismos a través de los cuales se transmite el VIH-1 de madre a hijo.

1.3.1. Mecanismos de transmisión de la MTCT del VIH-1

La transmisión vertical del VIH-1 es un proceso complejo y multifactorial. A continuación describiremos brevemente algunos de los mecanismos que se han propuesto para explicarlo.

Uno de los mecanismos formulados para explicar la MTCT del VIH-1 perinatal es a través de las mucosas (“**all mucosal**” **mechanism**), por contacto directo entre la mucosa del feto con la sangre materna, líquido amniótico o secreciones cervicovaginales infectadas por VIH-1. Varios estudios han respaldado la teoría de la transmisión a través de las mucosas. Un estudio multicéntrico observó que el primero de los gemelos en atravesar el canal del parto tiene mayor riesgo de infectarse con el VIH-1 que el segundo, ya que el primero estaría más expuesto a las secreciones vaginales y a la sangre materna contaminada por el VIH-1 que el segundo [24, 25]. Según estos datos, se podría pensar que el parto por cesárea y la desinfección del canal del parto podrían ser un buen instrumento para reducir el riesgo de MTCT. De hecho, se ha observado que la cesárea programada reduce a la mitad el riesgo de MTCT del VIH-1 [26], y sin embargo, los pocos estudios llevados a cabo sugieren que la desinfección vaginal no tiene un impacto en el riesgo de MTCT del VIH-1 [27].

La MTCT del VIH-1 también podría ocurrir por la rotura de la barrera materno-fetal seguida de **microtransfusiones de la placenta**. El estudio llevado a cabo por Kwiek et al. [28] demuestra que las microtransfusiones placentarias son un factor de riesgo para la MTCT intrapartum del VIH-1. Se piensa que la intensificación de las contracciones uterinas y la ruptura de membranas al inicio del parto podrían contribuir a aumentar las microtransfusiones placentarias y con ellas la transmisión de VIH-1 [11, 29].

Se sabe mucho menos sobre el mecanismo de transmisión del VIH-1 a través de la **lactancia materna**, a pesar de que es responsable del 40% de las transmisiones verticales por VIH-1 [11]. Se ha postulado que el virus libre o ARN viral y el virus asociado a célula o ADN proviral (Ver sección 1.2.1.) de la leche materna pueden infectar al niño a través de la mucosa oral o el tracto gastrointestinal superior del lactante, ya sea por grietas de la mucosa, por transporte a través de células membranosas (M) o por infección directa de otras células epiteliales como los enterocitos [30-32]. Se ha descrito que tanto el ARN viral como el ADN proviral están asociados con la transmisión vertical por lactancia materna, aunque se desconoce la contribución relativa de cada uno de ellos [33]. Un estudio reciente observó que la terapia antiretroviral de gran actividad (TARGA) conseguía reducir la cantidad de ARN viral en la leche materna, por lo que podría prevenir la MTCT, pero sin embargo no tenía ningún efecto en la cantidad de DNA proviral [34]. Por este motivo, se necesitan más estudios para profundizar sobre la forma de transmisión del VIH-1 a través de la leche materna y así ser capaces de desarrollar programas de prevención adecuados.

1.3.2. Prevención de la MTCT del VIH-1

En países desarrollados, el TARGA, la cesárea y la lactancia artificial han conseguido reducir la tasa de transmisión del VIH-1 hasta el 2% [35, 36]. Por el contrario, en países en desarrollo donde este tipo de intervenciones no están disponibles, la transmisión vertical del VIH-1 se produce en el 35-50% de los casos [11]. A pesar de que cada día 1.800 niños se infectan con el VIH-1 (la mayoría por MTCT), apenas un 11% de las mujeres embarazadas VIH-positivas en África subsahariana acceden a programas de prevención de la MTCT del VIH-1 [37]. Con todo, la cobertura de estos programas está aumentando rápidamente en la mayoría de países subsaharianos, como en el caso de Mozambique, donde el porcentaje de mujeres con acceso a programas de prevención de la MTCT del VIH-1 pasó de un 8% en 2006 a un 29% en 2007 [38].

Hasta mediados de los 90, la mayoría de las intervenciones y regímenes empleados para prevenir la MTCT del VIH-1 en los países desarrollados no eran viables en el contexto de los

países en desarrollo. En 1994, el estudio PACTG 076 abrió el camino a los programas de prevención de MTCT del VIH-1 al demostrar que un régimen de AZT intravenosa administrada a las mujeres embarazadas VIH-positivas durante el embarazo y parto y al recién nacido durante 6 semanas conseguía reducir la transmisión del 25,5% al 8,3% [39]. Sin embargo, este régimen tenía poco valor práctico en países en desarrollo, por lo que se evaluaron regímenes más cortos con AZT que también resultaron eficaces [40].

Posteriormente, el ensayo HIVNET 012 en Uganda observó que una sola dosis de nevirapina (sdNVP) administrada a la madre inmediatamente antes del parto y una dosis al recién nacido dentro de los tres primeros días de vida conseguía reducir en un 41% el riesgo relativo de transmisión vertical del VIH-1 a los 18 meses comparado con el uso de AZT en el parto y al recién nacido durante una semana [41, 42]. Tras los resultados del HIVNET 012 y sin realizar más estudios sobre eficacia y generación de mutaciones de resistencia, varios países del África subsahariana implementaron rápidamente programas de prevención de transmisión madre-hijo a través de la administración de sdNVP a la madre justo antes del parto y una dosis al recién nacido.

Sin embargo, poco después de la implementación a gran escala de este programa se demostró que sdNVP favorecía la aparición de variantes de VIH-1 con mutaciones de resistencia en 19% (21/111) de las mujeres del estudio HIVNET 012 entre la semana 6ª y la 8ª tras el parto [43]. Aunque estas mutaciones de resistencia bajan a un nivel indetectable con el tiempo [43] y parecen no influir en la eficacia de la sdNVP como prevención de la MTCT del VIH-1 en los siguientes embarazos [44], las mutaciones de resistencia pueden tener serias implicaciones para la utilización de NVP en protocolos de tratamiento de las madres [45]. De hecho, un estudio reciente llevado a cabo en Botswana observó que las mujeres que recibían sdNVP para prevenir la transmisión perinatal tenían mayor fallo virológico (definido como no conseguir reducir la carga viral plasmática del VIH-1 a niveles indetectables) después de iniciar el tratamiento TARGA que las mujeres que no habían estado expuestas a la NVP. Se observó

un 40% de fallo virológico cuando se comenzaba el tratamiento durante los 6 meses posteriores a la toma de NVP y descendía a 18,4% a partir de los 6 meses [45].

Como se ha comentado anteriormente, la lactancia materna es responsable del 40% de las transmisiones verticales por VIH-1 [11]. Desgraciadamente, la lactancia artificial no es siempre una alternativa posible ni óptima en los países en desarrollo, dado el alto coste de los preparados y el riesgo de que el uso de agua contaminada aumente el riesgo de diarreas, malnutrición e infecciones. Es por ello importante buscar un equilibrio entre el riesgo de transmisión del VIH-1 y el riesgo de mortalidad y morbilidad por sustitución de la lactancia materna. Las recomendaciones actuales de la Organización Mundial de Salud (OMS) aconsejan evitar la lactancia materna sólo cuando la lactancia artificial sea aceptable, factible, asequible, sostenible y segura [46], lo que es poco común en el África subsahariana. De hecho, la lactancia mixta (lactancia materna y otros alimentos) puede comprometer el epitelio del tracto digestivo del recién nacido por los alérgenos y contaminantes presentes en la leche artificial y la comida sólida y facilitar así el paso del virus a la sangre [47]. Por otra parte, se sabe que la permeabilidad del epitelio mamario aumenta en el inicio de la lactancia materna y durante el destete, lo que aumentaría la carga viral del VIH-1 en la leche materna [31, 47]. Una vez comenzada la lactancia materna de forma estable se vuelve a controlar la permeabilidad [48], limitando la transferencia de componentes de la sangre a la leche materna y reduciendo la carga viral del VIH-1 en la leche materna. La lactancia materna exclusiva, por tener un periodo menor entre el inicio y el establecimiento de la lactancia, puede reducir el periodo de mayor permeabilidad del epitelio mamario. En conclusión, la lactancia materna exclusiva durante los primeros meses de vida resultaría la opción más segura [49], ya que ayuda a mantener la integridad del epitelio mamario, controlando su permeabilidad y reduciendo así la carga viral del VIH-1 en la leche materna al mismo tiempo que protege el epitelio del tracto digestivo del recién nacido [50]. Por este motivo, en los casos en los que la lactancia artificial no es viable, la OMS recomienda practicar la lactancia materna “exclusiva” durante los primeros 6 meses, que consiste en dar sólo leche materna sin incluir otros fluidos ni productos sólidos seguido de un destete total [51].

1.4. Epidemiología del VIH-1 en Mozambique

Mozambique sufrió una larga guerra civil hasta 1992, y desde entonces la expansión del VIH-1 ha aumentado rápidamente, pasando de 8,2% en 1998 a 16,1% en 2008 [2, 52]. Según datos de ONUSIDA del 2008, la prevalencia de VIH-1 en adultos en Mozambique es actualmente del 16,1% [IC 95%:12,5-20%] y sólo reciben TARGA el 14% [IC 95%:10-19%] de las personas infectadas con criterio para iniciar tratamiento [53]. En mujeres que acuden a clínicas antenatales la prevalencia de VIH-1 varía enormemente según la zona del país, desde un 9% en el norte hasta un 20% en la zona central y sur del país, llegando a alcanzar el 27% de prevalencia en algunas regiones en 2004 [2]. A pesar de la reciente implementación de diversos programas de prevención de la MTCT del VIH-1 en el país, la OMS estima que a finales de 2007 sólo el 6% [IC 95%: 4%-9%] de las mujeres embarazadas VIH-positivas recibían fármacos antiretrovirales para reducir la transmisión vertical de VIH-1 [52]. En 2004, Mozambique comenzó la ampliación a escala nacional del programa nacional de tratamiento del VIH y en agosto del 2008 ya había 115.000 personas en TARGA [54].

Mozambique ocupa el puesto número 10 en cuanto a prevalencia de VIH-1 en el mundo aunque paradójicamente existe relativamente poca información sobre la epidemiología general y molecular del VIH-1 en el país. En la mayoría de los países vecinos predomina el subtipo C (Sudáfrica, Malawi y Zimbabwe), excepto en Tanzania donde circulan también los subtipos A y D y varios recombinantes intersubtipo [55, 56]. Hasta la fecha de esta tesis, sólo dos estudios publicados habían evaluado los subtipos y la diversidad genética del VIH-1 en Mozambique. El primero, llevado a cabo en dos hospitales cercanos a Maputo, evaluó la resistencia a antiretrovirales en pacientes VIH-positivos [57], mientras que el segundo realizó la caracterización genética del VIH-1 circulante en Beira, en la región central del país [58]. Ambos estudios determinaron que el subtipo C era el subtipo predominante de VIH-1.

Sin embargo, no existían estudios longitudinales en Mozambique que analizaran la diversidad genética y la evolución molecular del VIH-1. Desde el 2004 muchos países del África Subsahariana, incluido Mozambique, han iniciado la implementación del TARGA a gran escala,

por lo que la realización de estudios sobre el análisis filogenético, los polimorfismos de resistencia a medicamentos, la diversidad genética y la evolución molecular del VIH-1 tienen el potencial de contribuir a evitar la rápida generación de mutaciones de resistencia, mejorando así la efectividad del tratamiento.

En la fecha de realización del estudio sobre el que se basa esta tesis doctoral, aproximadamente el 20% de las mujeres que visitaban las clínicas antenatales estaban infectadas por el VIH-1 [59]. No había TARGA disponible en el área de estudio (distrito de Manhiça)¹ y sólo se administraba cotrimoxazol como tratamiento preventivo de infecciones oportunistas dependiendo del nivel de CD4 o la presencia de síntomas de la enfermedad. Para la prevención de MTCT del VIH-1, se administraba una dosis de nevirapina en el comienzo del parto y otra dosis de nevirapina al recién nacido en las primeras 72 horas de vida².

2. MALARIA

2.1. Epidemiología de la malaria

La malaria es una enfermedad causada por parásitos del género *Plasmodium* que se transmite de persona a persona a través de la picadura de la hembra de mosquitos *Anopheles* infectados. El parásito *P. falciparum*, una de las cuatro especies que parasita al hombre y la causante de las formas más graves de malaria, es responsable de aproximadamente 247 [percentiles 5 a 95: 189-327] millones de casos de malaria anuales que resultan en más de un millón de muertes en el mundo, la mayoría niños menores de 5 años [60-62].

En este estudio se definió un episodio de malaria clínica como la presencia de parásitos *P. falciparum* (parasitemia) más alguno de los signos o síntomas característicos de la infección por malaria: fiebre en las últimas 24 horas, artromialgias, palidez, dolores de cabeza o

¹ Desde abril de 2005 y hasta enero del 2008, 2.000 personas están siendo tratadas con triterapia en el Distrito de Manhiça, 80 nuevos pacientes cada mes.

² En la actualidad (desde 2006) se administra AZT en las últimas semanas del embarazo y una dosis de NVP antes del parto como prevención de la MTCT y desde 2008 se está introduciendo AZT + d3T.

convulsiones [59]. Del mismo modo, se definió malaria grave como la presencia de parásitos *P. falciparum* más alguno de los siguientes signos o síntomas: anemia grave, malaria cerebral, fallo renal, shock, acidosis, hipoglicemia o disfunción hepática [63].

La transmisión de malaria difiere en intensidad y regularidad según factores locales como, entre otros, el patrón de lluvias, la proximidad de los criaderos de mosquitos y la especie de mosquito transmisora. En Manhica, la transmisión de malaria es perenne con picos estacionales, y es en su mayor parte atribuible a *P. falciparum*. *Anopheles funestus* es el vector principal [64]. El uso generalizado de sulfadoxina-pirimetamina (SP) para tratar la malaria en África ha producido un incremento de resistencias frente a SP en el parásito que está reduciendo la eficacia de este medicamento [65]. Sin embargo, los datos de eficacia de SP en niños en esta zona de Mozambique muestran una tasa de eficacia terapéutica del 83% y una sensibilidad parasitológica del 78,6% al día 14 [66].

En regiones de baja endemicidad, la transmisión de malaria es estacional y suele coincidir con la estación de lluvias, mientras que en áreas de alta transmisión, el número de casos de malaria a lo largo del año permanece constante y puede tener alguna variación estacional. Por este motivo, las personas que crecen en áreas de alta endemicidad desarrollan una semi-inmunidad que permite controlar las formas más graves de la enfermedad una vez alcanzada la edad adulta [67].

Los niños menores de 5 años son los más vulnerables a la infección por malaria. De hecho, del millón de personas que mueren por malaria cada año, la mayoría son niños menores de 5 años [68]. La infección por malaria es también muy relevante durante el embarazo, como comentaremos en el próximo apartado.

2.2. Malaria en el embarazo

Las mujeres embarazadas tienen mayor frecuencia y gravedad de la infección por malaria que las mujeres no embarazadas [69, 70], debido a la inmunosupresión fisiológica del

embarazo y a la pérdida parcial de la inmunidad adquirida contra el *P. falciparum*. Una de las características de la infección por malaria en el embarazo es que el parásito tiende a acumularse en la placenta, lo que se conoce como **malaria placentaria** (PM). Esta acumulación de eritrocitos parasitados en el espacio intervilloso resulta en la infiltración de células inflamatorias y en la liberación de mediadores proinflamatorios, causando alteraciones patológicas [71].

En África, aproximadamente 25 millones de mujeres embarazadas tienen riesgo de sufrir infección por malaria cada año [72] y en ciertas regiones la prevalencia de malaria placentaria puede llegar hasta el 75% [73]. Se ha observado que la prevalencia de malaria placentaria es dependiente de la paridad, y que las mujeres primíparas tienen un mayor riesgo de presentar malaria placentaria que las mujeres múltiparas [74].

La infección por malaria durante el embarazo puede provocar complicaciones tanto a la madre como al niño que varían según el tipo de transmisión de malaria. En áreas de alta transmisión de malaria, la infección por malaria resulta en un aumento del riesgo de anemia materna [75] y de bajo peso al nacer (<2.500g) (**Low Birth Weight, LBW**) [72, 76], que es el factor de riesgo más importante de mortalidad neonatal e infantil [77]. De hecho, el riesgo de LBW en zonas de alta transmisión prácticamente se duplica si la mujer tiene malaria placentaria comparado con mujeres sin malaria placentaria [78]. En áreas de baja transmisión, las mujeres embarazadas presentan las formas más graves de la infección, incluyendo malaria clínica grave, anemia materna grave [75], prematuridad y retraso en el crecimiento intrauterino [73, 76, 79].

La malaria placentaria se puede detectar por el análisis de sangre placentaria en lámina o por histología del tejido placentario. La histología de placenta es el método de diagnóstico de referencia debido a su mayor sensibilidad y a que permite discernir entre *infección aguda* (presencia de parásitos con ausencia o mínimo depósito de pigmento malárico³ en fibrina o en

³ El pigmento malárico es el producto resultante de la digestión de la hemoglobina por parte del parásito

células), *crónica* (presencia de parásitos con una cantidad significativa de depósito de pigmento malárico en fibrina o en células) o *pasada* (presencia de pigmento sin parásitos) [80]. La infección aguda y crónica se suelen agrupar en la categoría conocida como *infección activa* [81].

2.2.1. Prevención de la malaria durante el embarazo

Dado que las mujeres embarazadas son uno de los grupos más vulnerables a la malaria, la OMS recomienda una serie de medidas que incluyen el uso de redes mosquiteras impregnadas con insecticida, tratamiento intermitente preventivo (*intermittent preventive treatment in pregnancy: IPTp*) en áreas de transmisión estable de *P. falciparum* y el manejo clínico adecuado de los casos de malaria [82].

Una de las estrategias más eficaces para la prevención de la malaria es el uso de redes mosquiteras impregnadas con insecticida (*insecticide treated nets: ITNs*) [83] que reduce el número de picaduras de mosquito infectivas en un 70-90% [84-86]. Cuatro estudios aleatorizados controlados han estudiado el impacto de las ITNs en el embarazo en zonas con distinta transmisión de malaria. En estos estudios, el uso de ITNs estaba asociado con una reducción significativa de la parasitemia y la malaria clínica materna y con un aumento del peso del recién nacido [87-91].

Por otra parte, con el objetivo de prevenir los efectos perjudiciales de la malaria durante el embarazo en áreas de alta transmisión, la OMS recomienda el tratamiento intermitente preventivo en mujeres embarazadas [82]. El IPTp consiste en la administración de una antimalárico efectivo en intervalos predefinidos de la gestación para reducir la infección por malaria. El régimen recomendado consiste en dos dosis de SP a partir del 2º trimestre de embarazo y con un mes de separación entre dosis [82].

Varios estudios prospectivos, aleatorizados y controlados llevados a cabo en Kenya [92] y Malawi [93, 94] han demostrado la eficacia, seguridad y coste-eficacia del IPTp con SP para

reducir la malaria periférica y placentaria y prevenir de esta forma la anemia materna y el LBW [95]. Schultz et al. [93] demostraron que dos dosis de SP administradas en el segundo y tercer trimestre del embarazo eran eficaces para reducir la malaria placentaria en un área de alta transmisión de malaria. Posteriormente, el estudio de Parise et al. [92] observó que la infección por VIH-1 podía influir también en el IPTp, ya que los resultados sugerían que las mujeres VIH-positivas requerían al menos tres dosis de SP para conseguir una reducción en la parasitemia placentaria similar a las mujeres VIH-negativas con dos dosis de SP. No obstante, un estudio reciente de Menéndez et al. [59] observó que 2 dosis de SP durante el segundo trimestre de embarazo y con una separación de un mes conseguían reducir significativamente la malaria placentaria en mujeres VIH-positivas que además dormían bajo redes impregnadas de insecticida.

Un estudio reciente realizado en Malawi observó que el IPTp con SP administrado de forma mensual (3 dosis de media) reducía más eficazmente la parasitemia placentaria que el régimen con dos dosis tanto en mujeres VIH-negativas como en VIH-positivas en una zona de alta transmisión de malaria, aunque no observaron diferencia en la prevalencia de LBW según el régimen administrado [96]. Además, las mujeres en el régimen mensual recibieron su última dosis mucho más cerca del parto, por lo que esta mayor reducción en malaria placentaria del régimen mensual podría ser debida a una limpieza de la placenta en lugar de a una protección acumulada durante el embarazo. De hecho, no se observó ninguna diferencia en la prevalencia de malaria placentaria o en los resultados del embarazo en un estudio similar realizado en una zona de menor transmisión de malaria en Zambia [97], por lo que sigue habiendo dudas sobre cuál es el régimen de IPTp más eficaz en mujeres VIH positivas. Además, muchos de estos estudios han utilizado la malaria placentaria como marcador sustituto del LBW, pero puede que la relación entre malaria placentaria y LBW no sea tan directa como se presupone. A pesar de observarse una reducción significativa de la malaria placentaria en mujeres con IPTp, algunos estudios no observaron una reducción significativa de la prevalencia de LBW [59].

Tras la recomendación de la OMS, muchos países han introducido progresivamente el IPTp con SP en los programas nacionales de control de la malaria, aunque la cobertura sigue siendo modesta en la mayoría de ellos. El uso extensivo de SP para tratar la malaria clínica en África ha producido un aumento de los niveles de resistencia al SP, que ha provocado un descenso en su eficacia [98-100]. Por este motivo, se ha propuesto que el SP se debería combinar con otros fármacos o buscar otro régimen de medicamentos para preservar la eficacia del IPTp, aunque el coste sería mucho mayor [101]. Existe el riesgo añadido de que el SP aumente las reacciones adversas a los fármacos en mujeres embarazadas VIH positivas que toman cotrimoxazol como profilaxis para infecciones oportunistas, ya que el cotrimoxazol contiene un grupo sulfa al igual que el SP. A pesar de todo, una revisión reciente de ter Kuile et al. [102] señala que el IPTp con dos dosis de SP sigue siendo beneficioso a pesar del aumento de resistencias en mujeres VIH-negativas, aunque resalta la necesidad de aumentar el número de dosis en las mujeres VIH-positivas que no tomen cotrimoxazol para prevenir infecciones oportunistas.

A pesar de que independientemente tanto las ITNs como el IPTp han demostrado ser eficaces en reducir los efectos de la malaria durante el embarazo, existe poca información sobre la seguridad y eficacia de ambas intervenciones llevadas a cabo conjuntamente [103, 104]. Un estudio reciente llevado a cabo por Menéndez et al. [59] en Manhiça (Mozambique) analizó el impacto del tratamiento intermitente antimalárico con SP combinado con el uso de ITNs en la anemia materna y el bajo peso al nacer del recién nacido [59], observando que dos dosis de SP estaban asociadas con una reducción de algunos indicadores (malaria clínica, malaria periférica y malaria placentaria activa). Sin embargo, esta reducción no estaba asociada con una mejora significativa en indicadores de la salud de la madre y el niño, como LBW o anemia materna.

Las diferencias observadas en la eficacia de los programas de tratamiento intermitente preventivo antimalárico según el status de VIH-1 de la madre confirman la existencia de

interacciones entre la infección por malaria y por el VIH-1. En el siguiente apartado describiremos con detalle el conocimiento actual sobre la coinfección con VIH-1 y malaria.

3. INTERACCIÓN VIH-MALARIA

La malaria por *Plasmodium falciparum* y el VIH/SIDA son dos de las enfermedades más prevalentes en el África subsahariana y con mayor impacto en salud pública, donde tienen lugar el 70% de las infecciones por *P. falciparum* [60] y más del 60% de las infecciones por VIH-1 del mundo [1]. De hecho, un modelo matemático creado por Abu-Raddad [105] sugiere que la rápida propagación en el África Subsahariana del VIH-1 y la malaria en los últimos años podría ser debida a las interacciones entre ambas infecciones.

Además, tanto la infección por *P. falciparum* como la infección por el VIH-1 producen complicaciones graves durante el embarazo y agravan los síntomas de la otra: las mujeres embarazadas VIH-positivas coinfectadas por *P. falciparum* tienen mayor carga viral plasmática de VIH-1 [20], tienen una inmunidad reducida frente a la malaria [106] y mayores prevalencias de malaria periférica y placentaria. Igualmente, la coinfección con VIH-1 y *P. falciparum* contribuye al desarrollo de anemia materna, ya que las mujeres coinfectadas tienen mayor riesgo de tener anemia (Hb<11g/dL) que las mujeres con infecciones simples por cualquiera de estos dos agentes [18].

Dada la alta prevalencia de coinfecciones tanto en adultos como en mujeres embarazadas, las interacciones entre VIH-1 y malaria tienen grandes implicaciones para el tratamiento, cuidado y prevención de ambas.

3.1. Impacto de la infección por VIH-1 en la infección por *P. falciparum*

Varios estudios sugieren que la infección por VIH-1 puede aumentar el riesgo, la gravedad y la mortalidad por malaria en **adultos** [107-109]. Dos estudios realizados en Uganda y Malawi

observaron que la infección por VIH-1 estaba asociada con un incremento en la frecuencia de malaria clínica y parasitemia (Ver sección 2.1), y que esta asociación tendía a ser más pronunciada en casos de inmunosupresión avanzada [107-109]. Se ha sugerido que la inmunosupresión asociada con la infección por VIH-1 interfiere con el control del parásito y puede causar una pérdida parcial de la respuesta inmune adquirida específica contra la malaria, lo que podría explicar el aumento de infecciones y de casos clínicos de malaria observado en zonas de transmisión estable de malaria [110].

Además, la infección por VIH-1 podría aumentar la gravedad de la infección por malaria en zonas de baja endemicidad, donde las personas no adquieren un nivel adecuado de inmunidad frente a la infección por malaria. Un estudio realizado por Cohen et al. en Sudáfrica [111] observó que el riesgo de malaria grave era mayor para las personas VIH-positivas que las VIH-negativas.

El aumento en el número de casos de malaria debido a la infección por VIH-1 puede mitigarse con tratamiento antiretroviral. En un estudio en Uganda se observó que tanto el cotrimoxazol como la terapia antiretroviral lograban reducir significativamente la frecuencia de malaria en adultos con VIH-1, y la combinación de estas dos intervenciones con el uso de redes mosquiteras impregnadas conseguía reducir de 50,8 episodios de malaria a 2,1 episodios por 100 personas-años [112].

Se han descrito también efectos perjudiciales de la infección por VIH-1 en la malaria en **mujeres embarazadas**, resaltando mayores riesgos de malaria placentaria (riesgo relativo medio de 6 estudios: 1,66, 95% CI 1,48-1,87), alta parasitemia y fiebre en mujeres VIH-positivas [18]. Además, la infección por VIH-1 afecta a la inmunidad adquirida frente a la malaria y elimina el patrón dependiente de la paridad, haciendo que las mujeres VIH-positivas multíparas tengan un riesgo similar de tener malaria placentaria que las primíparas VIH-negativas [106, 113]. Dada la mayor gravedad y frecuencia de la infección por *P. falciparum* en

personas VIH-positivas, resulta evidente la necesidad de incluir programas de prevención y control de la malaria en las clínicas de cuidado y tratamiento del VIH.

3.2. Impacto de la malaria en la infección por HIV

El efecto de la infección por malaria en la infección por VIH-1 en **adultos** es menos claro. El ciclo de vida del VIH-1 está íntimamente relacionado con el nivel de activación de las células inmunitarias que apoyan la replicación viral. Se ha descrito que las coinfecciones con otros organismos pueden incrementar la activación celular y aumentar la replicación viral, como parece ser el caso de la malaria [114]. Un estudio llevado a cabo en Malawi observó que la carga viral plasmática de VIH-1 era siete veces mayor en pacientes con malaria que en controles y que en algunos pacientes podía reducirse parcialmente con tratamiento antimalárico, sugiriendo que la malaria podría estimular la replicación del VIH-1 [115]. Posteriormente, Kublin et al. [116] observaron que la concentración de carga viral plasmática de VIH-1 se duplicaba con la infección por malaria, y que este aumento era más pronunciado en pacientes con fiebre, con densidades parasitarias mayores de 2.000/ μ L y con recuento de CD4 menores a 300 células/ μ L. Estos estudios sugieren que la infección por malaria podría activar la replicación del VIH-1 mediante la activación de macrófagos y linfocitos CD4 o bien inducir la secreción de factores inmunológicos como el TNF- α [117, 118]. Asimismo, como el incremento de carga viral plasmática del VIH-1 está asociado con una aceleración de la progresión de la enfermedad [115, 116], al incrementar la carga viral plasmática del VIH-1 la malaria podría acelerar la progresión a SIDA [110].

Por otra parte, la infección por malaria puede producir una inmunodepresión transitoria que puede confundir el recuento de CD4 para la evaluación del nivel de inmunodepresión de las personas VIH-positivas. Un estudio llevado a cabo en Uganda por Mermin et al. [119] observó una reducción transitoria del recuento de CD4 durante un episodio clínico de malaria en pacientes VIH-positivos. En la misma línea, el estudio de Van Geertruyden et al. [120] observó un aumento significativo en el recuento de CD4 en los pacientes con infección por malaria que

recibían tratamiento antimalárico adecuado, y este aumento era independiente de su status de VIH.

Tampoco está claro el **impacto de la malaria en la transmisión de madre a hijo del VIH-1**. Al igual que se observa un aumento de la carga viral plasmática de VIH-1 en adultos con infección por *P. falciparum*, la infección por malaria placentaria (PM) se ha asociado con un aumento de la carga viral periférica y placentaria de VIH-1 [20]. Como la alta carga viral materna es un factor de riesgo reconocido de la MTCT del VIH-1 [15, 16, 19], se ha sugerido que la malaria, mediante el aumento de la replicación del VIH-1, puede incrementar el riesgo de MTCT del VIH-1 [18, 19].

Además, la PM se ha asociado con un aumento de la expresión del receptor CCR5 en macrófagos de placenta [121]. El receptor CCR5 es uno de los correceptores que el VIH-1 utiliza para entrar en los macrófagos y linfocitos CD4 (Ver sección 1.2.1.). De esta forma, el aumento de la expresión del receptor CCR5 aumentaría la transmisión, apoyando la hipótesis de que la PM podría aumentar el riesgo de MTCT.

Hasta la fecha sólo cuatro estudios han analizado el efecto de la malaria placentaria en la MTCT del VIH-1, mostrando resultados contradictorios y confirmando el complejo equilibrio entre respuesta inmune a la malaria en el embarazo y la estimulación de la replicación del VIH-1. El primer estudio, realizado por Brahmbatt et al. en Uganda [19], observó que las mujeres con malaria placentaria tenían mayor riesgo de MTCT del VIH-1 (riesgo relativo 2.89 [IC 95%: 1,12-7,52]). Sin embargo, Inion et al. en Kenya [122] no apreció ningún efecto, mientras que Ayisi et al. [15] observó que variaba según la densidad parasitaria y que la malaria placentaria a bajas concentraciones podía reducir el riesgo de MTCT del VIH-1. Recientemente, Brahmbhatt et al. han realizado un estudio en Uganda utilizando una tinción histológica más sensible (HRP-II) para detectar malaria placentaria, y observaron que tras ajustar por la carga viral plasmática del VIH-1 materna, la PM estaba asociada con un mayor riesgo de MTCT del VIH-1 (riesgo relativo 7,9 [IC 95%: 1,4-58,5]) [123].

Las discrepancias de estos estudios reflejan la relación compleja entre la respuesta inmunitaria materna a la malaria, que por un lado podría estimular la replicación viral del VIH-1 en la placenta incrementando la carga viral plasmática del VIH-1, y por otro lado podría favorecer el control de la infección por malaria y la replicación del VIH-1 [18]. Se sabe que la infección por *P. falciparum* actúa sobre la activación del sistema inmune y por lo tanto sobre la secreción de ciertas citoquinas y quimioquinas proinflamatorias [107, 114, 124, 125]. Estudios *in vitro* han demostrado que el TNF- α , IL-6 y el IL-1b activan la replicación del VIH-1 [118, 126], mientras que el IFN- γ y las β -quimiocinas (MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, etc.) la inhiben [127, 128]. Además, varios estudios han observado que las mujeres VIH-negativas con malaria placentaria tienen niveles significativamente mayores de IFN- γ , TNF- α y IL-10 en el plasma del espacio intervilloso de la placenta en el momento del parto comparado con mujeres sin malaria placentaria [129, 130]. Sin embargo, pocos estudios han analizado conjuntamente el efecto de la infección por *P. falciparum* en la secreción de citoquinas en mujeres embarazadas coinfectadas con VIH-1, lo que permitiría mejorar el conocimiento sobre el efecto de la malaria placentaria en la MTCT del VIH-1. En la Tabla 1 se han recogido las principales interacciones propuestas entre la infección por VIH-1 y la infección por malaria en adultos.

Tabla 1- Interacciones VIH-malaria en adultos

Impacto VIH-1 en malaria	Interacción VIH-malaria	Impacto malaria en VIH-1
↑ Parasitemia [107-109]	↑ Mortalidad	↑ Carga viral plasmática del VIH-1 (temporalmente) [115, 116]
↑ Malaria clínica [107-109]	↑ Admisiones hospital	↓ Recuento CD4 [119]
↑ Gravedad [111, 124]	↑ Anemia [131]	? Progresión a SIDA [110, 119]
↑ Fallo tratamiento antimalárico [132, 133]		? Transmisión del VIH-1 [115, 116]
? Transmisión de malaria [110, 134]		

Nota: Se ha utilizado el símbolo de interrogación “?” para aquellos procesos en los que no está claro qué efecto tiene la interacción VIH-malaria

En conclusión, dada la alta carga de ambas enfermedades en el África subsahariana y las grandes complicaciones que causa la coinfección en mujeres embarazadas, es necesario profundizar en los mecanismos moleculares de la interacción VIH-1 y la malaria para poder diseñar programas de prevención y control adecuados. La introducción de tratamientos más avanzados para la prevención de la MTCT del VIH-1 junto con la implementación del tratamiento intermitente antimalárico durante el embarazo en África presenta nuevas oportunidades para frenar los efectos tan perjudiciales de ambas enfermedades durante el embarazo.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

OBJETIVO 1: Caracterizar la epidemiología molecular del VIH-1 en mujeres embarazadas en Manhiça, Mozambique, y analizar la evolución genética entre 1999 y 2004

- 1.1 Determinar los subtipos y los recombinantes de VIH-1 circulantes en el sur de Mozambique mediante el análisis filogenético de regiones LTR, envuelta y proteasa de aislados de 1999 y 2004
- 1.2 Determinar la diversificación de las cepas de VIH-1 mediante el análisis de las distancias genéticas de las regiones LTR, envuelta y proteasa de aislados de 1999 y 2004

OBJETIVO 2: Evaluar el impacto del tratamiento intermitente antimalárico (IPTp) con dos dosis de sulfadoxina-pirimetamina (SP) durante el 2º y 3º trimestre del embarazo en la transmisión vertical del VIH-1

- 2.1 Evaluar el impacto del IPTp con SP en la MTCT del VIH-1
- 2.2 Analizar la relación entre la malaria placentaria y la MTCT del VIH-1
- 2.3 Analizar factores de riesgo de la MTCT del VIH-1 en mujeres de Mozambique

OBJETIVO 3: Evaluar la relación entre la infección materna por *P. falciparum* y la activación del sistema inmunitario en el momento del parto en mujeres embarazadas VIH-positivas

- 3.1 Evaluar el impacto de la infección materna por *P. falciparum* en los niveles de citoquinas plasmáticas periféricas y placentarias en mujeres embarazadas VIH-positivas

RESULTADOS

RESULTADOS

Primer artículo

Rapid spread and genetic diversification of HIV-1 subtype C in a rural area of southern Mozambique (*Rápida propagación y diversificación genética del subtipo C del VIH-1 en un área rural del sur de Mozambique*)

Maria Lahuerta*, Ester Aparicio*, Azucena Bardaji, Sandra Marco, Jahit Sacarlal, Inacio Mandomando, Pedro Alonso, Miguel Angel Martinez, Clara Menendez, Denise Naniche
AIDS Research & Human Retroviruses 2008, 24: 327-335

RESUMEN

INTRODUCCIÓN: La alta tasa de replicación del VIH-1 unida a la alta tasa de error de la transcriptasa reversa contribuyen a la gran diversidad genética del VIH-1. Los análisis genotípicos nos permiten conocer la diversidad molecular del VIH-1, evaluar la aparición de mutaciones de resistencia a antiretrovirales y seguir la evolución de la epidemia globalmente. El objetivo de este estudio era analizar la epidemiología molecular y evaluar la diversidad genética del VIH-1 en una región rural del sur de Mozambique entre 1999 y 2004.

MÉTODOS: Para ello, se analizaron 52 virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) circulantes entre 1999 y 2004 en una región semi-rural del sur de Mozambique. Las muestras de sangre se obtuvieron de mujeres embarazadas VIH-positivas en el momento del reclutamiento y tras la obtención del consentimiento informado en dos estudios diferentes llevados a cabo en 1999 y 2004 en Manhiça. Dado que el TARGA no estaba disponible en Manhiça durante estos estudios, se consideró que estas mujeres no habían estado expuestas a antiretrovirales. Se secuenciaron las regiones long terminal repeat (LTR) U3, envuelta (env) C2V3C3 y proteasa de 21 y 31 muestras de suero de mujeres recogidas en 1999 y 2004, respectivamente y se realizó el análisis filogenético. Además, se evaluaron las mutaciones asociadas a resistencia y polimorfismos presentes en las secuencias de proteasa.

RESULTADOS: El análisis filogenético reveló que todas las secuencias amplificadas pertenecían al subtipo C. Tanto las secuencias de 1999 como las de 2004 se distribuían ampliamente entre múltiples clusters (grupos de secuencias similares) y se relacionaban con diferentes secuencias de países vecinos. Aunque las secuencias de envuelta eran predominantemente CCR5-trópicas (R5), también se identificaron algunas variantes CXCR4-trópicas (X4) (13%).

Las secuencias de 2004 mostraron significativamente una mayor diversidad genética de nucleótidos que las secuencias de 1999. A pesar de no encontrar diferencias en cuanto a la presión selectiva (la proporción de mutaciones sinónimas y no sinónimas (dn/ds) entre ambos grupos era similar), se observó un mayor número de sustituciones de nucleótido sinónimas (sin cambio de aminoácido) y no sinónimas (cambio de aminoácido) en las secuencias del 2004 comparadas con las del 1999. Esto puede ser debido tanto a la diversificación de los virus introducidos antes de 1999 como a la introducción de nuevos virus en Mozambique entre 1999 y 2004. Además, se observó diversificación genética a nivel de aminoácido en proteasa y envuelta, lo que sugiere que en la diversificación viral estuvieron implicadas fuerzas de selección positivas (mutaciones en aminoácidos que mejoran la aptitud del virus).

No se detectó ninguna mutación de resistencia primaria en las secuencias de proteasa, aunque se observó una alta prevalencia de mutaciones menores en las siguientes posiciones: K20R (21.6%), M36I (74.5%), L63P (27.5%) y I93L (94.1%).

CONCLUSIONES Estos resultados revelan la rápida propagación y diversificación del virus del subtipo C en Mozambique, donde la prevalencia de VIH-1 en la clínica antenatal de Manhica alcanzó el 23% en 2004. Aportan información relevante para optimizar los protocolos de TARGA actuales y disminuir el riesgo de resistencia a antiretrovirales, a la vez que ofrece información valiosa para el futuro desarrollo de vacunas frente al VIH-1.

AIDS RESEARCH AND HUMAN RETROVIRUSES
 Volume 24, Number 2, 2008
 © Mary Ann Liebert, Inc.
 DOI: 10.1089/aid.2007.0134

Sequence Note

Rapid Spread and Genetic Diversification of HIV Type 1 Subtype C in a Rural Area of Southern Mozambique

MARIA LAHUERTA,^{1,*} ESTER APARICIO,^{2,*} AZUCENA BARDAJÍ,^{1,3} SANDRA MARCO,²
 JAHIT SACARLAL,^{3,4} INACIO MANDOMANDO,³ PEDRO ALONSO,^{1,3} MIGUEL ANGEL MARTINEZ,²
 CLARA MENENDEZ,^{1,3} and DENISE NANICHE¹

ABSTRACT

In this study, we analyzed the human immunodeficiency type 1 (HIV-1) viruses circulating between 1999 and 2004 in antiretroviral-naïve women from a rural area of southern Mozambique. Nucleotide sequencing of the HIV-1 long terminal repeat (LTR) U3, envelope (*env*) C2V3C3, and protease (*pr*) genomic regions was performed from women sera samples collected in 1999 and 2004. Phylogenetic analysis revealed that all amplified sequences belonged to subtype C. Although *env* sequences were predominantly CCR5-tropic (R5), CXCR4-tropic (X4) variants were also identified (13%). Both 1999 and 2004 sequences were widely dispersed across multiple clusters and were related to different reference sequences from neighboring countries. Sequences from 2004 showed significantly more nucleotide genetic diversity than sequences from 1999. Importantly, genetic diversification was also observed at the *pr* and *env* amino acid level, suggesting that positive selection forces were implicated in the viral diversification. These results indicate the rapid spread and diversification of subtype C virus in Mozambique where HIV-1 prevalence in the Manhica antenatal clinic reached 23% in 2004.

INTRODUCTION

SUB-SAHARAN AFRICA is the region most severely affected by HIV-1, with 24.7 million (60%) of the 39.5 million people living with HIV/AIDS.¹ This region is characterized by the circulation of several genotypes and circulating recombinant forms (CRFs).² However, subtype C viruses are rapidly spreading in southern Africa and becoming the predominant variant of the epidemic, accounting for more than 56% of all global infections.^{3,4} There is evidence that suggests that different subtypes may have distinct biological features that may have an impact on transmissibility and on disease progression.^{5,6} The high genetic variability of HIV-1 and its potential for recombination are clearly important to escape from the immune system and

also play a major role in the development of resistance to highly active antiretroviral therapy (HAART).^{7,8}

There has been tremendous development of new antiretroviral drugs for the treatment of HIV-1 subtype B viruses, but information on their efficacy in nonsubtype B viruses is scarce. Recently, the genetic characterization of the protease and reverse transcriptase genes from non-B subtypes has revealed that minor mutations are often present in natural variants.⁹⁻¹¹ However, it is unknown whether the presence of these polymorphisms facilitates the generation of resistance during treatment with protease inhibitors (PI).¹²

Although Mozambique is ranked as having the tenth highest HIV-1 prevalence in the world, relatively little information on the molecular epidemiology of HIV-1 in Mozambique is avail-

¹Barcelona Center for International Health Research (CRESIB), Hospital Clinic, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain.

²Fundació IrsiCaixa, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Universitat Autònoma de Barcelona, 08916 Badalona, Spain.

³The Manhica Health Research Center (CISM), Manhica, Mozambique.

⁴Faculdade de Medicina da Universidade Eduardo Mondlane, Maputo, Mozambique.

*Both authors contributed equally to this study.

able. Mozambique suffered a long civil war until 1992, and since then, the spread of HIV-1 has been increasing rapidly, with a shift in overall reported prevalence from 8.2% in 1998 to 16.2% in 2004.¹³ The number of people living with HIV-1 is estimated to be approximately 1.8 (1.4–2.2) million, with women representing up to 58% of those infected.¹ In Mozambique, it is estimated that only 3.4% of pregnant women who need antiretroviral therapy (ART) for prevention of mother-to-child transmission actually receive it. Furthermore, of those HIV-1-infected adults in Mozambique who require HAART, only approximately 9% receive treatment.¹

To date, there are only two published studies assessing both HIV-1 subtypes and genetic diversity in Mozambique. One study evaluated drug resistance in drug-naïve HIV-1 patients in two hospitals near Maputo.¹⁴ The second study performed genetic characterization of HIV-1 circulating in Beira, a central region of the country.¹⁵ Both studies determined that subtype C was the dominant HIV-1 subtype. However, in Mozambique longitudinal studies analyzing HIV-1 genetic diversification and evolution are lacking. Large-scale implementation of HAART has begun in many southern and eastern African countries, including Mozambique. Therefore, studies including phylogenetic analysis, drug resistance polymorphisms, genetic diversity, and molecular evolution of HIV-1 may improve the treatment success in this area.

To gain a better understanding of genetic diversity, molecular evolution and epidemiological patterns of HIV-1 spread, and drug resistance polymorphisms, we studied regions in the HIV U3 long terminal repeat (LTR), the envelope (*env*) C2V3C3 and protease (*pr*) gene. This study focused on HIV-1 sequences obtained in 1999 and in 2004, from women living in a semi-rural area of southern Mozambique.

MATERIALS AND METHODS

Study area and population

The study was undertaken at the Centro de Investigação em Saúde da Manhica (CISM) in Manhica District, southern Mozambique. Blood samples were obtained from HIV-positive women at the time of recruitment from two different studies performed in 1999 and 2004.^{16,17} After obtaining written informed consent, blood samples were collected in EDTA anti-coagulant tubes and plasma was stored at -80°C until analyzed. HIV-1 disease status was not available for these women. Since HAART was not available in Manhica during these studies, all women were considered to be drug naïve at recruitment. The 1999 study included 300 women, of whom 30 were HIV⁺, aged 14–61 years and attending antenatal and family planning clinics. The 2004 study included 1030 pregnant women attending the antenatal clinic of whom 207 were HIV⁺. Both studies were approved by the Ethics Review Board of Mozambique and Hospital Clinic of Barcelona.

PCR amplification and sequencing

Extraction of viral RNA from the 1999 plasma samples was performed using the Qiampr viral RNA mini kit (Qiagen) and viral load was determined using the Cobas Amplicor HIV-1

Monitor Test v1.5 (Roche Diagnostics). For the 2004 samples, viral load was determined using the Amplicor HIV-1 Monitor Test v1.5 (Roche Diagnostics) and due to the small volume of samples, RNA extracted during this process was reverse transcribed to cDNA with Superscript II and random hexamer primers (Invitrogen). The RNA template and random primers (300 ng) were heated to 65°C for 10 min, chilled on ice, and reverse transcribed in a 20 μl reaction volume containing 1 \times reaction buffer, 109 mM dithiothreitol, 0.5 mM each deoxynucleoside triphosphate, and 200 U of Superscript reverse transcriptase (Invitrogen) at 37°C for 1 h, followed by 15 min at 95°C . The cDNA was shipped to Fundació Irsi-Caixa (Barcelona, Spain) where amplification and sequencing were performed.

Amplification of the U3 LTR, *env* C2V3C3 region, and *pr* was performed for the 1999 and 2004 samples. The LTR and *env* C2V3C3 regions were amplified following the reaction conditions and primers described in Ibanez *et al.* and Tapia *et al.*, respectively.^{18,19} LTR primers used for first-round amplification were NI25 (HXB2 positions 57–77) and NI23 (HXB2 positions 389–408) and for second-round amplification were NI33 (HXB2 positions 350–372) and NI35 (HXB2 positions 81–100). The outer pair of primers for *env* amplification were ENV1 (HXB2 positions 6858–6878) and ENV4 (HXB2 positions 7520–7539) and the inner primers were ENV2 (HXB2 positions 6885–6904) and ENV3 (HXB2 positions 7365–7385). The *pr* region was amplified from the cDNA with 5PROT1 (5'-ATTTTTTA GGGGAARATYTGCCCT-3'; positions 2084–2106) and 3PROT1 (5'-YTGAGTR TTRTATGGATTTT-CAGG-3'; positions 2703–2727) as outer primers and 5PROT2 (5'-ATTTTTTAGGGGAARATYTGCCCT-3'; positions 2118–2140) and 3PROT2 (5'-CTTTTATTTTCTTCTGTGTYAA-TGG-3'; positions 2622–2646) as inner primers. The following amplification conditions were used for the first-round and nested polymerase chain reaction (PCR): 2 min at 95°C , followed by 35 cycles of 30 s at 95°C , 30 s at 55°C , 40 s at 72°C , and a final extension step at 72°C for 7 min.

Both strands of the PCR fragments were purified with ExoSAP-IT (Applied Biosystems) and sequenced directly using internal (nested) PCR primers and the ABI Prism Dye Terminator Cycle Sequencing Reaction kit (Perkin Elmer). The products of the reactions were then analyzed on an ABIprism 3100 sequencer (Perkin Elmer). Sequence editing was performed using the program SEQUENCHER, version 4.6 (GeneCodes).

Subtyping and phylogenetic analysis

The new sequences were manually edited with BioEdit version 7 and compared to subtype reference strains downloaded from the Los Alamos subtype database (http://hiv-web.lanl.gov/content/hiv-db/SUBTYPE_REF/align.html). To examine intrasubtype variations, a subset of subtype C from neighboring countries was downloaded from the Los Alamos BLAST search database (<http://hiv-web.lanl.gov>). Multiple alignments were performed with Clustal W 1.7.²⁰ Sequence and phylogenetic analyses were performed as previously described.^{21,22} Briefly, phylogenetic trees were created with PAUP* version 4.0b 10 with likelihood settings by selecting the best-fitting evolutionary models with the Akaike identification system, implemented in Modeltest 3.6.^{23,24} The TVM+I+G model was used

HIV-1 SUBTYPE C IN MOZAMBIQUE

3

for LTR, the GTR+I+G model for the protease region, and the K81uf+I+G for the envelope region. The robustness of the trees was evaluated by bootstrap analysis with 1000 rounds of replication. Trees were viewed with Treeview.²⁵ The sequence ID used to name the study sequences is the ID number used in the CISM to track samples, while the sequence ID for the reference strains has been simplified with the initials of the country.

Mean genetic distances were measured with the corresponding model for each region implemented in PAUP* version 4.0b.²³ SNAP (<http://hiv-web.lanl.gov>) was used to calculate the synonymous-to-nonsynonymous substitution ratio.^{26,27} The V3 loop amino acid sequences were introduced into the WebPSSM program (<http://ubik.microbiol.washington.edu/computing/pssm>) to determine the coreceptor usage and the net charge of the V3 loop.²⁸⁻³⁰ The V3 loop of the virion's envelope glycoprotein gp120 has been identified as a major determinant for viral tropism and coreceptor usage, depending on its net charge and the polarity of the amino acids located at positions 11 and 25.³¹ A lower V3 net charge facilitates a tighter interaction of gp120 with CCR5 while a higher V3 net charge facilitates the interaction with CXCR4.³²

Drug resistance genotyping

The Stanford University HIV Drug Resistance database (aIG Program) (<http://hivdb.stanford.edu>) was used to determine resistance-associated mutations and polymorphisms present in the protease (1999 and 2004 sequences). Known mutations and/or polymorphisms were assessed in the protease sequences from 1999 ($n = 20$) and from 2004 ($n = 31$).

Statistical analyses

The nonparametric Mann-Whitney test was used to test for differences between intrasubtype genetic distances, synonymous and nonsynonymous mutations, and distance to ancestor between 1999 and 2004 sequences. A p value lower than 0.05 was considered statistically significant. Analyses were performed using the Graph Pad software package, version 4 (GraphPad Software, Inc.).

RESULTS*Characteristics of the study population*

Manhiça district, a semirural area of southern Mozambique, has an estimated population of 36,000 inhabitants under demographic surveillance prior to 2004. The prevalence of HIV-1 infection in pregnant women attending the antenatal clinic was 12% in 1999 and 23% in 2004.^{16,17} Both in 1999 and 2004, the two populations were women, with a median age of 33 (IQR 25-48) and 23 (IQR 20-30) years, respectively. All women from the 2004 study and 60% of women from the 1999 study were pregnant at the time of sample collection. The two groups had similar viral load levels, with median values of 12,200 copies/ml (IQR 3650-36,100) for the 1999 study population and 18,620 (IQR 10,388-49,091) copies/ml for the 2004 study population ($p = 0.11$).

Subtyping and phylogenetic analysis

To subtype and determine the phylogenetic relationships between sequences, the LTR, *env*, and *pr* regions were amplified from available sera samples collected in 1999 and 2004. Of the 30 HIV+ blood samples available from 1999, amplification was successfully performed for LTR ($n = 21$), *env* ($n = 18$), and *pr* ($n = 20$). Of the 207 HIV+ women in the 2004 study, 51 were randomly chosen for this study. Due to small quantities of cDNA, out of the 51 samples available from 2004, amplification was performed for LTR ($n = 37$), *env* ($n = 32$), and *pr* ($n = 31$).

Phylogenetic analysis showed that all sequences from LTR, *env*, and *pr* clustered into the subtype C clade (data not shown). To investigate within-subtype C clustering, phylogenetic trees were constructed with published LTR, envelope, and protease C sequences from central Mozambique and several sequences from nine different African neighboring countries (South Africa, Zimbabwe, Tanzania, Malawi, Ethiopia, Kenya, Botswana, Somalia, and Senegal) from the sequences available at the Los Alamos HIV sequence database (http://www.hiv.lanl.gov/components/hiv-db/combined_search_s_tree/search.html).

Both 1999 and 2004 envelope sequences from Manhiça were widely dispersed across multiple clusters (Fig. 1A). Similar tree topologies were obtained for LTR and protease (Fig. 1B and C), although the envelope tree tended to have higher bootstrap values reflecting a higher robustness of the clusters.

Different phylogenetic associations were observed with other subtype C sequences from neighboring countries. However, distance matrix-based phylogenetic analysis did not reveal potential clusters and couples of genetically related sequences (bootstrap values higher than 70%) between our sequences and any of the reference sequences from neighboring countries. Distinct sublineages consisting only of closely related Mozambican sequences from 1999 and 2004 with bootstrap values higher than 70% were identified in LTR, envelope, and protease, suggesting an epidemiological link between these samples (marked with brackets in Fig 1).

Genetic divergence and selection pressure

To assess the intrasubtype genetic diversity, the genetic distances between each set of sequences were calculated. Significantly higher median genetic distances were observed for sequences from 2004 as compared to sequences from 1999 in all regions assessed: LTR, *env*, and *pr* (Table 1). Larger median genetic distances reflecting increased genetic diversity were most pronounced in the envelope region.

Sequences were compared to assess the mutational pattern of protease and envelope in the absence of drug therapy (Table 1). Both genes were found to be under purifying (negative) selection pressure with a ratio of ds/dn greater than 1. The average ds/dn for both 1999 and 2004 sequences was 1.979 and 2.047 for the envelope region and 6.123 and 7.196 for the protease region, respectively. Protease showed very low rates of nonsynonymous mutations reflecting different pressure constraints between *pr* and *env* genes.

Coreceptor usage determined by V3 loop sequences

The average net charge in this group of sequences was +4.3. The characteristic GPGQ crown found in most non-B subtypes



FIG. 1. (A) Envelope sequences from Manhiça (both 1999 and 2004) were widely dispersed across multiple clusters. Similar tree topologies were obtained for LTR (B) and protease (C).

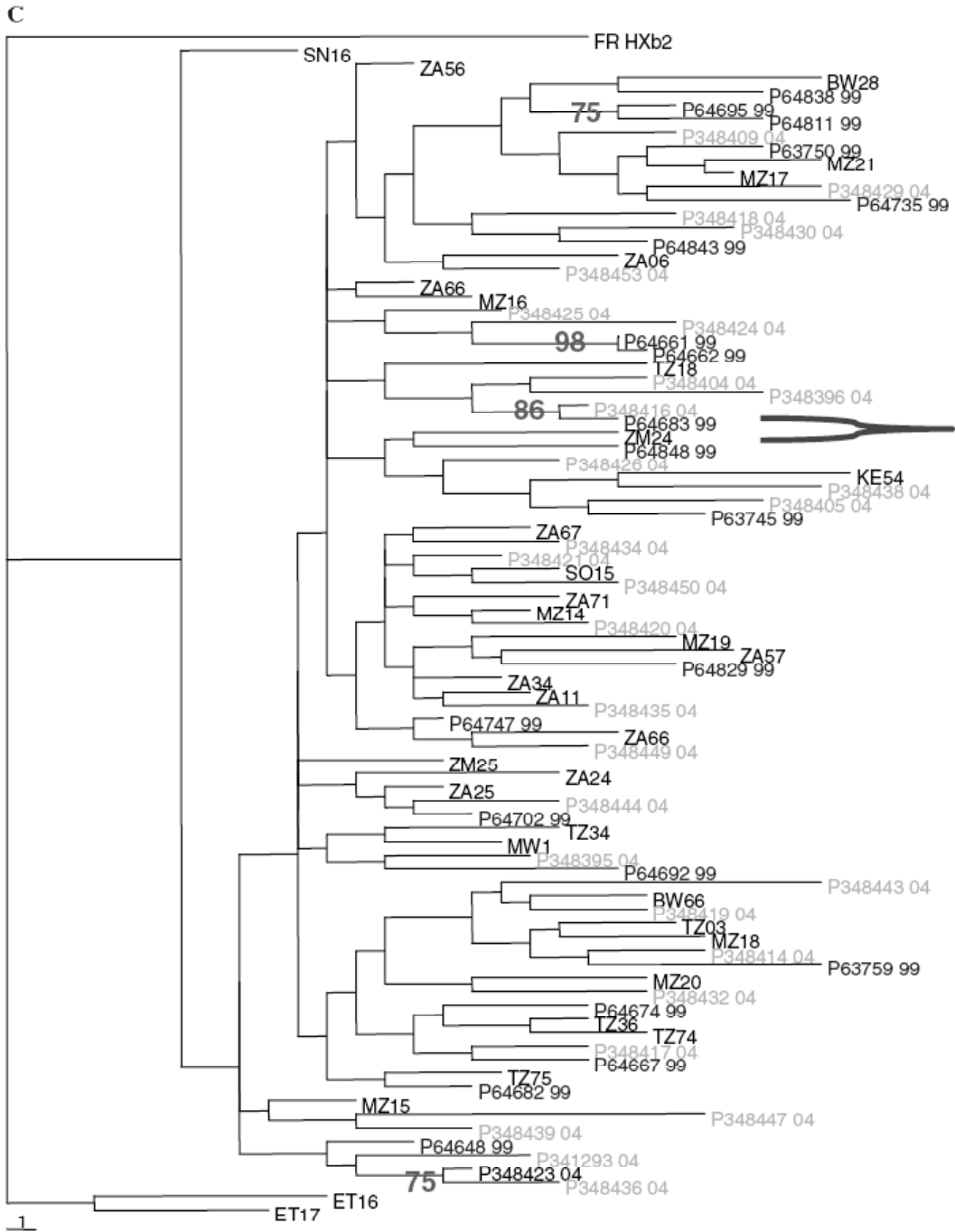


FIG. 1. (Continued).

HIV-1 SUBTYPE C IN MOZAMBIQUE

7

TABLE 1. GENETIC DISTANCES, RATIO OF NONSYNONYMOUS TO SYNONYMOUS AMINO ACID SUBSTITUTIONS

	1999 sequences ^a		2004 sequences ^b		p-value
	Median	SD	Median	SD	
Genetic distances					
LTR	0.1345	0.035	0.157	0.036	0.0085 ^c
Protease	0.0664	0.0189	0.071	0.0179	0.0085 ^c
Envelope	0.1805	0.046	0.2	0.037	0.0001 ^c
Envelope					
Synonymous substitutions	0.2204	0.0583	0.2431	0.07264	0.0022 ^c
Nonsynonymous substitutions	0.115	0.02651	0.1236	0.02295	0.0001 ^c
Ratio <i>ds/dn</i>	1.979	0.589	2.047	0.7758	0.6855
Protease					
Synonymous substitutions	0.1551	0.0431	0.1703	0.04397	0.0001 ^c
Nonsynonymous substitutions	0.02826	0.01171	0.0297	0.0116	0.2202
Ratio <i>ds/dn</i>	6.123	7.521	7.196	5.265	0.3129

^a1999 samples: LTR (*n* = 21), *env* (*n* = 18), and *pr* (*n* = 20).

^b2004 samples: LTR (*n* = 37), *env* (*n* = 32), and *pr* (*n* = 31).

^cp-values <0.05 were considered statistically significant.

was conserved in 98% (49/50) of the samples. According to the sequence analysis with WebPSSM, 88% (44/50) of the viruses potentially used CCR5, with six sequences reflecting potential R5X4 or X4 receptor usage (three from 1999 and three from 2004). Although these results indicated a predominance of R5 viruses, they also showed that potential X4 receptor usage is not prohibited in subtype C envelope regions.

Mutations associated with drug resistance to protease inhibitors

No primary resistance mutations to protease inhibitors were detected in any of the 51 samples. However, a high prevalence of minor mutations was observed at the following positions: K20R (21.6%), M36I (74.5%), L63P (27.5%), and I93L (94.1%). Other polymorphisms present at lower frequency are reported in Table 2.

DISCUSSION

Despite the high prevalence of HIV-1 in Mozambique, so far only two studies have examined the genetic diversity of Mozambican HIV-1 viruses.^{14,15} Thus, the aim of this study was to characterize the HIV-1 epidemic at a molecular level in women from a rural area of southern Mozambique and to assess viral genetic diversity in 1999 and in 2004.

Subtype analysis showed that all the LTR, envelope, and protease regions studied were subtype C, in accordance with other studies that found all HIV-1 isolates in Maputo, Mozambique to be subtype C and all but one to be subtype C in Beira.^{14,15} Overall, these results indicate that the HIV-1 epidemic in Mozambique is quite homogeneous with regard to subtype since it is composed almost exclusively of clade C viruses. This is similar to the situation found in neighboring countries such as South Africa, but different from countries such as Tanzania that also have A and D viruses circulating.^{19,33} Phylogenetic analyses revealed that Mozambican sequences did not form a coun-

try-specific cluster. Instead, sequences were randomly spread throughout the trees without showing different homology from other subtype C sequences from neighboring countries. The wide genetic variation of these sequences suggests multiple introductions of subtype C viruses in Mozambique and thus confirms the existence of multiple circulating clade C sublineages in southern Africa as described.³⁴ Studies of population migrations suggest that HIV-1 introduction into Mozambique may have been associated with the frequent temporary labor migrations of adult males from southern Mozambique to South Africa.³⁵

Nucleotide substitutions in genes coding for proteins can be either synonymous (no change of amino acid) or nonsynonymous (change of amino acid). Investigating the number of syn-

TABLE 2. FREQUENCY OF KNOWN MUTATIONS/POLYMORPHISMS DETECTED IN HIV PROTEASE FROM ARV DRUG-NAIVE WOMEN

Mutation	Protease	
	Number of strains	Frequency of mutation (%) (N = 51)
L10V	1	2
L10I	1	2
K20R	11	21.6
M36I	38	74.5
M36V	1	2
M36L	2	3.9
L63P	14	27.5
L63A	2	3.9
L63S	1	2
L63V	1	2
A71T	2	3.9
V77I	8	15.7
V77L	1	2
I93L	48	94.1

onymous and nonsynonymous substitutions may therefore provide information on the degree of selection operating on the virus. Both in *env* and *pr*, the number of synonymous substitutions increased between 1999 and 2004. Nonsynonymous substitutions also increased in *env*, indicating that higher variability in this region of *env* may be caused by the evolutionary force of genetic drift in addition to external selective pressure. An interesting finding of the present study is the higher synonymous and nonsynonymous diversity found within the 2004 sequences as compared to the 1999 sequences. Moreover, median genetic distances were also higher for the 2004 sequences. Although we cannot exclude that differences observed are due to small sample size, it can be hypothesized that the higher heterogeneity of the 2004 viruses may be due to both (1) the introduction of new viruses in Mozambique between 1999 and 2004 as well as (2) the diversification of the viruses introduced prior to 1999. Whether this diversification affects the transmissibility or virulence of subtype C viruses remains to be elucidated. It has been suggested that the genetic bottlenecks created by the transmission of few clones of HIV-1 and pressure from the immune system could reduce the overall fitness of the virus. Furthermore, with the dramatic global spread of subtype C, the question has been raised as to whether this dominance is related to an attenuation of virulence, but this has yet to be investigated.³⁶

Primary resistance mutations to protease inhibitors were not found in either the 1999 or 2004 sequences. Nevertheless, a high prevalence of secondary resistance mutations was observed in our sequences, predominantly the M36I and I93L mutations. Although the prevalence of polymorphisms is higher than that described for subtype B viruses, these results are consistent with the high prevalence described in two studies conducted in Mozambique and with other studies performed on non-B clades.^{10,14,15,37,38} The implications of a high prevalence of secondary resistance mutations in subtype C are not known, although the mutation at M36 in the B clade has been associated with greater risk of virological failure and with the appearance of the major resistance mutation I.90M.^{12,39}

The prediction of CCR5 or CXCR4 receptor usage based on the net charge of the V3 loop and the presence of the GPGQ crown indicated that most viruses in this study potentially used CCR5, with 13% potentially displaying X4 or mixed R5X4 usage. Little is known in Africa regarding CCR5 and CXCR4 usage as a reflection of disease progression. It is generally accepted that viruses present in an individual early in HIV-1 infection are predominantly R5, but the timing of the R5-X4 switch for subtype C viruses is unclear.^{40–43} Nevertheless, as described by Coetzer *et al.*, our results show that CXCR4 usage is not a rare event in subtype C viruses as previously suggested.^{44–46} Unfortunately, CD4⁺ T cell counts were not available for the samples analyzed and consequently we were unable to assess correlations between CXCR4 usage and disease stage.

In conclusion, this study describes the genetic diversity, molecular evolution, and epidemiological patterns of HIV-1 spread in women from a rural area of southern Mozambique. As implementation of HAART has begun in this area, the description of drug resistance polymorphisms in antiretroviral drug-naïve women will be relevant to future evaluations of antiretroviral therapy programs.

SEQUENCE DATA

The GenBank accession numbers of the sequences reported in this paper are EF407648–EF407665 and EF407667–EF407809. The GenBank accession numbers of the reference sequences from neighboring countries used in the phylogenetic trees are AF023427, AF023431, AF127568, AF023430, AF096778, AF096780, AF096782, U63536, U63539, AY452654, AF196734, AF196733, AF196732, AY452658, AY162225, AF290029, AY162224, AF239628, AF239638, AF239633, AF239654, AF254734, AF254686, AF254723, AF254711, AB192571, AF102218, AF102202, AF102207, AB191674, AB191676, AB191660, AB191679, U08455, U51292, AM076841, AM076843, AM076847, and AM076846.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to all the women enrolled in the study and for the continued dedication of VCT, field, clinic, and data management staff at the Centro de Investigação em Saúde de Manhica, Mozambique. This study was supported by Grant SAF-05845 from the Spanish Ministry of Education and Science and a grant from the Banco de Bilbao, Vizcaya Argentaria foundation (Grant BBVA 02-0). Financial support was also provided by the Spanish Fondo de Investigación Sanitaria (FIS01/1236). The “Centro de Investigação em Saude de Manhica” receives core funding from the Spanish Agency for International Cooperation and the VCT center is supported by Generalitat de Catalunya. M.L. was supported by a grant from the IDIBAPS. Work at IrsiCaixa was supported by Spanish Ministry of Education and Science project BFU2006-01066/BMC and FIPSE project 36549/06.

REFERENCES

- UNAIDS/WHO: AIDS Epidemic Update: December 2006. UNAIDS/WHO, Geneva, 2006.
- Leitner T, Korber B, Daniels M, Calef C, *et al.*: HIV-1 subtype and circulating recombinant form (CRF) reference sequences, 2005. Sequence Compendium. <http://www.hiv.lanl.gov/content/hiv-db/REVIEWS/reviews.html>. Los Alamos National Laboratories, Los Alamos, NM, 2005.
- Julg B and Goebel FD: HIV genetic diversity: Any implications for drug resistance? *Infection* 2005;33:299–301.
- Butler IF, Pandrea I, Marx PA, and Apetrei C: HIV genetic diversity: Biological and public health consequences. *Curr HIV Res* 2007;5:23–45.
- Thomson MM and Najera R: Molecular epidemiology of HIV-1 variants in the global AIDS pandemic: An update. *AIDS Rev* 2005;7:210–224.
- Geretti AM: HIV-1 subtypes: Epidemiology and significance for HIV management. *Curr Opin Infect Dis* 2006;19:1–7.
- Geretti AM: Clinical implications of HIV drug resistance to nucleoside and nucleotide reverse transcriptase inhibitors. *AIDS Rev* 2006;8:210–220.
- Kantor R and Katzenstein D: Polymorphism in HIV-1 non-subtype B protease and reverse transcriptase and its potential impact on drug susceptibility and drug resistance evolution. *AIDS Rev* 2003;5:25–35.
- Montes B, *et al.*: Comparison of drug resistance mutations and their interpretation in patients infected with non-B HIV-1 variants and matched patients infected with HIV-1 subtype B. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2004;35:329–336.

HIV-1 SUBTYPE C IN MOZAMBIQUE

9

10. Vergne L, *et al.*: Genetic diversity of protease and reverse transcriptase sequences in non-subtype-B human immunodeficiency virus type 1 strains: Evidence of many minor drug resistance mutations in treatment-naïve patients. *J Clin Microbiol* 2000;38:3919–3925.
11. Vergne L, *et al.*: Natural polymorphism in protease and reverse transcriptase genes and in vitro antiretroviral drug susceptibilities of non-B HIV-1 strains from treatment-naïve patients. *J Clin Virol* 2006;36:43–49.
12. Perno CF, *et al.*: Minor mutations in HIV protease at baseline and appearance of primary mutation 90M in patients for whom their first protease-inhibitor antiretroviral regimens failed. *J Infect Dis* 2004;189:1983–1987.
13. UNAIDS/WHO. Uniting the world against AIDS. http://www.unaids.org/en/Regions_Countries/Countries/mozambique.asp. UN Technical Working Group, Mozambique, 2006.
14. Bellocchi MC, *et al.*: Subtype analysis and mutations to antiviral drugs in HIV-1-infected patients from Mozambique before initiation of antiretroviral therapy: Results from the DREAM programme. *J Med Virol* 2005;76:452–458.
15. Parreira R, *et al.*: Genetic characterization of human immunodeficiency virus type 1 from Beira, Mozambique. *Microbes Infect* 2006;8:2442–2451.
16. Menendez C, *et al.*: Prevalence and risk factors of sexually transmitted infections and cervical neoplasia in women from a rural area of Southern Mozambique (submitted for publication).
17. Menendez C, *et al.*: Combination of interventions for malaria prevention in pregnancy. *PLOS One* (in press).
18. Ibanez A, Clotet B, and Martinez MA: Absence of genetic diversity reduction in the HIV-1 integrated proviral LTR sequence population during successful combination therapy. *Virology* 2001;282:1–5.
19. Tapia N, *et al.*: Influence of human immunodeficiency virus type 1 subtype on mother-to-child transmission. *J Gen Virol* 2003;84:607–613.
20. Thompson JD, Higgins DG, and Gibson TJ: CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 1994;22:4673–4680.
21. Fernandez G, *et al.*: Purifying selection of CCR5-tropic HIV-1 variants in AIDS subjects that have developed syncytium-inducing CXCR4-tropic viruses. *J Gen Virol* 2006;87:1285–1294.
22. Fernandez G, *et al.*: Fitness landscape of HIV-1 protease quasi-species. *J Virol* 2007;81:2485–2496.
23. Swofford DL: *PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods)*. Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, MA, 2003.
24. Akaike H: A new look at statistical model identification. *IEEE Trans Automatic Control* 1997;19:716–723.
25. Page RDM: TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput Appl Biosci* 1996;12:357–358.
26. Aylor DL, Price EW, and Carbone I: SNAP: Combine and map modules for multilocus population genetic analysis. *Bioinformatics* 2006;22:1399–1401.
27. Price EW and Carbone I: SNAP: Workbench management tool for evolutionary population genetic analysis. *Bioinformatics* 2005;21:402–404.
28. Brumme ZL, *et al.*: Clinical and immunological impact of HIV envelope V3 sequence variation after starting initial triple antiretroviral therapy. *AIDS* 2004;18:F1–F9.
29. Jensen MA, Coetzer M, van't Wout AB, Morris L, and Mullins JE: A reliable phenotype predictor for human immunodeficiency virus type 1 subtype C based on envelope V3 sequences. *J Virol* 2006;80:4698–4704.
30. Jensen MA, *et al.*: Improved coreceptor usage prediction and genotypic monitoring of R5-to-X4 transition by motif analysis of HIV-1 env V3 loop sequences. *J Virol* 2003;77:13376–13388.
31. Xiao L, *et al.*: CCR5 coreceptor usage of non-syncytium-inducing primary HIV-1 is independent of phylogenetically distinct global HIV-1 isolates: Delineation of consensus motif in the V3 domain that predicts CCR-5 usage. *Virology* 1998;240:83–92.
32. Pollakis G, *et al.*: N-linked glycosylation of the HIV type-1 gp120 envelope glycoprotein as a major determinant of CCR5 and CXCR4 coreceptor utilization. *J Biol Chem* 2001;276:13433–13441.
33. Arroyo MA, *et al.*: HIV-1 diversity and prevalence differ between urban and rural areas in the Mbeya region of Tanzania. *AIDS* 2005;19:1517–1524.
34. Gordon M, *et al.*: Molecular characteristics of human immunodeficiency virus type 1 subtype C viruses from KwaZulu-Natal, South Africa: Implications for vaccine and antiretroviral control strategies. *J Virol* 2003;77:2587–2599.
35. Nhacolo AQ, *et al.*: Levels and trends of demographic indices in southern rural Mozambique: Evidence from demographic surveillance in Manhica district. *BMC Public Health* 2006;6:291.
36. Arien KK, Vanham G, and Arts EJ: Is HIV-1 evolving to a less virulent form in humans? *Nat Rev Microbiol* 2007;5:141–151.
37. Marechal V, *et al.*: Increasing HIV type 1 polymorphic diversity but no resistance to antiretroviral drugs in untreated patients from Central African Republic: A 2005 study. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2006;22:1036–1044.
38. Perno CF, *et al.*: Low prevalence of primary mutations associated with drug resistance in antiviral-naïve patients at therapy initiation. *AIDS* 2002;16:619–624.
39. Perno CF, *et al.*: Secondary mutations in the protease region of human immunodeficiency virus and virologic failure in drug-naïve patients treated with protease inhibitor-based therapy. *J Infect Dis* 2001;184:983–991.
40. Connor RI, Sheridan KE, Ceradini D, Choe S, and Landau NR: Change in coreceptor use correlates with disease progression in HIV-1-infected individuals. *J Exp Med* 1997;185:621–628.
41. Pastore C, Ramos A, and Mosier DE: Intrinsic obstacles to human immunodeficiency virus type 1 coreceptor switching. *J Virol* 2004;78:7565–7574.
42. Johnston ER, *et al.*: High frequency of syncytium-inducing and CXCR4-tropic viruses among human immunodeficiency virus type 1 subtype C-infected patients receiving antiretroviral treatment. *J Virol* 2003;77:7682–7688.
43. Ping LH, *et al.*: Characterization of V3 sequence heterogeneity in subtype C human immunodeficiency virus type 1 isolates from Malawi: Underrepresentation of X4 variants. *J Virol* 1999;73:6271–6281.
44. Coetzer M, *et al.*: Longitudinal analysis of HIV type 1 subtype C envelope sequences from South Africa. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2007;23:316–321.
45. Morris L, Cilliers T, Bredell H, Phoswa M, and Martin DJ: CCR5 is the major coreceptor used by HIV-1 subtype C isolates from patients with active tuberculosis. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2001;17:697–701.
46. Peeters M, *et al.*: Evidence for differences in MT2 cell tropism according to genetic subtypes of HIV-1: Syncytium-inducing variants seem rare among subtype C HIV-1 viruses. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1999;20:115–121.

Address reprint requests to:

Denise Nanche

Barcelona Center for International Health (CRESIB)

IDIBAPS/Hospital Clinic

Villarroel, 170 Barcelona, E-08036 Spain

E-mail: dsuzanne@clinic.ub.es

Mother-to-child transmission of HIV-1: association with malaria prevention, anaemia and placental malaria (*Transmisión de madre a hijo del VIH-1: asociación con la prevención de malaria, la anemia y la malaria placentaria*)

Denise Naniche, Maria Lahuerta, Azucena Bardaji, Betuel Sigauque, Cleofe Romagosa, Anna Berenguera, Inacio Mandomando, Catarina David, Sergi Sanz, John Aponte, Jaume Ordi, Pedro Alonso, Clara Menendez

HIV Medicine 2008, 9: 757-764

RESUMEN

INTRODUCCIÓN: Varios estudios han observado que la infección por *P. falciparum* aumenta la replicación viral del VIH-1, por lo que se pensó que la infección por *P. falciparum* durante el embarazo podría aumentar la tasa de transmisión de madre a hijo del VIH-1 (MTCT). Sin embargo, los estudios realizadas hasta la fecha presentan resultados contradictorios observando que la infección por *P. falciparum* en mujeres embarazadas puede no tener efecto, aumentar o incluso disminuir el riesgo de la MTCT del VIH-1. En este estudio se analizó el impacto del tratamiento intermitente preventivo durante el embarazo (IPTp) en la MTCT del VIH-1 en el marco del programa de prevención de la MTCT del VIH-1 con sdNVP en una región rural del sur de Mozambique.

MÉTODOS: El presente estudio estaba integrado en un ensayo aleatorizado a doble ciego controlado con placebo cuyo objetivo principal era evaluar si el tratamiento intermitente antimalárico preventivo con sulfadoxina-pirimetamina (SP) tenía un efecto protector añadido al uso de redes mosquiteras impregnadas con insecticida en la prevalencia del bajo peso al nacer del recién nacido (LBW). Entre agosto 2003 y abril 2005 se reclutaron 1.030 mujeres embarazadas en la clínica antenatal que recibieron aleatoriamente dos dosis de SP o placebo a partir del 2º trimestre con un mes de separación. De las 870 (84,5%) mujeres que aceptaron hacerse la prueba del VIH en el momento del reclutamiento, 207 (23,7%) resultaron VIH-positivas y dieron consentimiento informado para participar en el presente estudio. Para estas

207 mujeres, se evaluó la carga viral plasmática del VIH-1 y el recuento de CD4 en el reclutamiento y un mes tras el parto. Además, se determinó la carga viral periférica y placentaria del VIH en el momento del parto. En el parto se evaluó la anemia materna y la malaria periférica y placentaria. El status VIH del niño se determinó por DNA PCR al mes de nacer.

RESULTADOS: En total, 90 participantes recibieron placebo y 117 recibieron SP. Sesenta y ocho niños (75%) del grupo placebo y 85 (73%) del grupo SP tuvieron resultado de VIH por DNA PCR al mes de nacer. Dos dosis de SP IPTp no tuvieron un impacto significativo en la MTCT (11.8% en el grupo SP versus 13.2% en el grupo placebo; $P=0.784$) o en la carga viral materna [16,312 (IQR:4,076-69,296) copias/mL en el grupo SP versus 18,274 (IQR:5,471-74,104) copias/mL en el grupo placebo; $P=0.715$]. En un subgrupo de 95 mujeres con recuento de CD4 disponible, no se observó diferencia en los niveles de CD4 en el momento del reclutamiento por grupo de tratamiento ni por infección de malaria.

En el análisis multivariado, la carga viral materna (AOR 19,9 [95% CI, 2.3-172]; $P=0.006$) y la anemia (hematocrito $<33\%$) (AOR 7.5 [95% CI, 1.7-32.4]; $P=0.007$) se detectaron como factores de riesgo independientes para la MTCT y se observó que la malaria placentaria estaba asociada con un descenso de la MTCT (AOR 0.23 [95%CI, 0.06-0.89]; $P=0.034$).

CONCLUSIONES: Aunque el IPTp con dos dosis de SP redujo moderadamente la malaria placentaria [59], esto no se tradujo en una reducción significativa de la MTCT del VIH-1. En este estudio, la malaria placentaria parecía estar asociada con una reducción de la MTCT del VIH-1, poniendo de relieve la compleja relación entre la malaria placentaria y la MTCT del VIH-1. Es por ello necesario clarificar qué efectos producen los parásitos, el pigmento malárico, la inflamación y los diferentes microambientes de citoquinas y quimioquinas en la placenta en la MTCT del VIH-1. Finalmente, y dado que la anemia materna puede ser un factor de riesgo relevante en la MTCT del VIH-1, es importante seguir estudiando el impacto de las diferentes

etiologías de la anemia en la MTCT para poder diseñar intervenciones apropiadas para reducir la anemia y la MTCT del VIH-1.

ORIGINAL RESEARCH

Mother-to-child transmission of HIV-1: association with malaria prevention, anaemia and placental malaria*

D Nanche,¹ M Lahuerta,¹ A Bardaji,^{1,2} B Sigauque,^{2,3} C Romagosa,^{1,2} A Berenguera,^{1,2} I Mandomando,^{1,2,3} C David,^{2,3} S Sanz,¹ J Aponte,¹ J Ordi,¹ P Alonso^{1,2} and C Menendez^{1,2}

¹Barcelona Center for International Health Research (CRESIB), and Department of Pathology, Hospital Clinic, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Universitat de Barcelona, Spain, ²The Manhica Health Research Center (CISM), Manhica, Mozambique and ³Instituto Nacional de Saude, Ministerio de Saude, Maputo, Mozambique

Objectives

Malaria infection may impact on mother-to-child transmission (MTCT) of HIV-1. Prevention of malaria in pregnancy could thus potentially affect MTCT of HIV. We studied the impact of intermittent preventive treatment during pregnancy (IPTp) on HIV-1 MTCT in southern Mozambique.

Methods

A total of 207 HIV-positive Mozambican pregnant women were enrolled in the study as part of a randomized placebo-controlled trial of two-dose sulfadoxine-pyrimethamine (SP) IPTp in women receiving single-dose nevirapine to prevent MTCT of HIV. HIV RNA viral load, maternal anaemia and peripheral and placental malaria were assessed at delivery. Infant HIV status was determined by DNA polymerase chain reaction (PCR) at 1 month of age.

Results

There were 19 transmissions of HIV in 153 mother–infant pairs. IPTp with SP did not have a significant impact on MTCT (11.8% in the SP group *vs.* 13.2% in the placebo group; $P = 0.784$) or on maternal HIV RNA viral load [16 312 (interquartile range {IQR} 4076–69 296) HIV-1 RNA copies/mL in the SP group *vs.* 18 274 (IQR 5471–74 104) copies/mL in the placebo group; $P = 0.715$]. In multivariate analysis, maternal HIV RNA viral load [adjusted odds ratio (AOR) 19.9; 95% confidence interval (CI) 2.3–172; $P = 0.006$] and anaemia (haematocrit <33%; AOR 7.5; 95% CI 1.7–32.4; $P = 0.007$) were independent risk factors for MTCT. Placental malaria was associated with a decrease in MTCT (AOR 0.23; 95% CI 0.06–0.89; $P = 0.034$).

Conclusions

IPTp with SP was not associated with a significant impact on MTCT of HIV. Maternal anaemia was an independent risk factor for MTCT.

Keywords: anaemia, intermittent preventive treatment, mother-to-child transmission, placental malaria, pregnancy

Received: 18 February 2008, accepted 15 May 2008

Introduction

HIV/AIDS and malaria infections are two of the most important global health problems of our time, and strongly overlap in sub-Saharan Africa [1]. The detrimental effects of this interaction may be especially relevant during pregnancy, with adverse outcomes for both the mother and the infant [2,3].

Vertical transmission of HIV occurs at an approximate rate of 25–40% in untreated breast feeding populations [4,5]. Maternal RNA viral load [2,6,7], low CD4 cell count

*This work was presented in part at the 55th Annual Meeting of the American Society of Tropical Medicine & Hygiene, Atlanta, 12–16 November 2006 (Abstract 324).

The website of the U.S. National Institutes of Health Registry can be found at www.clinicaltrials.gov; trial registration number: NCT.00209781.

Correspondence: Dr Denise Nanche, Barcelona Center for International Health Research (CRESIB), and Department of Pathology, Hospital Clinic, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Universitat de Barcelona, Villarroel, 170 E-08036 Barcelona, Spain. e-mail: dsuzanne@clinic.ub.es

[7,8], malnutrition [9,10] and low birth weight [7,8,11] have been reported as independent risk factors for mother-to-child transmission (MTCT). In addition to these risk factors, common infections in sub-Saharan Africa such as syphilis [8] and helminth infections [12] have also been suggested to impact MTCT. The impact of malaria on HIV MTCT is unclear, particularly as interactions between HIV and malaria may operate in both directions [2]. Several studies have reported a transient increase in peripheral HIV RNA viral load in adults and pregnant women with peripheral malaria which is resolved with effective antimalarial therapy [13–16]. As maternal HIV RNA viral load is a recognized risk factor for MTCT [6,7,11], it has been suggested that malaria, by increasing the replication of HIV, may increase the risk of MTCT [2,6]. However, studies assessing the impact of placental malaria (PM) on MTCT have produced conflicting results, suggesting either that PM could increase MTCT or that low-density PM parasitaemia could decrease MTCT [6,7,17,18].

Pregnant women are especially susceptible to malaria infection, which is associated with considerable maternal and infant morbidity and mortality. The World Health Organization recommends that pregnant women in stable transmission areas receive intermittent preventive treatment (IPTp) with sulfadoxine-pyrimethamine (SP) and sleep under insecticide-treated nets (ITNs). However, the efficacy of the concomitant use of these two interventions has not been evaluated. IPTp consists of the provision of two doses, at least 1 month apart, of an antimalarial drug at normal treatment dosages, from the second trimester onwards, irrespective of the presence of parasites or symptoms [19]. Current MTCT prevention programmes in most sub-Saharan African countries include single-dose nevirapine (NVP) during labour/delivery or, when available, zidovudine and lamivudine during the final weeks of pregnancy and single-dose NVP at delivery [20].

The aim of this study was to evaluate the impact of IPTp with SP on MTCT of HIV-1 via effects on PM in a semi-rural area of southern Mozambique with a high prevalence of HIV.

Methods

Study population

The present study was conducted from August 2003 to October 2006 at the Manhiça Health Center, in Manhiça District, Maputo province in southern Mozambique. The Centro de Investigaçao em Saude de Manhiça (CISM) has been carrying out continuous demographic surveillance since 1996 in Manhiça District, which covered a population of 36 000 inhabitants prior to 2004 [21]. In this semi-rural area malaria transmission is perennial with some season-

ality, and *Plasmodium falciparum* is the predominant species, accounting for 90% of malaria cases. At the time of study, malaria control in pregnancy relied exclusively upon case management.

In accordance with national guidelines, a voluntary counselling and testing (VCT) programme for prevention of MTCT of HIV was integrated into routine practice at the antenatal clinic (ANC) in July 2003. At that time, highly active antiretroviral therapy (HAART) was not available, and the national policy on prevention of MTCT relied upon the self-administration of NVP to the mother at the onset of labour and the administration of NVP to the newborn at the ANC within the first 72 h of life. The prevalence of HIV infection in pregnant women attending the ANC in 2004 was estimated to be approximately 21% [22].

Study design

This study was integrated into a randomized double-blind, placebo-controlled trial of two-dose IPTp with SP in addition to long-lasting insecticide-treated nets (LLITNs) for malaria prevention in pregnancy (trial registration number: NCT.00209781). Details of the trial design are given elsewhere [22]. In brief, after giving informed consent, women were enrolled into the study, received an LLITN and were randomized to receive placebo or SP if their gestational age was > 12 and ≤ 28 weeks. Mid-upper arm circumference (MUAC), haematocrit and the rapid plasma reagin (RPR; Syphacard, Hawksley & Sons Ltd, Lancing, UK; Wellcome, USA) were assessed as part of routine antenatal care to assess malnutrition, anaemia and syphilis infection, respectively. Participants in the trial attending the VCT programme were invited to participate in the present study if they were HIV positive. The current study started after the trial had been initiated, and thus baseline CD4 and HIV RNA viral load data were only available for women enrolled during the second half of the trial. However, HIV RNA viral load data were available for all women at delivery. The study was approved by the National Mozambican Ethics Committee and the Hospital Clinic of Barcelona Ethics Review Committee.

Follow-up and sample collection

After informed consent had been obtained, a capillary blood sample was collected for HIV and CD4 determinations. At delivery, venous blood was collected from the mother for haematological and parasitological determinations. A placental biopsy was collected from the maternal side and placed in 10% neutral buffered formalin following standard procedures [23], and placental blood was collected from the women enrolled during the second half of the trial.

At 4–6 weeks and 12 months postpartum, infants were examined and a capillary sample was collected from the mother and the infant for haematological and viral determinations.

Laboratory methods

HIV viral and immunological tests

The HIV-1 status of the mother was determined at recruitment with the Determine HIV-1/2 Rapid Test (Abbott Laboratories, North Chicago, IL, USA). Positive results were confirmed according to national guidelines with the Unigold rapid test (Trinity Biotech, Bray, Ireland). Women with indeterminate results were invited to return 1 month later for testing. Infants were tested for HIV-1 using the Amplicor DNA-PCR kit (Roche) which detects integrated HIV DNA. HIV RNA viral load was determined from plasma cryopreserved at -80°C using the Amplicor HIV-1 Monitor assay version 1.5 (Roche, Branchburg, NJ, USA). The assay has a sensitivity of 400 HIV-1 RNA copies/mL. For the purpose of analyses, plasma HIV-1 RNA concentrations below the limit of detection were assigned the value of 200 copies/mL. CD4 cell counts were determined by flow cytometry after staining of whole blood with CD3, CD8 and CD4 fluorochrome-labelled antibodies and acquisition using TruCOUNT tubes (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA).

Haematological and parasitological assessments

The haematocrit was measured after centrifugation of capillary blood in a microhaematocrit centrifuge followed by reading in a Hawksley haematocrit reader (Hawksley & Sons Ltd).

Thick and thin blood films were stained and read according to standard, quality-controlled procedures [24,25]. Paraffin-embedded placental histological sections were stained with haematoxylin and eosin, Giemsa stain and the periodic acid–Schiff technique and examined for the presence of malaria parasites and malaria pigment as previously described [23,26].

Statistical methods and definitions

As 94% of women received the full treatment protocol (per protocol) [22], analysis was performed by intention to treat. Proportions for categorical variables were compared using χ^2 or Fisher exact tests. The Wilcoxon rank-sum test was used to compare medians of continuous variables with non-normal distribution and the Wilcoxon signed-rank test to compare paired groups. Univariate and multivariate logistic regressions were used to analyse the effect of

variables on MTCT. For the multivariate model, although PM infection was not significantly associated with MTCT in univariate analysis, it was included in the multivariate model in order to evaluate whether PM had an effect on MTCT after adjustment for other variables.

Data entry, validation and cleaning were performed using Microsoft FOXPRO version 5.0 for Windows (Microsoft Corp., Seattle, WA) and statistical analysis was performed using STATA version 9.0 (StataCorp., College Station, TX, USA).

Placental histology was classified as (1) not infected (no evidence of parasites/pigment) or (2) any PM infection (presence of parasites and/or pigment) following the criteria used by Ismail *et al.* [26]. Any PM infection thus included acute, chronic and past PM infection. Active PM included acute and chronic PM infection.

Maternal malaria infection was defined as asexual *P. falciparum* peripheral parasitaemia of any density. Anaemia in the pregnant women was defined as a haematocrit value $<33\%$. Maternal malnutrition was defined as MUAC ≤ 22 cm.

A high HIV RNA viral load was defined as a viral load ≥ 10000 copies/mL. Perinatal (*in utero* or at delivery) HIV infection was defined as the detection of HIV DNA by polymerase chain reaction (PCR) in the infant at 4–6 weeks of age [27].

Results

Study population

From August 2003 to April 2005, 1030 women were recruited into the trial [22]. Of these women, 84.5% (870 of 1030) accepted HIV testing and 23.8% (207 of 870) were found to be HIV positive and gave informed consent to participate in this study. The study profile is summarized in Fig. 1. Of the 207 HIV-infected women enrolled, 90 received placebo and 117 received SP, and all of them received an LLIN. The compliance was high, with 92% receiving the two doses, 7% one dose and 1% none. The characteristics of the women in the SP and placebo groups were comparable and are summarized in Table 1. Of the 207 enrolled patients, data for MTCT of HIV was available for 153 mother–infant pairs. The characteristics (age, gravidity and anaemia, among other variables) of these 153 women were similar to those of all 207 women and were comparable between the SP and placebo groups (data not shown).

Eighty-four per cent of the women reported taking their NVP tablet at the onset of labour and all infants received an NVP dose during the first 72 h of life. The majority of deliveries were vaginal, with only three women delivering by caesarean section. Baseline HIV RNA viral load and CD4 cell counts at enrolment were available for women enrolled

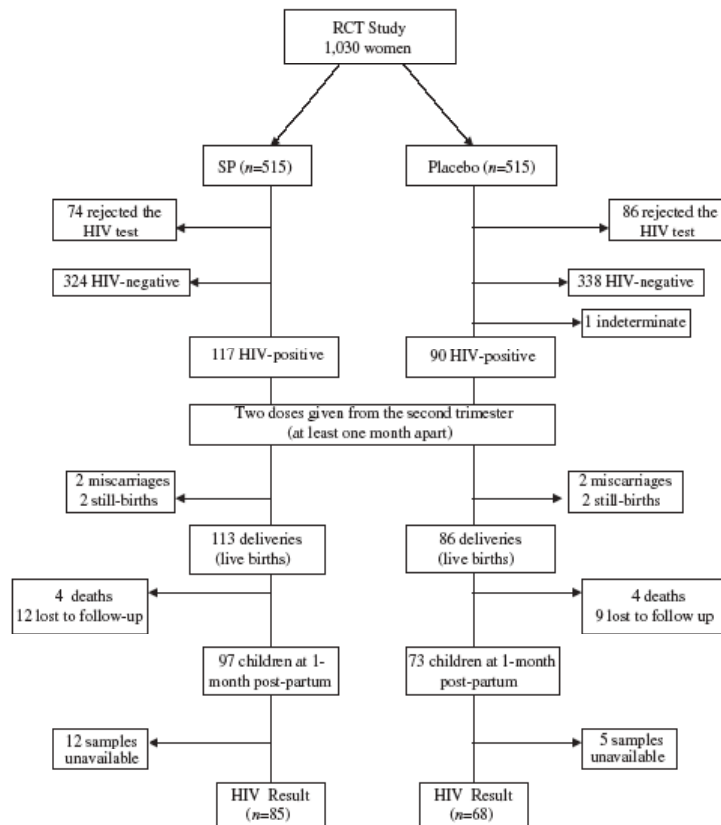
760 D Naniche *et al.*

Fig. 1 The trial profile. RCT, randomized controlled trial; SP, sulfadoxine-pyrimethamine.

during the second half of the trial (baseline HIV RNA viral load, $n = 93$; baseline CD4 cell count, $n = 95$). At enrolment, 92.6% (88 of 95) had CD4 counts above 200 cells/ μL and this proportion was similar in the two groups (placebo, 93.2% *vs.* SP, 92.2%). Although CD4 data were not available for all women, characteristics such as age and viral load at delivery were similar between those women with and without CD4 data, suggesting that lack of CD4 data did not introduce bias.

Impact of IPTp on MTCT of HIV

Sixty-eight infants (75%) in the placebo group and 85 (73%) in the SP group had an HIV DNA PCR result at 1 month. The median age at the time of the 1-month visit was 33 days [interquartile range (IQR) 31–46 days]. Assessment of MTCT in the 153 mother–infant pairs with an infant HIV result at 1 month showed that 11.8% of the mothers in the SP group and 13.2% in the placebo group

transmitted HIV to their infants perinatally ($P = 0.784$) (Table 2). Thus, IPTp with SP was not associated with a statistically significant impact on MTCT in the context of an NVP prevention of MTCT programme, even after stratification by maternal HIV RNA viral load at delivery (Table 2).

In order to determine whether malaria prevention with IPTp could reduce maternal HIV RNA viral load, the median viral load at delivery was compared between treatment groups. There was no significant difference between treatment groups at delivery, with a median HIV RNA viral load of 18 274 copies/mL (IQR 5471–74 104) in the placebo group and 16 312 copies/mL (IQR 4076–69 296) in the SP group ($P = 0.715$). Furthermore, no significant difference was observed in the median HIV RNA viral load at delivery between women with and without a peripheral malaria positive blood smear [18 115 (IQR 650–78 614) copies/mL, and 17 146 (IQR 5085–67 556) copies/mL, respectively; $P = 0.95$]. Placental HIV RNA viral load was

Table 1 Baseline characteristics of HIV-positive pregnant women at enrolment by treatment group

	SP (n = 117)	Placebo (n = 90)	P
Age (years) [median (IQR)]	23 (19–28)	24.5 (20–29)	0.18*
Gravidity [n (%)]			
Primigravid	32 (27.3)	21 (23.3)	0.711
1–3 pregnancies	49 (41.9)	37 (41.1)	
4 or more pregnancies	36 (30.8)	32 (35.6)	
Literacy [n (%)]	39 (33.3)	34 (37.8)	0.4
Malnutrition [n (%)]	4 (4.3)	2 (2.8)	0.595
	(n = 92)	(n = 72)	
RPR [n (%)]	18 (15.4)	13 (14.4)	0.85
HIV RNA viral load (copies/mL) [median (IQR)] [†]	15 071 (3404–52 967)	17 199 (4433–54 031)	0.7*
CD4 count (cells/μL) [median (IQR)] [‡]	511 (324–656)	471 (332–585)	0.469*
	(n = 51)	(n = 44)	

If characteristics were not obtained for all 207 women, n is given in parentheses. Malnutrition was defined as a mid-upper arm circumference ≤ 22 cm; literacy was defined as the ability to read and/or write.

*P-value from Wilcoxon rank sum test. Proportions were compared using the χ^2 test.

[†]Subset of women.

IQR, interquartile range; RPR, rapid plasma reagin screening for syphilis infection; SP, sulfadoxine-pyrimethamine.

Table 2 Effect of intermittent preventive treatment with sulfadoxine-pyrimethamine (SP) on mother-to-child transmission (n = 153)

	SP		Placebo		P*
	n/N	% (95% CI)	n/N	% (95% CI)	
Crude HIV RNA viral load at delivery [†]	10/85	11.8 (4.8–18.8)	9/68	13.2 (5–21.5)	0.784
Viral load < 10 000 copies/mL	0/37	0	1/29	3.45 (0–10.5)	
Viral load ≥ 10 000 copies/mL	10/47	21.3 (9.1–33.4)	6/34	17.6 (4.1–31.1)	0.686

*P-value from χ^2 test.

[†]Available for 147 women.

CI, confidence interval; n, number infected; N, number studied.

determined for the final 58 women enrolled in the study and showed similar levels in the two groups [placebo, 10 439 copies/mL (IQR 2423–46 695) vs. SP, 7436 copies/mL (IQR 1855–45 060); P = 0.642].

Risk factors associated with perinatal MTCT

As there was no significant difference in MTCT between treatment groups, an analysis of risk factors for MTCT of HIV was carried out on the two treatment groups combined, although there were only 19 infections overall. In the univariate analysis, high maternal HIV RNA viral load was significantly associated with an increased MTCT. Anaemia (haematocrit <33%) at delivery was also

Table 3 Univariate analysis by logistic regression of factors potentially contributing to mother-to-child transmission

	n/N	HIV-positive infants (%)	Odds ratio (95% CI)	P [‡]
Gravidity				
Primigravid	5/35	14.3		
1–3 pregnancies	8/61	13.1	0.9 (0.27–3)	0.872
4 or more pregnancies	6/57	10.5	0.7 (0.2–2.5)	0.59
Peripheral HIV RNA viral load at delivery				
Viral load < 10 000 copies/mL	1/66	1.5		
Viral load ≥ 10 000 copies/mL	16/81	19.75	16 (2.06–124)	0.008*
RPR				
No	15/130	11.5		
Yes	4/23	17.4	1.61 (0.48–5.38)	0.436
Malnutrition				
No	13/118	11		
Yes	2/5	40	5.38 (0.82–35.3)	0.079
Maternal anaemia at delivery				
No	4/75	5.3		
Yes	14/75	18.7	4 (1.27–13)	0.018*
Peripheral maternal malaria at delivery				
No	17/131	13		
Yes	1/18	5.6	0.39 (0.049–3.16)	0.38
PM by histology [†]				
No	11/67	16.4		
Yes	5/67	7.5	0.41 (0.13–1.25)	0.118
Low birth weight				
No	16/134	11.9		
Yes	3/19	15.8	1.38 (0.36–5.28)	0.635

Several variables had missing data. Thus, for those variables the total number of subjects used in the analysis does not always add up to 153. Malnutrition was defined as a mid-upper arm circumference ≤ 22 cm; low birth weight was defined as <2500 g.

^{*}Significant at P < 0.05.

[†]Univariate logistic regression.

[‡]Includes active and past PM. n, number infected; N, number studied; PM, placental malaria; RPR, rapid plasma screening for syphilis infection.

significantly associated with higher MTCT (Table 3). Women with anaemia at delivery had a fourfold higher risk of transmission than non-anaemic women [odds ratio (OR) 4.0; P = 0.018]. Malnourished women showed a fivefold increase in MTCT, although this did not reach statistical significance, probably because of small numbers. No significant associations were found between MTCT and gravidity, low birth weight or RPR positivity (Table 3).

Associations between parameters of malaria infection and MTCT were also evaluated. No significant association between maternal peripheral parasitaemia at delivery and MTCT was observed and there was only one case of clinical malaria in the group. Peripheral malaria parasitaemia was present in 11.6% of the HIV-positive women at delivery and was not significantly associated with anaemia (data not shown).

The MTCT risk was lower in women having had any PM than in women with no evidence of PM, although this trend did not reach statistical significance (Table 3).

762 D Naniche *et al.***Table 4** Multivariate analysis assessing relationships between mother-to-child transmission (MTCT) and peripheral HIV RNA viral load, anaemia and placental malaria ($N = 134$)

MTCT ($N = 134$)	Odds ratio	95% CI	P^{\dagger}
HIV RNA viral load (high vs. low)	19.9	2.3–172	0.006*
Anaemia	7.5	1.7–32.4	0.007*
Placental malaria [‡]	0.23	0.06–0.89	0.034*
IPTp treatment group	1.33	0.38–4.67	0.65

Data were adjusted for age, gravidity and treatment group. A high viral load was defined as $\geq 10\,000$ copies/mL; a low viral load as $< 10\,000$ copies/mL.

*Significant at $P < 0.05$.

[†] P -value from multivariate logistic regression.

[‡]Includes active and past placental malaria.

CI, confidence interval; IPTp, intermittent preventive treatment in pregnancy.

A multivariate model was constructed to assess risk factors for MTCT after adjusting for age, gravidity, and treatment group. These variables were chosen because of the potential association with placental malaria and HIV disease progression. Because of missing data, it was not possible to include malnutrition. Table 4 shows that maternal HIV RNA viral load and anaemia were each independent risk factors for MTCT, with adjusted odd ratios (AORs) of 19.9 [95% confidence interval (CI) 2.3–172] and 7.5 (95% CI 1.7–32.4), respectively. In contrast, after adjustment for other variables, having active or past PM was significantly associated with lower MTCT, although the confidence interval was large (AOR 0.23; 95% CI 0.06–0.89; $P = 0.034$). Although numbers were small, we found no evidence of potentially significant interactions among treatment, anaemia and PM (data not shown). As the categorization of placental malaria as positive or negative did not take into account the various stages of PM, for exploratory analysis, PM was separated into stages of infection (no infection, active infection or past infection). Although numbers were small, in the same multivariate model for MTCT, past PM was associated with an AOR of 0.23 ($P = 0.068$; 95% CI 0.05–1.11) and active PM with an AOR of 0.22 ($P = 0.128$; 95% CI 0.03–1.5).

Discussion

The findings of this study show that two-dose IPTp in women using LLITNs did not significantly impact the risk of MTCT of HIV-1 among HIV-seropositive women from a rural area of southern Mozambique. Analysis of the association of other factors with MTCT of HIV-1 suggested that maternal anaemia at delivery increased MTCT seven-fold and having active or past PM infection was associated with a lower risk of MTCT, although we were limited by the small sample size.

It has been speculated that malaria infection and more specifically PM may affect MTCT of HIV, particularly in

view of their effects on peripheral or placental HIV-1 RNA viral load [13–15]. In the HIV-positive women of our study, two doses of SP in the context of LLITNs reduced both maternal peripheral parasitaemia and active PM almost threefold [22]. However, this decrease did not appear to translate into an effect of IPTp on MTCT. These results are not likely to be explained by a lack of SP efficacy in preventing malaria. Firstly, recent data on the *in vivo* efficacy of SP in children in this area have shown a therapeutic efficacy rate of 83%, with a parasitological sensitivity of 78.6% at day 14 [28]. Secondly, SP was highly efficacious for malaria prevention in the study women and in a concurrent study of IPT in infants in the same area, where the efficacy of SP for malaria prevention varied between 60 and 90% in the month after SP administration [29].

To date, five studies have evaluated the effect of PM on MTCT with significant heterogeneity in the results, ranging from increased risk to a protective effect [6–8,17,18]. Apparent discrepancies between studies may be explained in part by different placental microenvironments induced by different types of PM as well as by the different techniques employed (blood film microscopy or histopathology) and the different definitions used to classify PM. Placental infection is a continuum, starting with the presence of parasitized red blood cells and ending with the deposition of free malarial pigment [30]. Blood film microscopy detects active infection with lower sensitivity than histology and does not detect past PM infections (presence of pigment). Histopathology can differentiate among acute, chronic and past placental infections but definitions vary, thus complicating the comparison of different studies. Our results, although obtained in a small sample, are consistent with those described in Kenya, suggesting less MTCT in women with PM after adjustment for treatment group and HIV RNA viral load [7,17].

At face value, there is a contradiction in the lack of a treatment effect of IPTp on MTCT, the finding that PM may be protective for MTCT in multivariate analysis, and results showing that SP decreased PM [22]. According to these results, one would expect an increase of MTCT in the SP group. A potential confounding factor could be that NVP was self-administered, and, although most women reported taking NVP and all children received it, there could have been considerable heterogeneity in the proper administration of NVP, which is protective against MTCT.

Assessment of other risk factors associated with MTCT confirmed high maternal HIV RNA viral load, as reported by others, to be an independent risk factor for perinatal MTCT [6–8]. Anaemia was also found to be associated with perinatal MTCT after adjusting for treatment group and HIV RNA viral load. In sub-Saharan Africa, the prevalence of

maternal anaemia is higher than in developed countries [31] and is commonly caused by micronutrient deficiencies, sickle-cell disease, malaria, hookworm and other infections including HIV [32,33]. Mechanisms by which anaemia may increase MTCT could include non-specific immune deficiency associated with iron deficiency [34,35], and higher shedding of HIV in blood, breast milk or lower genital tract secretions, as has been described for low serum retinol [9,10,36] and selenium levels [37]. Anaemia may be, but is not always, associated with malnutrition and immune deficiency. Malnutrition in general is a recognized risk factor for increased MTCT; however, not all anaemia is caused by malnutrition and HIV in itself causes anaemia by bone marrow suppression [38]. Because of missing data for CD4 and malnutrition, we were unable to adjust for these variables in the multivariate analysis. However, few women had low CD4 cell counts or malnutrition at delivery, suggesting that these factors were not solely responsible for the observed anaemia. As the aetiology of anaemia is multifactorial, one or several factors responsible for anaemia may increase MTCT. Further studies are necessary to assess individual vitamin or mineral deficiencies in MTCT, particularly as there are conflicting results as to the benefit of vitamin or mineral supplements during pregnancy in terms of MTCT [39,40].

In conclusion, although our study is small, the results regarding the complex relationship among intermittent preventive treatment for malaria in pregnancy, PM, anaemia and MTCT of HIV raise important questions, and highlight the fact that the role of PM in MTCT of HIV remains unclear. The potentially heterogeneous effects of parasites, inflammation and malarial pigment as well as local cytokine and chemokine microenvironments on MTCT of HIV need to be clarified. Finally, maternal anaemia may be an important risk factor for MTCT of HIV. The different aetiologies of anaemia and their impact on MTCT also need to be explored in order to allow the design of appropriate interventions aimed at reducing anaemia and MTCT of HIV.

Acknowledgements

The authors are grateful to all the women enrolled in the study and for the continued dedication of VCT, field, clinic and data management staff at the Centro de Investigaçao em Saude de Manhiça, Mozambique. The authors are particularly grateful to Lazaro Mussacate Quimice for his contribution to the DNA PCR assays.

Financial support was received from the Spanish Ministry of Education and Science (grant SAF-05845), Banco de Bilbao, Vizcaya Argentaria foundation (grant BBVA 02-0) and Spanish Fondo de Investigación Sanitaria (grant FIS01/1236). The Centro de Investigaçao em

Saude de Manhiça receives core funding from the Spanish Agency for International Cooperation and the VCT centre is supported by Generalitat de Catalunya. M.L. was supported by a grant from the IDIBAPS. D.N. was supported by a grant from the Spanish Ministry of Education and Science (Ramon y Cajal). C.R. was supported by a grant from the Fondo de Investigaciones Sanitarias del Instituto de Salud Carlos III through a career development fellowship (number CM03/00125).

The authors have no conflict of interest.

References

- UNAIDS/WHO. AIDS Epidemic Update: December 2007. Geneva, Joint United Nations Program on HIV/AIDS and WHO.
- ter Kuile FO, Parise ME, Verhoeff FH *et al.* The burden of co-infection with human immunodeficiency virus type 1 and malaria in pregnant women in sub-Saharan Africa. *Am J Trop Med Hyg* 2004; **71**: 41–54.
- Ned RM, Moore JM, Chaisavaneeyakorn S, Udhayakumar V. Modulation of immune responses during HIV-malaria co-infection in pregnancy. *Trends Parasitol* 2005; **21**: 284–291.
- Kourtis AP, Lee FK, Abrams EJ, Jamieson DJ, Bulterys M. Mother-to-child transmission of HIV-1: timing and implications for prevention. *Lancet Infect Dis* 2006; **6**: 726–732.
- De Cock KM, Fowler MG, Mercier E *et al.* Prevention of mother-to-child HIV transmission in resource-poor countries: translating research into policy and practice. *JAMA* 2000; **283**: 1175–1182.
- Brahmbhatt H, Kigozi G, Wabwire-Mangen F *et al.* The effects of placental malaria on mother-to-child HIV transmission in Rakai, Uganda. *AIDS* 2003; **17**: 2539–2541.
- Ayisi JG, van Eijk AM, Newman RD *et al.* Maternal malaria and perinatal HIV transmission, Western Kenya. *Emerg Infect Dis* 2004; **10**: 643–652.
- Mwapasa V, Rogerson SJ, Kwiek JJ *et al.* Maternal syphilis infection is associated with increased risk of mother-to-child transmission of HIV in Malawi. *AIDS* 2006; **20**: 1869–1877.
- Semba RD, Miotti PG, Chipangwi JD *et al.* Maternal vitamin A deficiency and mother-to-child transmission of HIV-1. *Lancet* 1994; **343**: 1593–1597.
- Fawzi W, Msamanga G, Spiegelman D, Hunter DJ. Studies of vitamins and minerals and HIV transmission and disease progression. *J Nutr* 2005; **135**: 938–944.
- Ayoub A, Nerricnet E, Mengu E *et al.* Mother-to-child transmission of human immunodeficiency virus type 1 in relation to the season in Yaounde, Cameroon. *Am J Trop Med Hyg* 2003; **69**: 447–449.
- Gallagher M, Malhotra I, Mungai PL *et al.* The effects of maternal helminth and malaria infections on mother-to-child HIV transmission. *AIDS* 2005; **19**: 1849–1855.

764 D Naniche *et al.*

- 13 Kublin JG, Patnaik P, Jere CS *et al.* Effect of *Plasmodium falciparum* malaria on concentration of HIV-1-RNA in the blood of adults in rural Malawi: a prospective cohort study. *Lancet* 2005; **365**: 233–240.
- 14 Hoffman IF, Jere CS, Taylor TE *et al.* The effect of *Plasmodium falciparum* malaria on HIV-1 RNA blood plasma concentration. *AIDS* 1999; **13**: 487–494.
- 15 Kapiga SH, Bang H, Spiegelman D *et al.* Correlates of plasma HIV-1 RNA viral load among HIV-1-seropositive women in Dar es Salaam, Tanzania. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2002; **30**: 316–323.
- 16 Mwapasa V, Rogerson SJ, Molyneux ME *et al.* The effect of *Plasmodium falciparum* malaria on peripheral and placental HIV-1 RNA concentrations in pregnant Malawian women. *AIDS* 2004; **18**: 1051–1059.
- 17 Inion I, Mwanyumba F, Gaillard P *et al.* Placental malaria and perinatal transmission of human immunodeficiency virus type 1. *J Infect Dis* 2003; **188**: 1675–1678.
- 18 Brahmabhatt H, Sullivan D, Kigozi G *et al.* Association of HIV and malaria with mother-to-child transmission, birth outcomes, and child mortality. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2008; **47**: 472–476.
- 19 WHO/AFRO. *Recommendations on the use of sulfadoxine-pyrimethamine (SP) for intermittent preventive treatment during pregnancy (IPT) in areas of moderate to high resistance to SP in the African region.* http://www.afro.who.int/malaria/publications/malaria_in_pregnancy_sulfadoxine.pdf 2005.
- 20 WHO. *Antiretroviral drugs for treating pregnant women and preventing HIV infection in infants in resource-limited settings: towards universal access: recommendations for a public health approach.* Geneva, World Health Organization, 2006. Accessed 27 May 2008: www.who.int/hiv/pub/guidelines/pmtctguides3.pdf
- 21 INDEPTH-Network. *Population and Health in Developing Countries.* Ottawa, Canada, International Development Research Centre, 2006: 189–195.
- 22 Menendez C, Bardaji A, Sigauque B *et al.* Combination of interventions for malaria prevention in pregnancy. *PLoS One* 2008; **3**: e1934.
- 23 Ordi J, Ismail MR, Ventura PJ *et al.* Massive chronic intervillitis of the placenta associated with malaria infection. *Am J Surg Pathol* 1998; **22**: 1006–1011.
- 24 Alonso PL, Sacarlal J, Aponte JJ *et al.* Efficacy of the RTS,S/AS02A vaccine against *Plasmodium falciparum* infection and disease in young African children: randomised controlled trial. *Lancet* 2004; **364**: 1411–1420.
- 25 Alonso PL, Smith T, Schellenberg JR *et al.* Randomised trial of efficacy of SPf66 vaccine against *Plasmodium falciparum* malaria in children in southern Tanzania. *Lancet* 1994; **344**: 1175–1181.
- 26 Ismail MR, Ordi J, Menendez C *et al.* Placental pathology in malaria: a histological, immunohistochemical, and quantitative study. *Hum Pathol* 2000; **31**: 85–93.
- 27 Read JS and Committee on Pediatric AIDS. Diagnosis of HIV-1 infection in children younger than 18 months in the United States. *Pediatrics* 2007; **120**: e1547–e1562.
- 28 Abacassamo F, Enosse S, Aponte JJ *et al.* Efficacy of chloroquine, amodiaquine, sulphadoxine-pyrimethamine and combination therapy with artesunate in Mozambican children with non-complicated malaria. *Trop Med Int Health* 2004; **9**: 200–208.
- 29 Macete E, Aide P, Aponte JJ *et al.* Intermittent preventive treatment for malaria control administered at the time of routine vaccinations in Mozambican infants: a randomized, placebo-controlled trial. *J Infect Dis* 2006; **194**: 276–285.
- 30 Bulmer JN, Rasheed FN, Francis N, Morrison L, Greenwood BM. Placental malaria. I. Pathological classification. *Histopathology* 1993; **22**: 211–218.
- 31 Semba RD, Gray GE. Pathogenesis of anemia during human immunodeficiency virus infection. *J Invest Med* 2001; **49**: 225–239.
- 32 van den Broek NR, Letsky EA. Etiology of anemia in pregnancy in south Malawi. *Am J Clin Nutr* 2000; **72**: 247S–256S.
- 33 Crawley J. Reducing the burden of anemia in infants and young children in malaria-endemic countries of Africa: from evidence to action. *Am J Trop Med Hyg* 2004; **71**: 25–34.
- 34 Griffiths E. Iron in biological systems, In: Bullen JJ, Griffiths E. eds. *Iron and Infection.* Chichester, John Wiley & Sons, 1987: 1–25.
- 35 Weinberg E. Iron and susceptibility to infectious disease. *Science* 1974; **184**: 952–956.
- 36 John GC, Nduati RW, Mbori-Ngacha D *et al.* Genital shedding of human immunodeficiency virus type 1 DNA during pregnancy: association with immunosuppression, abnormal cervical or vaginal discharge, and severe vitamin A deficiency. *J Infect Dis* 1997; **175**: 57–62.
- 37 Baeten JM, Mostad SB, Hughes MP *et al.* Selenium deficiency is associated with shedding of HIV-1-infected cells in the female genital tract. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2001; **26**: 360–364.
- 38 Cluster S. Biology of anemia, differential diagnosis, and treatment options in human immunodeficiency virus infection. *J Infect Dis* 2002; **185** (Suppl. 2): S105–S109.
- 39 Mills EJ, Wu P, Seely D, Guyatt GH. Vitamin supplementation for prevention of mother-to-child transmission of HIV and pre-term delivery: a systematic review of randomized trial including more than 2800 women. *AIDS Res Ther* 2005; **2**: 4.
- 40 Wiysonge CS, Shey MS, Sterne J, Brocklehurst P, Read JS, Dhansay MA. Vitamin A supplementation for reducing the risk of mother-to-child transmission of HIV infection: Cochrane systematic review. *Int J Epidemiol* 2006; **35**: 832–833.

RESULTADOS ADICIONALES

Evaluación del impacto de la infección materna por *P. falciparum* en los niveles de citoquinas plasmáticas en el momento del parto en las mujeres embarazadas VIH-positivas

INTRODUCCIÓN

Se sabe que la infección por *P. falciparum* influye en la expresión de marcadores de activación del sistema inmunitario incluyendo receptores celulares y ciertas citoquinas y quimioquinas [125, 130]. Un estudio llevado a cabo por Jason et al. [135] observó que los niveles de IL-10 en suero eran significativamente mayores en pacientes con infección por malaria comparado con pacientes sin malaria, tanto en adultos como en niños e independientemente de su status de VIH-1. Además, varios estudios han observado que las mujeres VIH-negativas con malaria placentaria tienen niveles significativamente mayores de IFN- γ , TNF- α y IL-10 en el plasma sanguíneo del espacio intervilloso de la placenta en el momento del parto comparado con mujeres sin malaria placentaria [129, 130].

Sin embargo, pocos estudios han analizado conjuntamente el efecto de la infección por *P. falciparum* en la secreción de citoquinas en mujeres embarazadas coinfectadas con VIH-1, lo que permitiría mejorar el conocimiento sobre el efecto de la malaria placentaria en la MTCT del VIH-1. De hecho, se ha sugerido que la asociación entre la malaria placentaria y la MTCT del VIH-1 puede depender de una relación compleja de las respuestas inmunes de la madre frente a la malaria, que por un lado podría estimular la replicación viral del VIH-1 en la placenta y aumentar la carga viral plasmática del VIH-1 o por otro lado, podría activar el control de la infección y la replicación del VIH-1 [15, 18]. También es posible que la secreción de citoquinas influya en la interfase materno-fetal y en la permeabilidad de la placenta facilitando el paso del VIH-1 de madre a hijo a través de los barrera trofoblástica [136]. Estudios *in vitro* han demostrado que citoquinas proinflamatorias como el TNF- α , IL-6 y el IL-1b activan la

replicación del VIH-1 [118, 126], mientras que el IFN- γ y las β -quimiocinas (MIP-1a, MIP-1b, RANTES, etc.) la inhiben [127, 128].

Existen indicios de que las concentraciones locales tisulares de citoquinas y quimioquinas inducidas por *P. falciparum* pueden variar y crear microambientes, sobre todo en la placenta, que afectan a la replicación del VIH-1 de maneras distintas [137]. Por este motivo, el objetivo de este ensayo era evaluar el impacto de la infección materna por *P. falciparum* en los niveles de citoquinas plasmáticas tanto periféricas y placentarias en mujeres VIH-positivas en el momento del parto.

MÉTODOS

Muestras

Este ensayo se llevó a cabo con muestras del estudio descrito en el artículo 2, cuyo objetivo era evaluar el impacto del tratamiento intermitente preventivo durante el embarazo (IPTp) en la MTCT del VIH-1 en el marco del programa de prevención de la MTCT del VIH con sdNVP en una región rural del sur de Mozambique. Del total de 207 mujeres VIH-positivas del estudio, en el momento del parto se recogieron 190 muestras de sangre periférica y 57 de sangre placentaria. La sangre placentaria fue recogida sólo para las últimas mujeres reclutadas dado que se trataba de un estudio secundario que comenzó a mitad del estudio principal. El suero de estas muestras se guardó a -80°C hasta su envío al Hospital Clínic de Barcelona, donde se llevaron a cabo los ensayos.

Mediciones de citoquinas y quimioquinas

Los niveles de citoquinas plasmáticas fueron medidos mediante la tecnología xMAP (Luminex) con un Bio-plex 200 System (Bio-Rad Laboratories, CA, EEUU). Se seleccionaron las citoquinas de interés y se diseñó un kit 10-plex de Bio-Rad que contenía las siguientes citoquinas: IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IFN- γ , TNF- α , MCP-1, MIP-1 β y RANTES. El procedimiento se llevó a cabo a partir de 12 μ L de suero siguiendo las instrucciones del fabricante. El ensayo incluye una curva de calibración de 8 puntos que determina los límites de

detección para cada citoquina. Se excluyeron del análisis las muestras cuyos valores estaban fuera de los límites de detección o que no estaban dentro del rango de recuperación de 70-130% determinado como aceptable por el fabricante.

Determinación de la infección por *P. falciparum*

La infección por malaria periférica se determinó usando microscopía en lámina por gota gruesa y frotis, mientras que la malaria placentaria se evaluó por histología de placenta tal y como se describe en el artículo 2 de la presente tesis. Se definió como malaria periférica la presencia de formas asexuales de *P. falciparum* a cualquier densidad, mientras que la malaria placentaria se definió como la presencia de parásitos *P.falciparum* o de pigmento malárico.

Análisis estadístico

Los resultados obtenidos con el software Bio-plex fueron exportados y analizados con STATA versión 9 (StataCorp., College Station, TX, USA). Se utilizó el test de la suma de rangos de Wilcoxon para comparar las medianas de las concentraciones de citoquinas entre los grupos con distribuciones no normales.

RESULTADOS

El porcentaje de recuperación fue bastante bueno para todas las citoquinas excepto para IFN- γ , donde sólo un 78% (148/190) de las muestras de sangre periférica estaban dentro del rango de recuperación de 70-130%. Se excluyeron IL-2 y RANTES del análisis ya que las concentraciones observadas estaban, respectivamente, por debajo y por encima del límite de detección del ensayo en todas las muestras analizadas.

Los niveles de citoquinas plasmáticas en muestras de sangre periférica en el momento del parto están recogidos en la Tabla 1, separados según si presentaban malaria periférica o no en el momento del parto.

TABLA 1- Niveles de citoquinas periféricas (pg/mL) en el momento del parto en mujeres VIH-positivas según su status de infección periférica por *P. falciparum*

Niveles de citoquinas periféricas (pg/ml)	Malaria periférica (-)			Malaria periférica (+)			p-value*
	n	Mediana	IQR	n	Mediana	IQR	
IL-4	168	3,9	1.3-8.9	21	3,23	1.6-7.1	0,785
IL-6	168	26,58	16.5-48.3	21	34,56	24-46.2	0,342
IL-8	168	10,63	6.6-19.3	21	11,55	6-20	0,895
IL-10	166	3,94	0-7.6	20	19,05	7.6-61.6	<0,0001
IFN- γ	132	206,77	115.1-295.2	16	194,1	106.4-255.7	0,47
TNF- α	169	56,66	37.4-69.1	21	55,85	30.1-78.5	0,62
MCP-1	167	33	16.5-66	21	27,16	17.2-69.3	0,929
MIP-1 β	167	57,58	35-81.2	21	123,5	47.2-182.4	0,0007

* Test de la suma de rangos de Wilcoxon

TABLA 2- Niveles de citoquinas placentarias (pg/mL) en el momento del parto en mujeres VIH-positivas según su status de infección placentaria por *P. falciparum*

Niveles de citoquinas placentarias (pg/ml)	Malaria placentaria (-)			Malaria placentaria (+)			p-value*
	n	Mediana	IQR	n	Mediana	IQR	
IL-4	25	0.97	0.5-5.5	30	0.75	0.4-5.6	0.82
IL-6	24	279.1	103-675	31	243	102.5-534	0.97
IL-8	24	120	43-453	32	81.7	31-179	0.3
IL-10	25	4.8	2.2-8.7	31	5.9	2.2-16.7	0.38
IFN- γ	23	144.4	78.9-629	30	146.5	67.9-638.9	0.75
TNF- α	24	44.7	31.7-79.2	28	35.1	29-60.1	0.27
MCP-1	23	156.3	48.8-291	30	130.9	60.7-256.7	0.8
MIP-1 β	25	212.6	140.7-448.2	32	185.2	<2.32-373.7	0.23

* Test de la suma de rangos de Wilcoxon

La mediana de las concentraciones de IL-10 y MIP-1 β resultó ser significativamente mayor en las mujeres con malaria periférica comparado con las mujeres sin malaria periférica. No se observó ninguna diferencia significativa entre los dos grupos para el resto de las citoquinas analizadas. En la Tabla 2 se han recogido los niveles de citoquinas plasmáticas en muestras de sangre placentaria en el momento del parto según su status de malaria placentaria. No se observó ninguna diferencia significativa entre las mujeres con y sin malaria placentaria para ninguna de las citoquinas analizadas.

CONCLUSIONES

En este ensayo observamos que las mujeres VIH-positivas con malaria periférica tenían niveles significativamente mayores de IL-10 y MIP-1 β que las mujeres sin malaria periférica. Este resultado está en consonancia con el estudio realizado por Jason et al. [135] que detectó que los niveles de IL-10 en suero eran significativamente mayores en pacientes con malaria que en pacientes sin malaria. Se ha propuesto que IL-10, al ser una citoquina inmunoreguladora implicada en el cambio de respuesta a T_{H2}, podría mitigar parte de los efectos perjudiciales que niveles elevados de citoquinas proinflamatorias tendrían en el feto (actividad embriotóxica o daño de los trofoblastos placentarios entre otros) lo que explica las concentraciones altas de IL-10 observadas en mujeres embarazadas [138]. Además, la respuesta de IL-10 puede ser particularmente crítica en la infección por malaria. Un modelo en ratones observó que los ratones con un gen IL-10 defectuoso tenían niveles mayores de IFN- γ y mayor mortalidad frente a la malaria, sugiriendo que IL-10 era crucial para la supervivencia [139].

La producción de IL-10 puede estar también relacionada con la MTCT del VIH-1. Un estudio reciente observó que las mujeres embarazadas que controlan mejor la replicación del VIH-1 tienden a producir mayores concentraciones de IL-10, lo que resulta en un menor riesgo de transmisión vertical del VIH-1 [140]. Según este dato, aunque el tamaño de muestra tan pequeño impidió analizar la relación de IL-10 con la MTCT del VIH, se podría formular la hipótesis de que un aumento de la concentración de IL-10 en mujeres embarazadas con

infección periférica por *P. falciparum* como el que observamos ayudaría a controlar la replicación del VIH-1.

Sin embargo, no observamos ninguna diferencia entre los niveles de citoquinas placentarias según su status de malaria placentaria, al contrario del incremento en IFN- γ , TNF- α , IL-10 y MIP-1 β en mujeres con malaria placentaria que habían observado estudios previos [129, 130, 141]. Parte de la explicación puede ser debida a que nuestro estudio incluía sólo mujeres VIH-positivas, mientras que los otros estudios incluían solamente mujeres VIH-negativas, además de la posibilidad de que hubiera un sesgo de selección de las muestras dado que sólo se disponía de sangre placentaria de 57 de las 207 mujeres.

Este ensayo presenta varias limitaciones. Primero, se midieron los niveles de citoquinas periféricas solamente en el momento del parto, lo que nos impidió entender cuál es la cadena de acontecimientos. Además, no nos fue posible recoger sangre placentaria para todas las mujeres dado que se trataba de un estudio secundario y la recogida de sangre de placentas comenzó a mitad del estudio principal, lo que limitó el tamaño de muestra. Por otra parte, es posible que la sangre placentaria no refleje los microambientes que se crean en la placenta por lo que para comparar los niveles de citoquinas entre mujeres con y sin malaria placentaria sería más útil el análisis por inmunohistoquímica de tejido placentario, dado que además permitiría detectar qué células están implicadas en la producción de citoquinas asociadas a la infección por malaria [142]. Futuros estudios deberían orientarse a clarificar los efectos que producen los parásitos, el pigmento malárico, la inflamación y los diferentes microambientes de citoquinas y quimioquinas de la placenta en la MTCT del VIH-1.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

La presente tesis doctoral recoge varios estudios realizados sobre la epidemiología del VIH/SIDA en mujeres embarazadas en Manhiça, Mozambique entre 2003 y 2005, en un momento de gran expansión de la epidemia del VIH/SIDA y cuando todavía el TARGA no estaba disponible en la zona.

El primer objetivo de esta tesis doctoral era caracterizar la epidemia del VIH-1 a nivel molecular y comparar secuencias de VIH-1 de mujeres embarazadas en 1999 y 2004 para analizar la evolución genética de la epidemia durante estos años en Manhiça, Mozambique. Dado que cada subtipo de VIH-1 presenta unas características diferentes en cuanto a transmisión, progresión de la enfermedad o creación de mutaciones de resistencias frente a los antiretrovirales [4, 5], la identificación, caracterización y análisis de los subtipos de VIH-1 predominantes resulta crucial para poder entender el comportamiento de la epidemia de VIH-1 en esta región de cara al desarrollo de futuras vacunas frente al VIH-1. Por otra parte, las altas tasas de replicación y mutación del VIH-1 hacen que el virus tenga una gran diversidad genética, por lo que el análisis de las distancias genéticas de secuencias de VIH-1 de 1999 y 2004 en la misma población nos permite conocer la divergencia genética y entender mejor cómo evolucionó la epidemia de VIH-1 en el sur de Mozambique en los años de máxima expansión.

Este estudio fue uno de los primeros en confirmar que la epidemia en el sur de Mozambique es homogénea en cuanto al subtipo, siendo casi exclusivamente del subtipo C. Sin embargo, el análisis filogenético mostró que las secuencias analizadas presentaban una gran variación genética con la existencia de diferentes sublinajes circulantes del subtipo C. Con respecto a la evolución entre 1999 y 2004, observamos que las secuencias del 2004 tenían de media mayores distancias genéticas, indicando mayor diversidad genética. A pesar de no encontrar diferencias en cuanto a la presión selectiva (proporción de mutaciones sinónimas y no sinónimas (dn/ds)) entre cepas de 1999 y de 2004, se observó un mayor número de

sustituciones de nucleótido de ambas categorías, tanto sinónimas (sin cambio de aminoácido) como no sinónimas (cambio de aminoácido) en las secuencias del 2004 comparadas con las del 1999. Esto puede ser debido tanto a la diversificación de los virus introducidos antes de 1999 como a la introducción de nuevos virus en Mozambique entre 1999 y 2004.

De hecho, la epidemia de VIH-1 en la mayoría de los países vecinos de Mozambique es casi exclusivamente del subtipo C excepto en Tanzania, donde circulan también los subtipos A y D y virus recombinantes intersubtipo [55, 56]. Una de las vías de entradas de la epidemia del VIH-1 en Mozambique es a través de la frontera con Sudáfrica, debido al corredor comercial y al gran número de mozambiqueños que migran por trabajo a las minas de Sudáfrica [143]. Otra de las posibles entradas del VIH-1 es a través de Malawi y Zimbabwe. Tras la firma de los Acuerdos de Paz en 1992, aproximadamente 1,7 millones de refugiados volvieron a Mozambique entre 1992 y 1995 desde Malawi y Zimbabwe, donde la expansión de la epidemia del VIH-1 estaba más avanzada [144]. De hecho, se ha descrito que la epidemia en la zona central de Mozambique es más antigua que en el resto del país [145], ya que la mayoría de los refugiados que venían de Malawi y Zimbabwe se asentaron en la zona central una vez terminada la guerra. Además, un estudio realizado en Beira, en la zona central de Mozambique, observó que la epidemia en esta zona es también homogénea y del subtipo C [58]. Sin embargo, no hay en la actualidad ningún estudio de epidemiología molecular que describa la epidemia del VIH-1 en el norte de Mozambique, aunque se sabe que la prevalencia del VIH-1 es considerablemente menor en esta zona [146]. Aunque no están claras las razones de esta menor prevalencia del VIH-1, se piensa que puede ser en parte debido a las altas tasas de circuncisión masculina en esa región del país [1].

Por otra parte, los indicios de que diferentes subtipos parecen tener distinto tipo de transmisión y progresión de la enfermedad ha llevado a sugerir que cada subtipo de VIH-1 podría tener distinto riesgo de MTCT del VIH-1 [147-149]. Varios estudios realizados en Kenya y Tanzania observaron diferencias significativas de MTCT entre los distintos subtipos, tanto en el riesgo de MTCT del VIH-1 como en el momento de la transmisión (parto, lactancia) [148-

150], resaltando que la proporción de MTCT del VIH-1 parecía ser mayor en mujeres con subtipo C y que este aumento era independiente de la carga viral plasmática del VIH-1 [149]. Sin embargo, otro estudio realizado en Tanzania, no observó ninguna diferencia significativa en las tasas de MTCT del VIH-1 entre los subtipos A, C, D y las formas recombinantes detectadas [151]. Resultados recientes sugieren que los subtipos recombinantes pueden tener mayor facilidad de transmitir el VIH-1 por lactancia materna que los subtipos no recombinantes [152]. Dado que todos los subtipos detectados en este estudio fueron del subtipo C, no nos fue posible comparar el riesgo de MTCT del VIH-1 entre subtipos. Con todo, el presente estudio sobre la epidemiología molecular y la dinámica del VIH-1 en el sur de Mozambique aporta información relevante para optimizar los protocolos actuales de TARGA, a la vez que ofrece información crucial para el futuro desarrollo de vacunas frente al VIH-1 del subtipo C.

El segundo objetivo principal de esta tesis era analizar el impacto del tratamiento intermitente preventivo antimalárico (IPT) en la transmisión vertical del VIH-1 dentro del marco del programa de prevención de la MTCT del VIH-1 con sdNVP. Nuestra hipótesis inicial sugería que, si la infección por malaria puede aumentar la carga viral plasmática del VIH-1 tal y como se ha sugerido en varios artículos [20, 115], este incremento en la carga viral podría producir a su vez un aumento del riesgo de transmisión por VIH-1 de madre a hijo. Según esta hipótesis, el grupo de mujeres que tomaron sulfadoxina-pirimetamina (SP) como IPTp, al tener menor prevalencia de infección por malaria que el grupo placebo tendrían menor carga viral plasmática del VIH-1 y menor transmisión vertical del VIH-1 que el grupo placebo. No obstante, no observamos ninguna diferencia significativa entre el grupo SP y el placebo con respecto a la carga viral plasmática del VIH-1 y al riesgo de transmisión de VIH-1.

En el estudio principal que incluía mujeres VIH-negativas y VIH-positivas, el IPT con SP consiguió reducir significativamente la prevalencia de malaria periférica y malaria placentaria activa en mujeres embarazadas [59]. Sin embargo, no se observó una diferencia significativa entre la tasa de transmisión de VIH-1 del grupo SP y la del grupo placebo, lo que nos lleva a pensar que en este estudio la malaria placentaria no tiene un impacto significativo en la MTCT

del VIH-1. De hecho, tampoco observamos una diferencia significativa en la carga viral de VIH-1 periférica en el parto entre las mujeres infectadas por malaria comparadas con las mujeres no infectadas, al contrario de lo que se ha descrito en otros estudios [20, 115]. El no observar diferencias en la carga viral entre las mujeres infectadas por malaria y las no infectadas puede ser debido a que las mujeres en este estudio tenían una inmunidad bien conservada, ya que la mediana del recuento de CD4 en el reclutamiento en un subgrupo de 95 mujeres de nuestro estudio era de 492 células/ μ L [IQR 329-634] y sólo 7/95 (7,4%) tenían CD4 <200 copias/mL. Las características basales de estas mujeres con recuento de CD4 eran similares al resto, lo que nos lleva a pensar que este resultado de CD4 es representativo del total.

Nuestra hipótesis inicial era que la malaria placentaria puede aumentar la MTCT al sobre regular la carga viral plasmática de VIH-1 materna [20, 122], aunque se ha descrito que el aumento de la carga viral plasmática de VIH-1 periférica debido a la infección por malaria es menos pronunciado en mujeres embarazadas (2 veces mayor) que en no embarazadas y varones adultos (7 veces mayor) [18]. Por este motivo, es posible que existan mecanismos independientes al aumento de la carga viral plasmática del VIH-1 a través de los cuales la PM puede aumentar el riesgo de MTCT, como pone de manifiesto un estudio reciente de Brahmhatt et al. en Uganda [123]. Utilizando una tinción histológica muy sensible (HRP-II) para detectar malaria placentaria observaron que incluso tras ajustar por la carga viral plasmática del VIH-1 en el análisis multivariado, el riesgo de MTCT asociado a la PM seguía siendo significativamente alto (AOR=7,9; 95%CI [1,4-58,5]), aunque el tamaño de muestra no era muy grande (N=109) y el intervalo de confianza era muy amplio.

Los otros cuatro estudios que han analizado el impacto de la malaria placentaria y la MTCT del VIH-1 presentan resultados contradictorios [15, 19, 122, 123]. Estos estudios apuntan a conclusiones tan diferentes como que la PM aumenta, no afecta o puede llegar a proteger frente a la MTCT del VIH-1 (Ver Introducción), lo que hace aparente la compleja interacción que existe entre la PM y la infección por VIH-1.

Una de las posibles razones que se han propuesto para explicar las diferencias de estos cuatro estudios es el distinto método de diagnóstico utilizado para detectar la malaria placentaria, ya que un estudio utilizó microscopía de sangre placentaria en lámina [15] mientras que los otros emplearon histología de placenta [19, 122, 123]. De hecho, una revisión reciente observó que la prevalencia de malaria placentaria en distintas zonas del África subsahariana difería considerablemente según el criterio y método de diagnóstico empleado [153]. La PCR es la técnica más sensible ya que permite detectar infecciones submicroscópicas de malaria, pero además de su alto coste y la mayor cualificación necesaria no permite detectar infecciones pasadas. Por este motivo, la histología de placenta es el método recomendable para el diagnóstico de malaria placentaria para estudios epidemiológicos, ya que además de su mayor sensibilidad frente a la microscopía en lámina, permite distinguir entre infección activa (presencia de parásito), pasada (presencia de pigmento) o crónica (presencia de parásito y pigmento). El estudio de Ayisi et al. [15] observó una diferencia en la MTCT del VIH-1 según la concentración de parásitos basándose únicamente en el diagnóstico de malaria por microscopía en lámina, lo que pudo haber dado lugar a un error de clasificación de las placentas por no contar con datos sobre el infiltrado inflamatorio. Por ejemplo, es probable que algunas placentas aparentemente negativas por microscopía fueran positivas por histología. Aún con todo, es improbable que este error de clasificación por sí solo pudiera justificar las diferencias con los resultados de otros estudios [137].

También se ha sugerido que la asociación entre la malaria placentaria y la MTCT del VIH-1 puede depender de una relación compleja de las respuestas inmunes de la madre frente a la malaria, que por un lado podría estimular la replicación viral del VIH-1 en la placenta y aumentar la carga viral plasmática del VIH-1 o bien podría activar el control de la infección por malaria y la replicación del VIH-1 [15, 18]. Se sabe que la infección por *P. falciparum* influye en la expresión de marcadores de activación del sistema y sobre la secreción de citoquinas y quimioquinas proinflamatorias [107, 114, 124, 125]. Además, se ha observado que las placentas de mujeres infectadas con malaria tienen 3 veces más concentración de CCR5, un

receptor de quimioquina clave para la entrada del VIH-1 en la célula [121]. Sin embargo, varios estudios *in vitro* han demostrado que el TNF- α , IL-6 y el IL-1b activan la replicación del VIH-1 [118, 126], mientras que el IFN- γ y las β -quimioquinas la inhiben [127, 128]. Todas estas evidencias confirman que las concentraciones locales de citoquinas y quimioquinas inducidas por *P. falciparum* pueden variar y crear microambientes, sobre todo en la placenta, que afectan a la replicación del VIH-1 de maneras distintas.

Según estos indicios, podemos hipotetizar que en las mujeres inmunodeprimidas coinfectadas con VIH-1 y *P. falciparum* placentaria que estén inmunodeprimidas se activará la respuesta proinflamatoria, secretando citoquinas como TNF- α , IL-6 y el IL-1b que estimulan la replicación del VIH-1 y que podría aumentar el riesgo de MTCT del VIH-1. Por otra parte, en mujeres inmunocompetentes coinfectadas, se controlaría la respuesta proinflamatoria mediante la secreción de IL-10 y se secretaría IFN- γ y β -quimioquinas que inhiben la replicación del VIH-1 y producirían un aparente efecto protector.

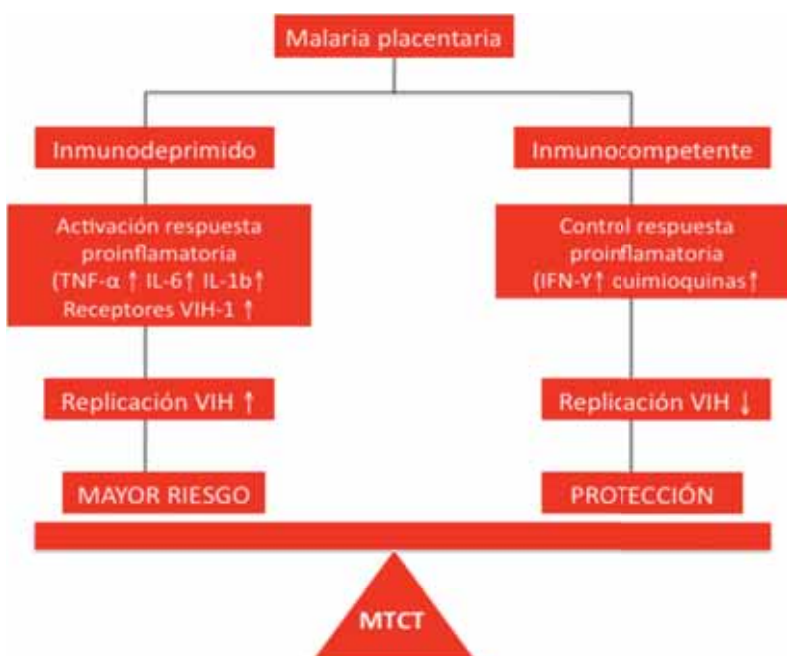


FIGURA 7 – Modelo de las interacciones inmunológicas por la coinfección por VIH-1 y *P. falciparum* y su posible impacto en la MTCT del VIH-1.

Podemos utilizar esta teoría para formular una hipótesis sobre por qué en este estudio la PM parece tender hacia un ligero efecto protector frente a la MTCT del VIH-1, con la limitación del tamaño de muestra pequeño y en el límite de ser significativo ($p=0.034$ en el análisis multivariado). Si las mujeres tienen un buen estado inmunológico, habrían regulado la respuesta proinflamatoria y controlado la carga viral plasmática del VIH-1, protegiendo frente a la MTCT del VIH-1. Esto explicaría el hecho de que no observemos un aumento de la carga viral plasmática del VIH-1 en mujeres con malaria comparado con las no infectadas. Al mismo tiempo, sabemos que en nuestro estudio las mujeres tenían la inmunidad bien conservada, ya que la mediana del recuento de CD4 en el momento del reclutamiento en un subgrupo de 95 mujeres era de 496 células/ μL [IQR 329-634]. Una limitación es que no tuviéramos los recuentos de CD4 de todas las mujeres del estudio para determinar su status inmunológico y evaluar la asociación potencial con la MTCT del VIH-1, aunque los datos disponibles para este subgrupo no hacen pensar que hubiera una diferencia inmunológica significativa entre las madres transmisoras del VIH-1 y las no transmisoras.

Es difícil analizar independientemente el efecto de la malaria placentaria en la MTCT del VIH-1 debido a la existencia de diversos factores que pueden estar involucrados en esta compleja relación, como la anemia, la malnutrición o el LBW. Uno de los objetivos de este estudio era aportar información sobre otros factores de riesgo de la MTCT del VIH-1 en Manhica, Mozambique. Como era de esperar, la carga viral plasmática del VIH-1 resultó ser un factor de riesgo de la MTCT del VIH-1.

Además, las mujeres con anemia en este estudio tenían hasta 4 veces más riesgo de MTCT que las mujeres sin anemia y esta relación era independiente del grupo de tratamiento y de la infección por malaria. Se ha descrito que la prevalencia de anemia materna es mayor en el África subsahariana que en países desarrollados y que además es multifactorial, pudiendo ser causado por factores tan diversos como la deficiencia en micronutrientes, deficiencia inmunitaria o infecciones por malaria, helmintos y VIH-1 [154, 155]. La malnutrición y recuentos de CD4 bajos [15, 20] son a su vez factores de riesgo de la MTCT del VIH-1, por lo que podrían

explicar en parte este aumento. Sin embargo, el bajo porcentaje de mujeres con malnutrición o recuentos de CD4 bajos indica que debe haber otras causas responsables de la anemia. La causa predominante de la anemia en el contexto del VIH es por bloqueo medular debido a enfermedad crónica. Este proceso se caracteriza por un descenso de la producción de glóbulos rojos a través de una serie de mecanismos que están mediados en parte por citoquinas proinflamatorias como TNF- α y IL-6 [155], que parecen estar implicadas en la activación de la replicación del VIH-1 [118, 126],

Por otra parte, no encontramos ninguna asociación entre la MTCT del VIH-1 y el LBW, a pesar de que un estudio reciente observó que las madres coinfectadas con VIH-1 y malaria por *P. falciparum* tenían mayor riesgo de dar a luz a un niño con LBW y a su vez, que el LBW era un factor de riesgo para la MTCT [123]. Sería interesante ver si en los otros estudios la coinfección también aumentaba el riesgo de LBW y esta era a su vez un factor de riesgo para la MTCT.

El tercer objetivo de esta tesis doctoral era evaluar la relación entre la malaria materna y la activación del sistema inmunitario en el momento del parto en mujeres VIH-positivas. Nuestros resultados revelaron que las mujeres VIH-positivas con malaria periférica tenían niveles significativamente mayores de IL-10 y MIP-1 β que las mujeres sin malaria periférica, como se ha descrito previamente [135]. Sin embargo, no se observó ninguna diferencia significativa en las citoquinas placentarias entre las mujeres con y sin malaria placentaria, aunque el pequeño tamaño de muestra puede haber introducido sesgo en la selección de muestras. A pesar de la importancia de estudiar las concentraciones de citoquinas placentarias *in vivo*, estos datos no permiten estudiar la cadena de acontecimientos de secreción de citoquinas que ocurren en la placenta. El análisis por inmunohistoquímica de tejido placentario permitiría detectar qué células están implicadas en la producción de citoquinas asociadas a la infección por malaria [142] a la vez que estudiar el efecto del pigmento malárico en la secreción de citoquinas. Futuros estudios deberían orientarse a clarificar los efectos que producen los parásitos, el

pigmento malárico, la inflamación y los diferentes microambientes de citoquinas y quimioquinas de la placenta en la MTCT del VIH-1.

Los estudios que conforman esta tesis doctoral presentan varias limitaciones. Como se comenta en el segundo artículo, una de las limitaciones más importante del estudio es el pequeño tamaño de la muestra. El estudio fue diseñado para observar una diferencia del 30% en el riesgo de MTCT entre el grupo SP y placebo pero los resultados señalan que el riesgo de MTCT en ambos grupos era similar (SP: 11.8% vs. Placebo: 13.2%; $p=0.784$).

La segunda limitación es que los dos estudios descritos en esta tesis doctoral estaban integrados dentro de un estudio principal cuyo objetivo principal era evaluar si el IPTp con SP tenía un efecto protector añadido al uso de ITN en la prevalencia del LBW. Ambos estudios secundarios fueron diseñados con posterioridad al inicio del estudio principal, lo que limitó el tamaño de muestra de dichos estudios ancilares. En el caso del estudio sobre epidemiología molecular, sólo nos fue posible amplificar 20 muestras de mujeres embarazadas VIH-positivas del estudio realizado en 1999, lo que pudo haber introducido sesgo de selección [156]. Sin embargo, encontramos diferencias significativas entre ambos grupos de secuencias, observando una mayor heterogeneidad en las secuencias del VIH-1 del 2004 comparado con las del 1999.

Por último, otra limitación es que la estimación de la MTCT del VIH en este estudio puede estar ligeramente subestimada por el uso de “dried blot spots” (gotas de sangre en papel de filtro) y HIV DNA-PCR para determinar el status de VIH del recién nacido en lugar de HIV RNA-PCR, que se ha descrito como la técnica más sensible [157, 158]. Además, la ventana de detección del VIH (tiempo entre la infección y el momento en el que es detectable) usando la técnica de PCR-DNA es aproximadamente de 1 mes, con un valor predictivo negativo bajo en las primeras semanas de vida [159]. Dado que la visita de la madre y el niño se realizó entre la cuarta y la sexta semana tras el parto, un resultado positivo del recién nacido podría ser debido a la transmisión del VIH-1 perinatal pero también por lactancia materna en esas primeras

semanas de vida, lo que dificulta la interpretación de nuestros resultados. Algunos estudios han intentado determinar el status de VIH en los primeros días de vida para determinar la tasa de transmisión durante el embarazo [160, 161]. Sin embargo, tanto los ensayos de DNA-PCR como los RNA-PCR tienen una sensibilidad menor del 50% los primeros días de vida [162, 163], por lo que las estimaciones de transmisión del VIH-1 en estos primeros días puede ser cuestionable.

Nuestros resultados están en consonancia con la hipótesis planteada por varios autores [15, 18, 137] de que existe un aparente y sutil equilibrio entre la carga viral plasmática del VIH-1, el microambiente de la placenta y la secreción de citoquinas proinflamatorias. Con el fin de mejorar nuestro entendimiento sobre los riesgos que sufren las mujeres embarazadas coinfectadas con el VIH-1 y la malaria, futuros estudios deberían orientarse a clarificar los efectos que producen los parásitos, el pigmento malárico, la inflamación y los diferentes microambientes de citoquinas y quimioquinas de la placenta en la MTCT del VIH-1, a la vez que su interacción con la inmunodepresión de la mujer infectada por malaria y VIH.

Los próximos estudios para evaluar el efecto de la PM en la MTCT del VIH-1 deben diseñarse con poder suficiente para poder detectar diferencias significativas, a la vez que incluir valores de carga viral periférica y placentaria y detectar los cambios histológicos de la placenta. En este sentido, y dado que muchas infecciones de malaria pasan desapercibidas por microscopía o histología [164], futuros estudios deberían analizar el efecto de la malaria placentaria submicroscópica (detectada por PCR) en la MTCT del VIH-1 aunque manteniendo la histología placentaria para poder detectar la inflamación de la placenta. Además, dado que muchos de los cambios inmunológicos observados son en gran medida dependientes del estado inmunológico [165, 166], los niveles de CD4 en el momento del parto deberían tratarse como una variable indispensable en futuros estudios y ajustar por el estadio clínico de la infección por VIH-1. Desde el 2005, el recuento de CD4 se ha empezado a realizar de forma rutinaria en el manejo clínico de los pacientes VIH-positivos en Mozambique.

Como existe un gran número de variables que pueden estar confundiendo la relación entre la PM y la MTCT del VIH-1, es necesario realizar estudios moleculares para entender la base inmunológica de por qué las mujeres VIH-positivas tienen un mayor riesgo de malaria periférica y placentaria y el efecto de la interacción entre VIH-1 y *P. falciparum* en la MTCT del VIH-1. Es muy posible que existan mecanismos independientes de la carga viral plasmática del VIH-1 a través de los cuales la infección por *P. falciparum* pueda afectar a la MTCT del VIH-1. Los estudios que analicen los cambios en la inmunidad humoral y celular deben incluir el análisis de cambios locales en la placenta de mujeres VIH-positivas con y sin malaria placentaria, evaluando los patrones de citoquinas y quimioquinas y sus receptores. Debe también profundizarse en si el aumento en la expresión de CCR5 observado en las placentas de mujeres infectadas con malaria en el estudio de Tkachuck et al. [121] puede realmente contribuir a aumentar la transmisión intrauterina del VIH-1. Para ello, se podrían hacer estudios de inmunohistoquímica para comparar la cantidad de receptores o moléculas involucradas en la entrada del VIH-1 a la célula (Ej.: CCR5 y DC-SIGN) entre mujeres transmisoras y no transmisoras de VIH-1 y separar por infección de malaria placentaria.

Con respecto a otros factores de riesgo de la MTCT, es necesario profundizar en el papel de la anemia en la MTCT del VIH-1, especialmente considerando que antiretrovirales como la AZT pueden también aumentar el riesgo de anemia. Además, se debe evaluar el efecto de las deficiencias en vitaminas y micronutrientes en la MTCT del VIH-1 y su relación con la anemia, dado que los resultados sobre el posible beneficio de suplementos vitamínicos en la MTCT del VIH-1 son contradictorios [167, 168].

De la misma forma, más estudios comparativos sobre la eficacia de transmisión de distintos subtipos y recombinantes de VIH-1 pueden ayudar a identificar determinantes genéticos de la transmisión y mejorar nuestro conocimiento sobre los mecanismos de paso del virus a través de las mucosas. Especial atención debe darse también al impacto del TARGA durante la lactancia materna en la MTCT según los subtipos de VIH-1.

Los resultados obtenidos en esta tesis doctoral pueden ser de gran utilidad para futuros estudios sobre la epidemia del VIH/SIDA en Mozambique, ya que presentan una descripción general de la epidemiología molecular del VIH-1 en Manhiça en mujeres embarazadas naïve para el tratamiento antiretroviral de gran actividad y describe los polimorfismos encontrados en estas secuencias antes de comenzar el TARGA. Dado que desde 2005 ya hay TARGA disponible en Manhiça, es importante analizar el efecto que está teniendo el TARGA en la creación de mutaciones de resistencia y en la evolución molecular del VIH-1.

En los últimos años, el Gobierno de Mozambique ha dado pasos importantes para frenar la epidemia del VIH/SIDA en el país, entre ellos la formación en el año 2000 del Consejo Nacional de SIDA. Actualmente opera en el Plan Estratégico Nacional para Combatir el VIH/SIDA (PEN 2005 - 2009) y a fecha de agosto del 2008, más de 115.000 mozambiqueños estaban recibiendo ya TARGA [54]. El inicio del TARGA en Mozambique, donde la epidemia de malaria es estable y donde desde el 2006 el IPTp con dos dosis de SP está dentro de las políticas nacionales de cuidado prenatal, presenta varios retos [169]. Existe evidencia de que ciertas interacciones entre medicamentos podrían causar efectos adversos y alterar los beneficios del tratamiento [18]. Por ejemplo, se ha descrito que las mujeres que toman AZT y SP tienen un mayor riesgo de mielosupresión [169]. El Ministerio de Salud, consciente de los riesgos añadidos de la coinfección por *P. falciparum* y VIH-1, está promoviendo iniciativas preventivas concretas, como la identificación de las personas VIH positivas como grupo de alta prioridad para recibir redes mosquiteras impregnadas subvencionadas. Sin embargo, siguen las discusiones sobre cuál es el mejor régimen de IPTp para las mujeres en TARGA y las negociaciones para elaborar mecanismos de colaboración entre las clínicas prenatales y de VIH [169].

Las mujeres embarazadas tienen un mayor riesgo de complicaciones específicas debido a la infección por malaria y VIH-1 [18, 170]. Sin embargo, la mayoría de los programas actuales de prevención y control del VIH-1 y la malaria siguen estando definidos y articulados independientemente. Debido a los altos gastos en salud que ambas enfermedades suponen

en los países más afectados, es necesario reforzar los sistemas de salud y proponer programas integrados que abarquen ambas enfermedades, especialmente en grupos de riesgo como las mujeres embarazadas. En los últimos años, varias instituciones internacionales han comenzado la implementación a gran escala de programas de TARGA en África, como el Global Fund for AIDS, tuberculosis and malaria (GFATM) o el President's Emergency Plan for AIDS Relief (PEPFAR/Emergency Plan). Dada la gran cantidad de recursos que se están invirtiendo en programas de VIH, es crucial aprovechar el momento como una oportunidad para reforzar los sistemas de salud en general, plantear programas de cuidado antenatales integrados de prevención de la MTCT del VIH-1, malaria, anemia y LBW y reducir así la morbilidad y la mortalidad de madres y niños en África Subsahariana.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

OBJETIVO 1: Caracterizar la epidemiología molecular del VIH-1 en mujeres embarazadas en Manhiça, Mozambique, y analizar la evolución genética entre 1999 y 2004

- Todas las secuencias analizadas tanto de 1999 como del 2004 pertenecían al subtipo C y presentaban gran variación genética con la existencia de diferentes sublinajes circulantes del subtipo C
- Los resultados del análisis de divergencia genética de estas secuencias sugieren que en la diversificación viral estuvieron implicadas fuerzas de selección positivas (mutaciones en aminoácidos que mejoran la aptitud del virus)

OBJETIVO 2: Evaluar si el tratamiento intermitente antimalárico (IPT) con dos dosis de sulfadoxina-pirimetamina (SP) durante el 2º y 3º trimestre del embarazo tiene algún efecto en la transmisión vertical del VIH-1

- No observamos diferencias significativas en la carga viral o en el riesgo de MTCT del VIH-1 entre el grupo SP y el placebo, a pesar de que el SP consiguió reducir significativamente la malaria periférica y la malaria placentaria activa
- La carga viral plasmática del VIH-1 estaba asociada con un incremento del riesgo de MTCT del VIH-1
- Las mujeres con anemia (hematocrito < 33%) en este estudio tenían un riesgo hasta 4 veces mayor de MTCT de VIH-1 que las mujeres sin anemia y esta relación era independiente de la carga viral plasmática del VIH-1, del grupo de tratamiento y de la infección por *P. falciparum*
- La malaria placentaria (tanto activa como pasada) estaba asociada con un menor riesgo de MTCT del VIH-1 en el análisis multivariado

OBJETIVO 3: Evaluar la relación entre la infección por *P. falciparum* materna y la activación del sistema inmunitario en el momento del parto en mujeres embarazadas

VIH-positivas

- Las mujeres VIH-positivas con malaria periférica tenían niveles significativamente mayores de IL-10 y MIP-1 β que las mujeres sin malaria periférica
- No se observó ninguna diferencia significativa entre las mujeres con y sin malaria placentaria para ninguna de las citoquinas placentarias analizadas

REFERENCIAS

REFERENCIAS

1. UNAIDS/WHO. **Report on the Global AIDS Epidemic**. In. Geneva: World Health Organization; 2008.
2. UNICEF/UNAIDS. **Children and AIDS: A stocktaking report**. In: http://www.unicef.org/publications/index_29157.htm/; 2007.
3. Conselho Nacional de Combate ao HIV S. **Relatório de actividades por 2005**. In. Maputo: Ministério de Saúde; 2006.
4. Geretti AM. **HIV-1 subtypes: epidemiology and significance for HIV management**. *Curr Opin Infect Dis* 2006,19:1-7.
5. Thomson MM, Najera R. **Molecular epidemiology of HIV-1 variants in the global AIDS pandemic: an update**. *AIDS Rev* 2005,7:210-224.
6. Butler IF, Pandrea I, Marx PA, Apetrei C. **HIV genetic diversity: biological and public health consequences**. *Curr HIV Res* 2007,5:23-45.
7. Julg B, Goebel FD. **HIV genetic diversity: any implications for drug resistance?** *Infection* 2005,33:299-301.
8. Arien KK, Vanham G, Arts EJ. **Is HIV-1 evolving to a less virulent form in humans?** *Nat Rev Microbiol* 2007,5:141-151.
9. Perno CF, Cozzi-Lepri A, Forbici F, Bertoli A, Violin M, Stella Mura M, *et al*. **Minor mutations in HIV protease at baseline and appearance of primary mutation 90M in patients for whom their first protease-inhibitor antiretroviral regimens failed**. *J Infect Dis* 2004,189:1983-1987.
10. Eshleman SH, Hoover DR, Chen S, Hudelson SE, Guay LA, Mwatha A, *et al*. **Nevirapine (NVP) resistance in women with HIV-1 subtype C, compared with subtypes A and D, after the administration of single-dose NVP**. *J Infect Dis* 2005,192:30-36.
11. Kourtis AP, Lee FK, Abrams EJ, Jamieson DJ, Bulterys M. **Mother-to-child transmission of HIV-1: timing and implications for prevention**. *Lancet Infect Dis* 2006,6:726-732.
12. Rollins NC, Coovadia HM, Bland RM, Coutsooudis A, Bennish ML, Patel D, Newell ML. **Pregnancy Outcomes in HIV-Infected and Uninfected Women in Rural and Urban South Africa**. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2006.
13. Temmerman M, Plummer FA, Mirza NB, Ndinya-Achola JO, Wamola IA, Nagelkerke N, *et al*. **Infection with HIV as a risk factor for adverse obstetrical outcome**. *AIDS* 1990,4:1087-1093.
14. Braddick MR, Kreiss JK, Embree JB, Datta P, Ndinya-Achola JO, Pamba H, *et al*. **Impact of maternal HIV infection on obstetrical and early neonatal outcome**. *AIDS* 1990,4:1001-1005.

15. Ayisi JG, van Eijk AM, Newman RD, ter Kuile FO, Shi YP, Yang C, *et al.* **Maternal malaria and perinatal HIV transmission, western Kenya.** *Emerg Infect Dis* 2004,10:643-652.
16. Ayouba A, Nerrienet E, Menu E, Lobe MM, Thonnon J, Leke RJ, *et al.* **Mother-to-child transmission of human immunodeficiency virus type 1 in relation to the season in Yaounde, Cameroon.** *Am J Trop Med Hyg* 2003,69:447-449.
17. Mwapasa V, Rogerson SJ, Kwiek JJ, Wilson PE, Milner D, Molyneux ME, *et al.* **Maternal syphilis infection is associated with increased risk of mother-to-child transmission of HIV in Malawi.** *AIDS* 2006,20:1869-1877.
18. ter Kuile FO, Parise ME, Verhoeff FH, Udhayakumar V, Newman RD, van Eijk AM, *et al.* **The burden of co-infection with human immunodeficiency virus type 1 and malaria in pregnant women in sub-saharan Africa.** *Am J Trop Med Hyg* 2004,71:41-54.
19. Brahmbhatt H, Kigozi G, Wabwire-Mangen F, Serwadda D, Sewankambo N, Lutalo T, *et al.* **The effects of placental malaria on mother-to-child HIV transmission in Rakai, Uganda.** *AIDS* 2003,17:2539-2541.
20. Mwapasa V, Rogerson SJ, Molyneux ME, Abrams ET, Kamwendo DD, Lema VM, *et al.* **The effect of Plasmodium falciparum malaria on peripheral and placental HIV-1 RNA concentrations in pregnant Malawian women.** *AIDS* 2004,18:1051-1059.
21. Semba RD, Miotti PG, Chipangwi JD, Saah AJ, Canner JK, Dallabetta GA, Hoover DR. **Maternal vitamin A deficiency and mother-to-child transmission of HIV-1.** *Lancet* 1994,343:1593-1597.
22. Fawzi W, Msamanga G, Spiegelman D, Hunter DJ. **Studies of vitamins and minerals and HIV transmission and disease progression.** *J Nutr* 2005,135:938-944.
23. Gallagher M, Malhotra I, Mungai PL, Wamachi AN, Kioko JM, Ouma JH, *et al.* **The effects of maternal helminth and malaria infections on mother-to-child HIV transmission.** *AIDS* 2005,19:1849-1855.
24. Duliege AM, Amos CI, Felton S, Biggar RJ, Goedert JJ. **Birth order, delivery route, and concordance in the transmission of human immunodeficiency virus type 1 from mothers to twins. International Registry of HIV-Exposed Twins.** *J Pediatr* 1995,126:625-632.
25. Goedert JJ, Duliege AM, Amos CI, Felton S, Biggar RJ. **High risk of HIV-1 infection for first-born twins. The International Registry of HIV-exposed Twins.** *Lancet* 1991,338:1471-1475.
26. Read JS, Newell MK. **Efficacy and safety of cesarean delivery for prevention of mother-to-child transmission of HIV-1.** *Cochrane Database Syst Rev* 2005:CD005479.
27. Wiysonge CS, Shey MS, Shang JD, Sterne JA, Brocklehurst P. **Vaginal disinfection for preventing mother-to-child transmission of HIV infection.** *Cochrane Database Syst Rev* 2005:CD003651.

28. Kwiek JJ, Mwapasa V, Milner DA, Jr., Alker AP, Miller WC, Tadesse E, *et al.* **Maternal-fetal microtransfusions and HIV-1 mother-to-child transmission in Malawi.** *PLoS Med* 2006,3:e10.
29. Biggar RJ, Lee TH, Wen L, Broadhead R, Kumwenda N, Taha TE, Busch MP. **The role of transplacental microtransfusions of maternal lymphocytes in HIV transmission to newborns.** *AIDS* 2008,22:2251-2256.
30. Moore JS, Rahemtulla F, Kent LW, Hall SD, Ikizler MR, Wright PF, *et al.* **Oral epithelial cells are susceptible to cell-free and cell-associated HIV-1 infection in vitro.** *Virology* 2003,313:343-353.
31. Kourtis AP, Butera S, Ibegbu C, Beled L, Duerr A. **Breast milk and HIV-1: vector of transmission or vehicle of protection?** *Lancet Infect Dis* 2003,3:786-793.
32. Van de Perre P. **Mother-to-child transmission of HIV-1: the 'all mucosal' hypothesis as a predominant mechanism of transmission.** *AIDS* 1999,13:1133-1138.
33. Koulinska IN, Villamor E, Chaplin B, Msamanga G, Fawzi W, Renjifo B, Essex M. **Transmission of cell-free and cell-associated HIV-1 through breast-feeding.** *J Acquir Immune Defic Syndr* 2006,41:93-99.
34. Shapiro RL, Ndung'u T, Lockman S, Smeaton LM, Thior I, Wester C, *et al.* **Highly active antiretroviral therapy started during pregnancy or postpartum suppresses HIV-1 RNA, but not DNA, in breast milk.** *J Infect Dis* 2005,192:713-719.
35. Ioannidis JP, Abrams EJ, Ammann A, Bulterys M, Goedert JJ, Gray L, *et al.* **Perinatal transmission of human immunodeficiency virus type 1 by pregnant women with RNA virus loads <1000 copies/ml.** *J Infect Dis* 2001,183:539-545.
36. Kourtis AP, Jamieson DJ, de Vincenzi I, Taylor A, Thigpen MC, Dao H, *et al.* **Prevention of human immunodeficiency virus-1 transmission to the infant through breastfeeding: new developments.** *Am J Obstet Gynecol* 2007,197:S113-122.
37. World Health Organization, UNAIDS, UNICEF. **Towards universal access: scaling up priority HIV/AIDS interventions in the health sector. Progress report.** 2007.
38. Republic of Mozambique. National AIDS Council. **Mozambique Progress Report for the United Nations General Assembly Special Session on HIV and AIDS.** UNAIDS 2008.
39. Connor EM, Sperling RS, Gelber R, Kiselev P, Scott G, O'Sullivan MJ, *et al.* **Reduction of maternal-infant transmission of human immunodeficiency virus type 1 with zidovudine treatment. Pediatric AIDS Clinical Trials Group Protocol 076 Study Group.** *N Engl J Med* 1994,331:1173-1180.
40. Lalletant M, Jourdain G, Le Coeur S, Kim S, Koetsawang S, Comeau AM, *et al.* **A trial of shortened zidovudine regimens to prevent mother-to-child transmission of human immunodeficiency virus type 1. Perinatal HIV Prevention Trial (Thailand) Investigators.** *N Engl J Med* 2000,343:982-991.
41. Guay LA, Musoke P, Fleming T, Bagenda D, Allen M, Nakabiito C, *et al.* **Intrapartum and neonatal single-dose nevirapine compared with zidovudine for prevention of**

- mother-to-child transmission of HIV-1 in Kampala, Uganda: HIVNET 012 randomised trial.** *Lancet* 1999,354:795-802.
42. Jackson JB, Musoke P, Fleming T, Guay LA, Bagenda D, Allen M, *et al.* **Intrapartum and neonatal single-dose nevirapine compared with zidovudine for prevention of mother-to-child transmission of HIV-1 in Kampala, Uganda: 18-month follow-up of the HIVNET 012 randomised trial.** *Lancet* 2003,362:859-868.
 43. Eshleman SH, Mracna M, Guay LA, Deseyve M, Cunningham S, Mirochnick M, *et al.* **Selection and fading of resistance mutations in women and infants receiving nevirapine to prevent HIV-1 vertical transmission (HIVNET 012).** *AIDS* 2001,15:1951-1957.
 44. Flys TS, McConnell MS, Matovu F, Church JD, Bagenda D, Khaki L, *et al.* **Nevirapine resistance in women and infants after first versus repeated use of single-dose nevirapine for prevention of HIV-1 vertical transmission.** *J Infect Dis* 2008,198:465-469.
 45. Lockman S, Shapiro RL, Smeaton LM, Wester C, Thior I, Stevens L, *et al.* **Response to antiretroviral therapy after a single, peripartum dose of nevirapine.** *N Engl J Med* 2007,356:135-147.
 46. WHO. **New data on the prevention of mother-to-child transmission of HIV and their policy implications: conclusions and recommendations.** *WHO Technical Consultation on behalf of the UNFPA/UNICEF/WHO/UNAIDS Inter-Agency Task Team on Mother-to-child Transmission of HIV.* Geneva, 11-13 October 2000.
 47. Smith MM, Kuhn L. **Exclusive breast-feeding: does it have the potential to reduce breast-feeding transmission of HIV-1?** *Nutr Rev* 2000,58:333-340.
 48. Neville MC, Allen JC, Archer PC, Casey CE, Seacat J, Keller RP, *et al.* **Studies in human lactation: milk volume and nutrient composition during weaning and lactogenesis.** *Am J Clin Nutr* 1991,54:81-92.
 49. Piwoz EG, Humphrey J. **Increased risk of infant HIV infection with early mixed feeding.** *AIDS* 2005,19:1719-1720; author reply 1720-1711.
 50. Coovadia HM, Bland RM. **Preserving breastfeeding practice through the HIV pandemic.** *Trop Med Int Health* 2007,12:1116-1133.
 51. World Health Organization. **Global Strategy for Infant and Young Child Feeding.** In. Geneva; 2003.
 52. WHO/UNAIDS/UNICEF. **TOWARDS UNIVERSAL ACCESS, Scaling up priority HIV/AIDS interventions in the health sector.** In. Geneva; 2007.
 53. UNAIDS/WHO. **Uniting the world against AIDS.** <http://www.unaids.org/en/Regions/Countries/Countries/mozambique.asp>. *UN Technical Working Group (Mozambique)* 2006.
 54. Ministério da Saúde de Moçambique. **Boletim de HIV/SIDA** In: *DIRECÇÃO NACIONAL DE ASSISTÊNCIA MÉDICA.* Maputo; 2008.
 55. Hemelaar J, Gouws E, Ghys PD, Osmanov S. **Global and regional distribution of HIV-1 genetic subtypes and recombinants in 2004.** *AIDS* 2006,20:W13-23.

56. Renjifo B, Chaplin B, Mwakagile D. **Epidemic expansion of HIV type 1 subtype C and recombinant genotypes in Tanzania.** *AIDS Res Hum Retroviruses* 1998,14:635-638.
57. Bellocchi MC, Forbici F, Palombi L, Gori C, Coelho E, Svicher V, *et al.* **Subtype analysis and mutations to antiviral drugs in HIV-1-infected patients from Mozambique before initiation of antiretroviral therapy: results from the DREAM programme.** *J Med Virol* 2005,76:452-458.
58. Parreira R, Piedade J, Domingues A, Lobao D, Santos M, Venenno T, *et al.* **Genetic characterization of human immunodeficiency virus type 1 from Beira, Mozambique.** *Microbes Infect* 2006,8:2442-2451.
59. Menendez C, Bardaji A, Sigauque B, Romagosa C, Sanz S, Serra-Casas E, *et al.* **A randomized placebo-controlled trial of intermittent preventive treatment in pregnant women in the context of insecticide treated nets delivered through the antenatal clinic.** *PLoS ONE* 2008,3:e1934.
60. Snow RW, Guerra CA, Noor AM, Myint HY, Hay SI. **The global distribution of clinical episodes of Plasmodium falciparum malaria.** *Nature* 2005,434:214-217.
61. World Health Organization. Expert Committee on Malaria. *WHO Technical Report Series* 2000,892.
62. World Health Organization. **World Malaria Report.** In. Switzerland; 2008.
63. World Health Organization, Communicable Diseases Cluster. **Severe falciparum malaria.** *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2000,94:S1-S9.
64. Aranda C, Aponte JJ, Saute F, Casimiro S, Pinto J, Sousa C, *et al.* **Entomological characteristics of malaria transmission in Manhica, a rural area in southern Mozambique.** *J Med Entomol* 2005,42:180-186.
65. Mbugi EV, Mutayoba BM, Malisa AL, Balthazary ST, Nyambo TB, Mshinda H. **Drug resistance to sulphadoxine-pyrimethamine in Plasmodium falciparum malaria in Mlimba, Tanzania.** *Malar J* 2006,5:94.
66. Abacassamo F, Enosse S, Aponte JJ, Gomez-Olive FX, Quinto L, Mabunda S, *et al.* **Efficacy of chloroquine, amodiaquine, sulphadoxine-pyrimethamine and combination therapy with artesunate in Mozambican children with non-complicated malaria.** *Trop Med Int Health* 2004,9:200-208.
67. Schofield L, Mueller I. **Clinical immunity to malaria.** *Curr Mol Med* 2006,6:205-221.
68. Roll Back Malaria/WHO/UNICEF. **World Malaria Report.** 2005.
69. Brabin BJ. **An analysis of malaria in pregnancy in Africa.** *Bull World Health Organ* 1983,61:1005-1016.
70. Bray RS, Anderson MJ. **Falciparum malaria and pregnancy.** *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1979,73:427-431.
71. Uneke CJ. **Impact of Placental Plasmodium falciparum Malaria on Pregnancy and Perinatal Outcome in Sub-Saharan Africa: I: Introduction to Placental Malaria.** *Yale J Biol Med* 2007,80:39-50.

72. Desai M, ter Kuile FO, Nosten F, McGready R, Asamo K, Brabin B, Newman RD. **Epidemiology and burden of malaria in pregnancy.** *Lancet Infect Dis* 2007,7:93-104.
73. Menendez C, Ordi J, Ismail MR, Ventura PJ, Aponte JJ, Kahigwa E, *et al.* **The impact of placental malaria on gestational age and birth weight.** *J Infect Dis* 2000,181:1740-1745.
74. Menendez C. **Malaria during pregnancy: a priority area of malaria research and control.** *Parasitol Today* 1995,11:178-183.
75. Menendez C, Fleming AF, Alonso PL. **Malaria-related anaemia.** *Parasitol Today* 2000,16:469-476.
76. Steketee RW, Nahlen BL, Parise ME, Menendez C. **The burden of malaria in pregnancy in malaria-endemic areas.** *Am J Trop Med Hyg* 2001,64:28-35.
77. McCormick MC. **The contribution of low birth weight to infant mortality and childhood morbidity.** *N Engl J Med* 1985,312:82-90.
78. Guyatt HL, Snow RW. **Impact of malaria during pregnancy on low birth weight in sub-Saharan Africa.** *Clin Microbiol Rev* 2004,17:760-769, table of contents.
79. Sullivan AD, Nyirenda T, Cullinan T, Taylor T, Harlow SD, James SA, Meshnick SR. **Malaria infection during pregnancy: intrauterine growth retardation and preterm delivery in Malawi.** *J Infect Dis* 1999,179:1580-1583.
80. Bulmer JN, Rasheed FN, Francis N, Morrison L, Greenwood BM. **Placental malaria. I. Pathological classification.** *Histopathology* 1993,22:211-218.
81. Ismail MR, Ordi J, Menendez C, Ventura PJ, Aponte JJ, Kahigwa E, *et al.* **Placental pathology in malaria: a histological, immunohistochemical, and quantitative study.** *Hum Pathol* 2000,31:85-93.
82. WHO. **A strategic framework for malaria prevention and control during pregnancy in the African region: report AFR/MAL/04/01. Brazzaville, Democratic Republic of Congo:WHO.** In; 2004.
83. Guillet P, Alnwick D, Cham MK, Neira M, Zaim M, Heymann D, Mukelabai K. **Long-lasting treated mosquito nets: a breakthrough in malaria prevention.** *Bull World Health Organ* 2001,79:998.
84. Binka FN, Kubaje A, Adjuik M, Williams LA, Lengeler C, Maude GH, *et al.* **Impact of permethrin impregnated bednets on child mortality in Kassena-Nankana district, Ghana: a randomized controlled trial.** *Trop Med Int Health* 1996,1:147-154.
85. Nevill CG, Some ES, Mung'ala VO, Mutemi W, New L, Marsh K, *et al.* **Insecticide-treated bednets reduce mortality and severe morbidity from malaria among children on the Kenyan coast.** *Trop Med Int Health* 1996,1:139-146.
86. D'Alessandro U, Olaleye BO, McGuire W, Langerock P, Bennett S, Aikins MK, *et al.* **Mortality and morbidity from malaria in Gambian children after introduction of an impregnated bednet programme.** *Lancet* 1995,345:479-483.

87. Browne EN, Maude GH, Binka FN. **The impact of insecticide-treated bednets on malaria and anaemia in pregnancy in Kassena-Nankana district, Ghana: a randomized controlled trial.** *Trop Med Int Health* 2001,6:667-676.
88. D'Alessandro U, Langerock P, Bennett S, Francis N, Cham K, Greenwood BM. **The impact of a national impregnated bed net programme on the outcome of pregnancy in primigravidae in The Gambia.** *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1996,90:487-492.
89. Dolan G, ter Kuile FO, Jacoutot V, White NJ, Luxemburger C, Malankirri L, *et al.* **Bed nets for the prevention of malaria and anaemia in pregnancy.** *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1993,87:620-626.
90. Shulman CE, Dorman EK, Talisuna AO, Lowe BS, Nevill C, Snow RW, *et al.* **A community randomized controlled trial of insecticide-treated bednets for the prevention of malaria and anaemia among primigravid women on the Kenyan coast.** *Trop Med Int Health* 1998,3:197-204.
91. ter Kuile FO, Terlouw DJ, Phillips-Howard PA, Hawley WA, Friedman JF, Kariuki SK, *et al.* **Reduction of malaria during pregnancy by permethrin-treated bed nets in an area of intense perennial malaria transmission in western Kenya.** *Am J Trop Med Hyg* 2003,68:50-60.
92. Parise ME, Ayisi JG, Nahlen BL, Schultz LJ, Roberts JM, Misore A, *et al.* **Efficacy of sulfadoxine-pyrimethamine for prevention of placental malaria in an area of Kenya with a high prevalence of malaria and human immunodeficiency virus infection.** *Am J Trop Med Hyg* 1998,59:813-822.
93. Schultz LJ, Steketee RW, Macheso A, Kazembe P, Chitsulo L, Wirima JJ. **The efficacy of antimalarial regimens containing sulfadoxine-pyrimethamine and/or chloroquine in preventing peripheral and placental Plasmodium falciparum infection among pregnant women in Malawi.** *Am J Trop Med Hyg* 1994,51:515-522.
94. Verhoeff FH, Brabin BJ, Hart CA, Chimsuku L, Kazembe P, Broadhead RL. **Increased prevalence of malaria in HIV-infected pregnant women and its implications for malaria control.** *Trop Med Int Health* 1999,4:5-12.
95. WHO/AFRO. **Recommendations on the use of Sulphadoxine-Pyrimethamine (SP) for Intermittent Preventive Treatment during Pregnancy (IPT) in areas of moderate to high resistance to SP in the African region** http://www.afro.who.int/malaria/publications/malaria_in_pregnancy_sulfadoxine.pdf. In; 2005.
96. Filler SJ, Kazembe P, Thigpen M, Macheso A, Parise ME, Newman RD, *et al.* **Randomized Trial of 2-Dose versus Monthly Sulfadoxine-Pyrimethamine Intermittent Preventive Treatment for Malaria in HIV-Positive and HIV-Negative Pregnant Women in Malawi.** *J Infect Dis* 2006,194:286-293.
97. Hamer DH, Mwanakasale V, Macleod WB, Chalwe V, Mukwamataba D, Champo D, *et al.* **Two-Dose versus Monthly Intermittent Preventive Treatment of Malaria with Sulfadoxine-Pyrimethamine in HIV-Seropositive Pregnant Zambian Women.** *J Infect Dis* 2007,196:1585-1594.
98. White NJ. **Antimalarial drug resistance.** *J Clin Invest* 2004,113:1084-1092.

99. Allouche A, Bailey W, Barton S, Bwika J, Chimpeni P, Falade CO, *et al.* **Comparison of chlorproguanil-dapsone with sulfadoxine-pyrimethamine for the treatment of uncomplicated falciparum malaria in young African children: double-blind randomised controlled trial.** *Lancet* 2004,363:1843-1848.
100. White N. **Sulfadoxine-pyrimethamine for uncomplicated falciparum malaria: sulfadoxine-pyrimethamine is not working in Malawi.** *Bmj* 2004,328:1259; author reply 1260.
101. White NJ. **Intermittent presumptive treatment for malaria.** *PLoS Med* 2005,2:e3.
102. ter Kuile FO, van Eijk AM, Filler SJ. **Effect of sulfadoxine-pyrimethamine resistance on the efficacy of intermittent preventive therapy for malaria control during pregnancy: a systematic review.** *JAMA* 2007,297:2603-2616.
103. Mbaye A, Richardson K, Balajo B, Dunyo S, Shulman C, Milligan P, *et al.* **A randomized, placebo-controlled trial of intermittent preventive treatment with sulphadoxine-pyrimethamine in Gambian multigravidae.** *Trop Med Int Health* 2006,11:992-1002.
104. Njagi JK, Magnussen P, Estambale B, Ouma J, Mugo B. **Prevention of anaemia in pregnancy using insecticide-treated bednets and sulfadoxine-pyrimethamine in a highly malarious area of Kenya: a randomized controlled trial.** *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2003,97:277-282.
105. Abu-Raddad LJ, Patnaik P, Kublin JG. **Dual infection with HIV and malaria fuels the spread of both diseases in sub-Saharan Africa.** *Science* 2006,314:1603-1606.
106. Mount AM, Mwapasa V, Elliott SR, Beeson JG, Tadesse E, Lema VM, *et al.* **Impairment of humoral immunity to Plasmodium falciparum malaria in pregnancy by HIV infection.** *Lancet* 2004,363:1860-1867.
107. French N, Nakyingi J, Lugada E, Watera C, Whitworth JA, Gilks CF. **Increasing rates of malarial fever with deteriorating immune status in HIV-1-infected Ugandan adults.** *AIDS* 2001,15:899-906.
108. Whitworth J, Morgan D, Quigley M, Smith A, Mayanja B, Eotu H, *et al.* **Effect of HIV-1 and increasing immunosuppression on malaria parasitaemia and clinical episodes in adults in rural Uganda: a cohort study.** *Lancet* 2000,356:1051-1056.
109. Patnaik P, Jere CS, Miller WC, Hoffman IF, Wirima J, Pendame R, *et al.* **Effects of HIV-1 serostatus, HIV-1 RNA concentration, and CD4 cell count on the incidence of malaria infection in a cohort of adults in rural Malawi.** *J Infect Dis* 2005,192:984-991.
110. Hewitt K, Steketee R, Mwapasa V, Whitworth J, French N. **Interactions between HIV and malaria in non-pregnant adults: evidence and implications.** *AIDS* 2006,20:1993-2004.
111. Cohen C, Karstaedt A, Frean J, Thomas J, Govender N, Prentice E, *et al.* **Increased prevalence of severe malaria in HIV-infected adults in South Africa.** *Clin Infect Dis* 2005,41:1631-1637.
112. Mermin J, Ekwaru JP, Liechty CA, Were W, Downing R, Ransom R, *et al.* **Effect of co-trimoxazole prophylaxis, antiretroviral therapy, and insecticide-treated bednets**

- on the frequency of malaria in HIV-1-infected adults in Uganda: a prospective cohort study. *Lancet* 2006,367:1256-1261.
113. van Eijk AM, Ayisi JG, ter Kuile FO, Misore AO, Otieno JA, Rosen DH, *et al.* **HIV increases the risk of malaria in women of all gravidities in Kisumu, Kenya.** *AIDS* 2003,17:595-603.
 114. Lawn SD. **AIDS in Africa: the impact of coinfections on the pathogenesis of HIV-1 infection.** *J Infect* 2004,48:1-12.
 115. Hoffman IF, Jere CS, Taylor TE, Munthali P, Dyer JR, Wirima JJ, *et al.* **The effect of Plasmodium falciparum malaria on HIV-1 RNA blood plasma concentration.** *AIDS* 1999,13:487-494.
 116. Kublin JG, Patnaik P, Jere CS, Miller WC, Hoffman IF, Chimbiya N, *et al.* **Effect of Plasmodium falciparum malaria on concentration of HIV-1-RNA in the blood of adults in rural Malawi: a prospective cohort study.** *Lancet* 2005,365:233-240.
 117. Froebel K, Howard W, Schafer JR, Howie F, Whitworth J, Kaleebu P, *et al.* **Activation by malaria antigens renders mononuclear cells susceptible to HIV infection and re-activates replication of endogenous HIV in cells from HIV-infected adults.** *Parasite Immunol* 2004,26:213-217.
 118. Xiao L, Owen SM, Rudolph DL, Lal RB, Lal AA. **Plasmodium falciparum antigen-induced human immunodeficiency virus type 1 replication is mediated through induction of tumor necrosis factor-alpha.** *J Infect Dis* 1998,177:437-445.
 119. Mermin J, Lule JR, Ekwaru JP. **Association between malaria and CD4 cell count decline among persons with HIV.** *J Acquir Immune Defic Syndr* 2006,41:129-130.
 120. Van Geertruyden JP, Mulenga M, Kasongo W, Polman K, Colebunders R, Kestens L, D'Alessandro U. **CD4 T-cell count and HIV-1 infection in adults with uncomplicated malaria.** *J Acquir Immune Defic Syndr* 2006,43:363-367.
 121. Tkachuk AN, Moormann AM, Poore JA, Rochford RA, Chensue SW, Mwapasa V, Meshnick SR. **Malaria enhances expression of CC chemokine receptor 5 on placental macrophages.** *J Infect Dis* 2001,183:967-972.
 122. Inion I, Mwanyumba F, Gaillard P, Chohan V, Verhofstede C, Claeys P, *et al.* **Placental malaria and perinatal transmission of human immunodeficiency virus type 1.** *J Infect Dis* 2003,188:1675-1678.
 123. Brahmabhatt H, Sullivan D, Kigozi G, Askin F, Wabwire-Mangenm F, Serwadda D, *et al.* **Association of HIV and Malaria With Mother-to-Child Transmission, Birth Outcomes, and Child Mortality.** *J Acquir Immune Defic Syndr* 2008,47:472-476.
 124. Grimwade K, French N, Mbatha DD, Zungu DD, Dedicoat M, Gilks CF. **HIV infection as a cofactor for severe falciparum malaria in adults living in a region of unstable malaria transmission in South Africa.** *AIDS* 2004,18:547-554.
 125. Pisell TL, Hoffman IF, Jere CS, Ballard SB, Molyneux ME, Butera ST, Lawn SD. **Immune activation and induction of HIV-1 replication within CD14 macrophages during acute Plasmodium falciparum malaria coinfection.** *AIDS* 2002,16:1503-1509.

126. Kfutwah AK, Mary JY, Nicola MA, Blaise-Boisseau S, Barre-Sinoussi F, Ayouba A, Menu E. **Tumour necrosis factor-alpha stimulates HIV-1 replication in single-cycle infection of human term placental villi fragments in a time, viral dose and envelope dependent manner.** *Retrovirology* 2006,3:36.
127. Coccia EM, Krust B, Hovanessian AG. **Specific inhibition of viral protein synthesis in HIV-infected cells in response to interferon treatment.** *J Biol Chem* 1994,269:23087-23094.
128. Alkhatib G, Locati M, Kennedy PE, Murphy PM, Berger EA. **HIV-1 coreceptor activity of CCR5 and its inhibition by chemokines: independence from G protein signaling and importance of coreceptor downmodulation.** *Virology* 1997,234:340-348.
129. Moormann AM, Sullivan AD, Rochford RA, Chensue SW, Bock PJ, Nyirenda T, Meshnick SR. **Malaria and pregnancy: placental cytokine expression and its relationship to intrauterine growth retardation.** *J Infect Dis* 1999,180:1987-1993.
130. Suguitan AL, Jr., Leke RG, Fouda G, Zhou A, Thuita L, Metenou S, *et al.* **Changes in the levels of chemokines and cytokines in the placentas of women with Plasmodium falciparum malaria.** *J Infect Dis* 2003,188:1074-1082.
131. Fleming AF, Menendez C. **Blood.** In: *Principles of Medicine in Africa*. Edited by Parry E, Godfrey R, Mabey D, Gill G. 3rd ed: Cambridge University Press; 2004:924-970.
132. Kanya MR, Gasasira AF, Yeka A, Bakyaite N, Nsobya SL, Francis D, *et al.* **Effect of HIV-1 infection on antimalarial treatment outcomes in Uganda: a population-based study.** *J Infect Dis* 2006,193:9-15.
133. Shah SN, Smith EE, Obonyo CO, Kain KC, Bloland PB, Slutsker L, Hamel MJ. **HIV immunosuppression and antimalarial efficacy: sulfadoxine-pyrimethamine for the treatment of uncomplicated malaria in HIV-infected adults in Siaya, Kenya.** *J Infect Dis* 2006,194:1519-1528.
134. Korenromp EL. **Malaria Attributable to the HIV-1 Epidemic, Sub-Saharan Africa.** *Emerg Infect Dis* 2005,11:1410-1419.
135. Jason J, Archibald LK, Nwanyanwu OC, Bell M, Buchanan I, Larned J, *et al.* **Cytokines and malaria parasitemia.** *Clin Immunol* 2001,100:208-218.
136. Derrien M, Faye A, Dolcini G, Chaouat G, Barre-Sinoussi F, Menu E. **Impact of the placental cytokine-chemokine balance on regulation of cell-cell contact-induced human immunodeficiency virus type 1 translocation across a trophoblastic barrier in vitro.** *J Virol* 2005,79:12304-12310.
137. Ned RM, Moore JM, Chaisavaneeyakorn S, Udhayakumar V. **Modulation of immune responses during HIV-malaria co-infection in pregnancy.** *Trends Parasitol* 2005,21:284-291.
138. Raghupathy R. **Th1-type immunity is incompatible with successful pregnancy.** *Immunol Today* 1997,18:478-482.
139. Li C, Corraliza I, Langhorne J. **A defect in interleukin-10 leads to enhanced malarial disease in Plasmodium chabaudi chabaudi infection in mice.** *Infect Immun* 1999,67:4435-4442.

140. Bento CA, Hygino J, Andrade RM, Saramago CS, Silva RG, Silva AA, *et al.* **IL-10-secreting T cells from HIV-infected pregnant women downregulate HIV-1 replication: effect enhanced by antiretroviral treatment.** *AIDS* 2009,23:9-18.
141. Chaisavaneeyakorn S, Moore JM, Mirel L, Othoro C, Otieno J, Chaiyaraj SC, *et al.* **Levels of macrophage inflammatory protein 1 alpha (MIP-1 alpha) and MIP-1 beta in intervillous blood plasma samples from women with placental malaria and human immunodeficiency virus infection.** *Clin Diagn Lab Immunol* 2003,10:631-636.
142. Abrams ET, Brown H, Chensue SW, Turner GD, Tadesse E, Lema VM, *et al.* **Host response to malaria during pregnancy: placental monocyte recruitment is associated with elevated beta chemokine expression.** *J Immunol* 2003,170:2759-2764.
143. Nhacolo AQ, Nhalungo DA, Sacoor CN, Aponte JJ, Thompson R, Alonso P. **Levels and trends of demographic indices in southern rural Mozambique: evidence from demographic surveillance in Manhica district.** *BMC Public Health* 2006,6:291.
144. United Nations High Committee for Refugees. **Evaluation of UNHCR's Repatriation Operation to Mozambique.** *UNHCR Evaluation Reports* 1996.
145. Noya PA NI, Tojais H, Stakteas S, Foreit K, Vergara AE, Barreto A. **Antenatal Clinic National HIV Surveillance in Mozambique: Variation in prevalence underscores different epidemics in the country. Abstract no. WePeC6096.** In: *Int Conf AIDS*. Barcelona, Spain; 2002.
146. Conselho Nacional de Combate ao HIV S. **Relatório de actividades por 2005.** In: Maputo: Ministério de Saúde; 2006.
147. Blackard JT, Renjifo B, Fawzi W, Hertzmark E, Msamanga G, Mwakagile D, *et al.* **HIV-1 LTR subtype and perinatal transmission.** *Virology* 2001,287:261-265.
148. Renjifo B, Fawzi W, Mwakagile D, Hunter D, Msamanga G, Spiegelman D, *et al.* **Differences in perinatal transmission among human immunodeficiency virus type 1 genotypes.** *J Hum Virol* 2001,4:16-25.
149. Renjifo B, Gilbert P, Chaplin B, Msamanga G, Mwakagile D, Fawzi W, Essex M. **Preferential in-utero transmission of HIV-1 subtype C as compared to HIV-1 subtype A or D.** *AIDS* 2004,18:1629-1636.
150. Yang C, Li M, Newman RD, Shi YP, Ayisi J, van Eijk AM, *et al.* **Genetic diversity of HIV-1 in western Kenya: subtype-specific differences in mother-to-child transmission.** *AIDS* 2003,17:1667-1674.
151. Tapia N, Franco S, Puig-Basagoiti F, Menendez C, Alonso PL, Mshinda H, *et al.* **Influence of human immunodeficiency virus type 1 subtype on mother-to-child transmission.** *J Gen Virol* 2003,84:607-613.
152. Koulinska IN, Villamor E, Msamanga G, Fawzi W, Blackard J, Renjifo B, Essex M. **Risk of HIV-1 transmission by breastfeeding among mothers infected with recombinant and non-recombinant HIV-1 genotypes.** *Virus Res* 2006,120:191-198.
153. Uneke CJ. **Diagnosis of Plasmodium falciparum malaria in pregnancy in sub-Saharan Africa: the challenges and public health implications.** *Parasitol Res* 2008,102:333-342.

154. Semba RD, Gray GE. **Pathogenesis of anemia during human immunodeficiency virus infection.** *J Investig Med* 2001,49:225-239.
155. Tolentino K, Friedman JF. **An update on anemia in less developed countries.** *Am J Trop Med Hyg* 2007,77:44-51.
156. Menendez C, Castellsague X, Quinto L, Lloveras B, Klaustermeier J, Kornegay J, *et al.* **Prevalence and risk factors of sexually transmitted infections and cervical neoplasia in women from a rural area of Southern Mozambique.** *submitted* 2007.
157. Reisler RB, Thea DM, Pliner V, Green T, Lee F, Nesheim S, *et al.* **Early detection of reverse transcriptase activity in plasma of neonates infected with HIV-1: a comparative analysis with RNA-based and DNA-based testing using polymerase chain reaction.** *J Acquir Immune Defic Syndr* 2001,26:93-102.
158. Young NL, Shaffer N, Chaowanachan T, Chotpitayasunondh T, Vanparapar N, Mock PA, *et al.* **Early diagnosis of HIV-1-infected infants in Thailand using RNA and DNA PCR assays sensitive to non-B subtypes.** *J Acquir Immune Defic Syndr* 2000,24:401-407.
159. Murphy R, Peters V, Gill B, Dominguez K, Thomas P, Weedon J, *et al.* **Predictive value of HIV-1 DNA PCR in perinatally HIV-exposed infants born 1997-2002 in NYC.** In: *XVth International AIDS Conference.* Bangkok, Thailand; 2004.
160. Jourdain G, Mary JY, Coeur SL, Ngo-Giang-Huong N, Yuthavisuthi P, Limtrakul A, *et al.* **Risk factors for in utero or intrapartum mother-to-child transmission of human immunodeficiency virus type 1 in Thailand.** *J Infect Dis* 2007,196:1629-1636.
161. Magder LS, Mofenson L, Paul ME, Zorrilla CD, Blattner WA, Tuomala RE, *et al.* **Risk factors for in utero and intrapartum transmission of HIV.** *J Acquir Immune Defic Syndr* 2005,38:87-95.
162. Dunn DT, Brandt CD, Krivine A, Cassol SA, Roques P, Borkowsky W, *et al.* **The sensitivity of HIV-1 DNA polymerase chain reaction in the neonatal period and the relative contributions of intra-uterine and intra-partum transmission.** *AIDS* 1995,9:F7-11.
163. Read JS. **Diagnosis of HIV-1 infection in children younger than 18 months in the United States.** *Pediatrics* 2007,120:e1547-1562.
164. Mockenhaupt FP, Rong B, Till H, Eggelte TA, Beck S, Gyasi-Sarpong C, *et al.* **Submicroscopic Plasmodium falciparum infections in pregnancy in Ghana.** *Trop Med Int Health* 2000,5:167-173.
165. Chaisavaneeyakorn S, Moore JM, Otieno J, Chaiyaroj SC, Perkins DJ, Shi YP, *et al.* **Immunity to placental malaria. III. Impairment of interleukin(IL)-12, not IL-18, and interferon-inducible protein-10 responses in the placental intervillous blood of human immunodeficiency virus/malaria-coinfected women.** *J Infect Dis* 2002,185:127-131.
166. Moore JM, Ayisi J, Nahlen BL, Misore A, Lal AA, Udhayakumar V. **Immunity to placental malaria. II. Placental antigen-specific cytokine responses are impaired in human immunodeficiency virus-infected women.** *J Infect Dis* 2000,182:960-964.

167. Mills EJ, Wu P, Seely D, Guyatt GH. **Vitamin supplementation for prevention of mother-to-child transmission of HIV and pre-term delivery: a systematic review of randomized trial including more than 2800 women.** *AIDS Res Ther* 2005,2:4.
168. Wiysonge CS, Shey MS, Sterne J, Brocklehurst P, Read JS, Dhansay MA. **Vitamin A supplementation for reducing the risk of mother-to-child transmission of HIV infection: Cochrane systematic review.** *Int J Epidemiol* 2006,35:832-833.
169. Brentlinger PE, Dgedge M, Correia MA, Rojas AJ, Saute F, Gimbel-Sherr KH, *et al.* **Intermittent preventive treatment of malaria during pregnancy in central Mozambique.** *Bull World Health Organ* 2007,85:873-879.
170. Brentlinger PE, Behrens CB, Micek MA. **Challenges in the concurrent management of malaria and HIV in pregnancy in sub-Saharan Africa.** *Lancet Infect Dis* 2006,6:100-111.

