

AUMENTO DA REPLICAÇÃO DO VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA TIPO 1 INDUZIDA POR *NEISSERIA GONORRHOEAE* NA PRESENÇA DE LEUCÓCITOS POLIMORFONUCLEARES

ENHANCEMENT OF HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS TYPE 1 REPLICATION INDUCED BY *NEISSERIA GONORRHOEAE* IN PRESENCE OF POLYMORPHONUCLEAR LEUKOCYTES

Geraldo Duarte,^{1,2,5} Lisa A Cosentino,⁵ Phalguni Gupta,^{3,5}
Timothy A Mietzner,⁴ Daniel V Landers^{2,5}

RESUMO

Introdução: Estudos epidemiológicos têm demonstrado que a infecção genital por *Neisseria gonorrhoeae* (NG) é um fator de risco para aquisição e disseminação do vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1). Também existem evidências epidemiológicas de que a resposta inflamatória celular endocervical estaria diretamente associada a maiores percentuais de disseminação desse vírus. Entretanto, ainda não existem dados laboratoriais que possam sustentar esses achados epidemiológicos. **Objetivo:** Determinar a influência da NG, associada a leucócitos polimorfonucleares (PMN), sobre a replicação do HIV-1. **Métodos:** Para análise da replicação viral foram utilizadas células monocíticas pré-infectadas pelo HIV-1 (células U1, $1,4 \times 10^6$ células/mL). Para o ensaio bacteriano utilizou-se uma cepa de NG classificada como PorB3 serovar, *pili* e *Opa* positivas, na concentração de 2×10^8 bactérias/mL. O número de PMN utilizado em cada unidade de cultivo viral foi $1,4 \times 10^6$ PMN/mL, e o de NG foi de 2×10^8 NG/mL. As células U1 foram co-incubadas com NG e/ou em combinação com PMN e a replicação do HIV-1 foi determinada aferindo-se a produção do antígeno p24 recuperado no sobrenadante do cultivo viral, após 24, 48, 72 e 96 horas de incubação. Para a dosagem de p24 utilizou-se ensaio imunoenzimático (ELISA). A análise estatística foi realizada utilizando o método de "Tukey's hinges", considerando significativos aumentos de p24 superiores a 100%. **Resultados:** A co-incubação das células U1 com NG isoladamente na concentração de 2×10^8 bacterias/mL resultou em aumento da replicação do HIV-1 variando de 2,9 a 17,4 vezes ao longo do tempo de cultivo. Co-incubação dessas células com PMN resultou em aumento da replicação do HIV-1 de 2,7 a 26,3 vezes. Quando a NG e PMN foram associados às células U1, a replicação do HIV-1 variou de 24 a 133 vezes, exibindo sinergismo da NG e PMN nessa replicação. **Conclusão:** A NG (2×10^8 bactérias/mL), isoladamente ou em associação ao PMN, aumentou significativamente a replicação *in vitro* do HIV-1. Verificou-se também notável sinergismo entre NG e PMN sobre a replicação do HIV-1 até 72 horas de incubação, imitando o fenômeno da reação inflamatória que ocorre *in vivo* em pacientes portadores de infecção gonocócica.

Palavras-chave: replicação do HIV-1, *Neisseria gonorrhoeae*, leucócitos polimorfonucleares.

ABSTRACT

Introduction: Epidemiological studies have shown that *Neisseria gonorrhoeae* (NG) infection is a risk factor for sexual acquisition and dissemination of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1). There is evidence that endocervical inflammatory reaction are associated with the presence of polymorphonuclear leukocytes (PMN) in the lower female genital tract. Meanwhile, there is not laboratory data to support these epidemiological evidences. **Objective:** To determine the effects of NG alone and/or in conjunction with PMN, on HIV-1 replication *in vitro*. **Methods:** To study viral replication we used chronically HIV-1 infected monocytic cells (U1 cells, $1,4 \times 10^6$ cells/mL). Regarding the bacterial assay we used NG classified as PorB3 serovar, *pili* and *Opa* positive, in concentration of 2×10^8 bacteria/mL. The number of PMN used in this model was $1,4 \times 10^6$ PMN/mL and the number of NG was 2×10^8 bacteria/mL. The U1 cells were cocubated with NG alone and/or in combination with PMN, and the HIV-1 replication was determined by p24 antigen measurements at 24, 48, 72 and 96 hours. We used ELISA to measure p24 concentration. The statistical analysis was performed by Tukey's hinges method, considering the enhancements of p24 above 100% as a significant enhancement. **Results:** The cocubation of U1 cells with NG (2×10^8 bacteria/mL) markedly enhances p24 production in a *in vitro* model using. Cocubation of U1 cells enhanced HIV-1 replication from 2.9 to 17.4 fold, considering the whole time of the experiments. The U1 cells cocubated with PMN resulted in a 2.7 to 26.3 fold increase in HIV-1 replication. The cocubation of NG + PMN significantly enhanced replication of HIV-1, over and above the enhancement of NG or PMN alone until 72 hours. The enhancement was from 24 to 133 fold, suggesting the presence of synergism in that replication. **Conclusion:** The NG (2×10^8 bacteria/mL) alone or with PMN induced markedly enhancement on HIV-1 replication *in vitro*. Additionally, was verified significantly synergism between NG + PMN on the HIV-1 replication. This effect seems to reproduce the inflammatory reaction in patients with gonococcal infection.

Keywords: HIV-1 replication, *Neisseria gonorrhoeae*, polymorphonuclear leukocytes

ISSN: 0103-4065

DST - J bras Doenças Sex Transm 15(3):5-9, 2003

Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.¹ Departments of Obstetrics, Gynecology and Reproductive Sciences,² Infectious Diseases and Microbiology,³ Molecular Genetics and Biochemistry,⁴ of the University of Pittsburgh, and Magee-Womens Research Institute⁵

Trabalho foi financiado com Grants conjuntos do: National Institutes of Health Supplement to STD-CRC Cooperative Agreement (5 U19 AI38513) e Magee-Womens Research Institute. G.D. recebeu bolsa de Research Fellow da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (97/05813-5)

INTRODUÇÃO

Atualmente, a relação heterossexual é considerada a forma mais freqüente de transmissão do vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1) em todo o mundo.^{1,2} Paralelamente, existem evidências epidemiológicas de que certas situações clínicas, ligadas à prática heterossexual, poderiam atuar como co-fatores no incremento das taxas de infecção

pelo HIV-1, dentre elas sobressaindo as doenças sexualmente transmissíveis (DST).^{3,5} Se por um lado é lógico imaginar que as lesões ulcerativas genitais franqueiam a entrada do HIV-1 em locais que perderam a barreira superficial de proteção, não há como negar a reação inflamatória presente nas DST não ulcerativas como fatores facilitadores da infecção e disseminação desse vírus.^{3,6}

Existem convincentes evidências epidemiológicas da associação entre a infecção genital por *Neisseria gonorrhoeae* (NG) e incremento das taxas de soroconversão para o HIV-1 em inúmeros estudos.^{4,7} O RNA-HIV elevado, presumivelmente representando replicação viral ativa, tem sido achado na secreção genital de pessoas com infecção causada por NG.^{3,8} Também foi observada queda significativa da carga viral em secreção uretral após tratamento de uretrites causadas por esse microrganismo.⁹ Estudo realizado por Kassler et al. (1994)¹⁰ entre pessoas atendidas em clínicas de DST em Baltimore, concluíram que a gonorréia esteve associada a um risco cinco vezes maior de soroconversão contra o HIV-1.

A inflamação gonocócica da região endocervical (cervicite) tem sido associada a aumento da excreção viral no trato genital.^{11,12} Por sua vez, Levine et al. (1998)¹³ demonstraram que a infecção genital por NG associou-se ao aumento da presença endocervical de linfócitos CD4, células suscetíveis à infecção pelo HIV-1. Esses dois achados sugerem que vários mecanismos podem contribuir para o aumento do risco da transmissão do HIV-1 em presença da infecção por NG.

Em modelo experimental utilizando células monocíticas cronicamente infectadas pelo HIV-1 (UI células), Ho et al. (1995)¹⁴ demonstraram que os leucócitos polimorfonucleares (PMN) de doadores não-infectados, quando co-incubados com essas células, eram capazes de induzir aumento significativo na replicação viral, induzindo à formação de citocinas pró-inflamatórias capazes de elicitarem aumento da replicação *in vitro* do HIV-1.

OBJETIVO

O presente estudo foi realizado para testar a hipótese de que a NG pode aumentar a replicação *in vitro* do HIV-1, seja em incubação isolada ou em associação a PMN de doadores não-infectados.

MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pelo *Institutional Review Board of Human Investigations at Magee-Womens Hospital*.

Materiais e Reagentes. Os materiais e reagentes usados e as respectivas indústrias produtoras foram: Dulbecco's phosphate-buffered saline 1XW/O CaMg, Hanks Balanced Salt Solution (HBSS), RPMI 1640 com L-glutamine (Mediatech Cellgro, Herndon, VA); Fetal calf serum (FCS), Ficoll-hypaque (Sigma Chemical Co., Saint Louis, MO); Cloreto de sódio (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA); Dupont p24 kit (NEN Life Science Products, Boston, MA); Placa de cultura viral com 24 unidades de cultivo (Becton & Dickinson, Lincoln Park, NJ).

ISOLAMENTO CELULAR

Leucócitos Polimorfonucleares (PMN): Amostras de sangue venoso (60 mL) foram obtidas de 12 doadoras de sangue no *Magee-Womens Research Institute*. Todas as doadoras eram voluntárias, saudáveis e soronegativas para o HIV-1 e a coleta foi realizada usando tubos heparinizados. Os PMN foram separados utilizando sedimentação com dextran (3% dextran e 0,9% NaCl solution) e centrifugação por densidade em Ficoll-hypaque.¹⁵ As hemácias residuais foram removidas por lise hipotônica. Os PMN foram ressuspensos em meio RPMI 1640, com 10% FCS, numa concentração de $1-2 \times 10^6$ células por mL e incubados a 37°C, 5% CO₂ por 24 horas.

Células UI: Células monocíticas cronicamente infectadas pelo HIV-1 (UI)¹⁶, foram obtidas do *National Institute of Health-AIDS Research and Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH*. Essas células foram co-cultivadas em meio RPMI 1640 com 10% FCS, após descongelamento.

ENSAIOS BACTERIANOS

Seleção da cepa de *Neisseria gonorrhoeae*: Todas as cepas de NG foram obtidas através de doação do Dr. Timothy Mitzner. A cepa NG strain 106912, originalmente isolada de paciente com infecção do trato genital feminino, foi selecionada para estes experimentos por ser um isolado clínico relativamente recente, ter crescido bem em meios específicos para gonococo e suas colônias terem demonstrado a expressão de *pili* e *Opa*. A caracterização inicial dessa cepa de NG indicou que ela pertencia ao PorB3 serovar. Após confirmação desses fenótipos, amostras desses microrganismos foram alíquotadas e conservadas a -70°C para os experimentos descritos a seguir.

Preparação da *Neisseria gonorrhoeae*: Após descongelamento das alíquotas bacterianas à temperatura ambiente, elas foram semeadas em meio ágar NG e cultivadas por 18 horas. Após esse tempo de crescimento, confirmou-se a identificação microscópica de colônias expressando *pili* (P++) e características de opacidade (Opa++). As bactérias foram colhidas da placa de ágar e colocadas em 10mL de HBSS, procedendo-se a centrifugação para a retirada do excesso de ágar. O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* bacteriano ressuspensos novamente em HBSS, obtendo-se concentração correspondente à DO₆₀₀ de 0,6. O total de bactérias vivas adicionadas às unidades de cultivo da placa de cultura viral em cada ensaio foi quantificado tendo como base o número de unidades formadoras de colônias (UFC), sendo determinado no momento da inoculação. Neste projeto foi utilizada NG, correspondendo a 2×10^6 /mL em cada unidade de cultivo, por ser este o número médio de bactérias isoladas em pacientes com infecção gonocócica genital que apresentam sinais e sintomas da infecção.¹⁷

ENSAIOS

Ensaio de Replicação Viral em Células UI: Células UI ($1,4 \times 10^4$ /mL) foram co-cultivadas nas unidades de cultivo viral em meio RPMI 1640 contendo 10% FCS. Esse co-cultivo,

foi isolado ou na presença de *NG* (2×10^6 /mL), e/ou na presença de PMN ($1,4 \times 10^6$ /mL) de doadoras. Estas células foram incubadas a 37°C, 5% CO₂ em placa de cultura viral com 24 unidades de cultivo. As amostras de sobrenadante foram coletadas com 24, 48, 72 e 96 horas de cultivo, para posterior dosagem de p24.

ELISA HIV-1 p24: A quantidade de partículas do HIV-1 em cada unidade de cultivo foi aferida indiretamente dosando a p24 no sobrenadante, utilizando o *kit* comercial HIV-1 p24 ELISA (NEN Life Science Products). Sucintamente, os principais passos técnicos são descritos a seguir. Controles e amostras foram adicionados a uma placa de ELISA com 96 unidades de reação, recobertas com anticorpo monoclonal. Seguindo-se a distribuição dos controles e amostras, incubou-se a placa a 37°C por duas horas. Após este período, a placa foi lavada seis vezes, seguindo-se a adição de 100µL do anticorpo policlonal marcado, em cada unidade de reação e incubando-a por mais uma hora a 37°C. Após a lavagem da placa por seis vezes, foram adicionados 100µL do conjugado de streptavidina-HRP e incubação da placa por mais 30 minutos, agora em temperatura ambiente. Novamente lavou-se a placa por seis vezes, seguindo-se a adição de 100µL de um substrato para dar cor à reação (orto-fenilenodiamina). Após 30 minutos de incubação à temperatura ambiente, a reação foi interrompida com a adição de 100µL de ácido sulfúrico e a densidade óptica de cada unidade de reação foi determinada em espectrofotômetro. Os controles, de concentrações conhecidas, foram usados para geração de uma curva, possibilitando quantificar os valores das amostras. Todas as densidades ópticas maiores que 4,3 pg/mL foram diluídas e testadas novamente.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

As diferenças de replicação do HIV-1 foram baseadas no aumento da p24 determinada em cada ponto aferido, comparando com a quantidade de p24 nas unidades de cultivo contendo apenas as células U1:

$$\text{Aumento da p24} = \frac{\text{Concentração de p24 na presença de NG e/ou PMN}}{\text{Concentração de p24 produzida por células U1 sem nenhum estímulo}}$$

Desde que a produção de p24 neste modelo experimental não apresentou uma distribuição normal, a média dos aumentos na produção dessa proteína foi calculada segundo a distribuição de *Tukey's hinge*, considerando os resultados situados entre o 25° e 75° percentil de toda a amostra.^{18,19} Aumentos de mais de duas vezes os valores verificados nas células U1 foram considerados significativos por esse método.

RESULTADOS

A presença de *NG* isolada ou em associação ao PMN aumentou a replicação viral nas células U1, traduzida no aumento da concentração da p24 no sobrenadante das unidades de cultivo viral, já identificado a partir de 24 horas de incubação. Na **Tabela 1** estão distribuídos os valores de p24 (em pg/mL) ao longo do período dos experimentos, veri-

cando-se aumentos significativos de sua produção em todos os tempos dos experimentos. Apesar de haver aumento progressivo da produção de p24 ao longo do tempo dos experimentos, a concentração relativa (comparando a concentração da p24 produzida sob ação da *NG* isoladamente ou em associação ao PMN, com a produção do sistema contendo apenas as células U1) foi mais acentuada no tempo de 48 horas.

Na **Figura 1** estão representados os aumentos relativos da produção de p24 em todas as situações contempladas neste modelo experimental em forma de mediana e com a variação de *Tukey's hinges* (TH), considerando os percentis 25 e 75. A mediana do aumento da produção da p24 na presença de células U1 e da *NG* (2×10^6 bactérias/mL), foi de 2,9 (TH: 2,3-3,5) com 24 horas; de 17,4 (TH: 13,9-20,9) com 48 horas; de 16,4 (TH: 10,8-22,0) com 72 horas; e de 16 (TH: 12,4-19,5) com 96 horas. Para os experimentos que avaliaram a ação isolada do PMN na replicação do HIV-1 (aumento da produção de p24), os resultados foram de 2,7 (TH: 2,2-3,2) com 24 horas; de 26,3 (TH: 13,7-38,9) com 48 horas; de 22,0 (TH: 20,6-25,5) com 72 horas; e de 18,4 (TH: 17,3-19,5) com 96 horas. Associando *NG* com PMN, o aumento da p24 foi de 37 (TH: 22,5-52,5) com 24 horas; de 133 (TH: 85,5-181,0) com 48 horas; de 69 (TH: 58,9-79,2) com 72 horas; e de 24 (TH: 23,5-24,7) com 96 horas.

Observou-se que, com a associação *NG* + PMN, o sistema de replicação do HIV-1 foi ativado em sua capacidade máxima em períodos precoces do experimento, perdendo essa capacidade ao longo do tempo, principalmente os experimentos com PMN.

Tabela 1 - Concentrações de p24 (pg/mL) e percentis (25° e 75°), verificados em modelo experimental na presença de células U1, *Neisseria gonorrhoeae* (2×10^6 bactérias/mL) e polimorfonucleares (PMN) durante 96 horas de incubação.

	24 HORAS p24 (25° e 75° %)	48 HORAS p24 (25° e 75° %)	72 HORAS p24 (25° e 75° %)	96 HORAS p24 (25° e 75° %)
U1	1,0 (0,6-1,3)	2,2 (1,5-2,9)	18,1 (15,4-23,5)	66,2 (49,5-72,3)
U1+NG	2,9 (2,3-3,2)	38,3 (28,7-47,9)	313,1 (234,8-391,4)	1.059,2 (794,4-1.324,0)
U1+PMN	2,7 (2,2-3,3)	57,8 (43,4-72,2)	420,2 (315,1-525,3)	1.217,9 (913,5-1.522,3)
U1+NG+PMN	37,0 (27,7-46,6)	292,6 (219,4-365,8)	1.317,9 (988,4-1.647,4)	1.588,8 (1.191,5-1.986,1)

DISCUSSÃO

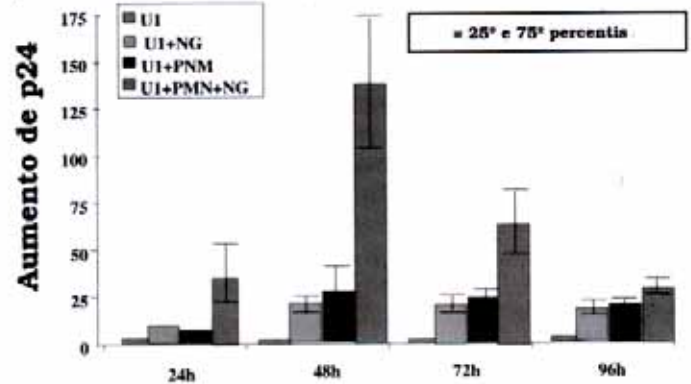
A endocervicite causada por *NG* decorre da infecção do epitélio colunar por esse microrganismo. Como resposta a essa infecção observa-se intenso infiltrado de leucócitos polimorfonucleares tanto na submucosa quanto no muco endocervical que se exterioriza através da vagina. Segundo dados da literatura, a presença de PMN no conteúdo vaginal ocorre em praticamente todas as mulheres com endocervicite gonocócica e estaria relacionada com a elevada taxa de soroc conversão para o HIV-1. No entanto, ainda não existe comprovação laboratorial para esses achados epidemiológicos até o momento.

No presente estudo foi utilizado um modelo *in vitro* de replicação do HIV-1 para avaliar a influência da NG, isolada ou associada a leucócitos polimorfonucleares (PMN), sobre a replicação do HIV-1. Com este mesmo modelo, já confirmamos o efeito da *Chlamydia trachomatis* sorotipo "D" no aumento da replicação do HIV. Surpreendentemente, constatou-se que também a NG isolada acelerou significativamente a replicação viral *in vitro*, sugerindo que esse aumento da replicação do HIV-1 possa estar relacionado com o incremento das taxas de soroconversão contra esse vírus em pacientes portadores de gonorréia. Para a concentração de NG de 2×10^6 bactérias/mL, a resposta máxima ocorreu logo com 48 horas de incubação, traduzindo intensa ativação do sistema e, conseqüentemente, replicação viral. Visto que o número médio de bactérias isoladas em secreções genitais de pacientes portadores de gonorréia é de 2×10^6 bactérias/mL, é tentadora a idéia de associar quadros clínicos de maior expressão a um maior número de bactérias no sítio infeccioso, conseqüentemente, maior predisposição para disseminar o HIV-1.

O aumento da replicação do HIV-1 em resposta à presença da NG no sistema de cultura viral ainda não havia sido descrito na literatura. Estes resultados demandam estudos específicos no sentido de avaliar se estes são efeitos diretos da NG ou de seus produtos metabólicos sobre a replicação viral em células monocíticas previamente infectadas. Torna-se necessário determinar se é um efeito espécie-específico ou dependente de características fenotípicas como a expressão de *pili* ou *Opa* ou até mesmo de outras proteínas estruturais da NG. Estudos com inibição de citocinas comumente associadas à replicação do HIV-1 (TNF- α e IL-6) poderiam determinar a dependência dessas citocinas nesse processo de replicação induzida pela NG. Apesar de Hedges *et al.* (1998)²² não terem considerado que a presença de β -citocinas (MIP-1 α , MIP-1 β e RANTES) seja um achado proeminente nas infecções gonocócicas do trato genital feminino, elas possuem propriedades que podem explicar o aumento da replicação do HIV-1 induzido pela presença de NG.

Neste estudo também foi demonstrado que a presença isolada de PMN de doadores não-infectados aumenta as taxas de replicação do HIV-1 *in vitro*, confirmando os achados de Ho *et al.* (1995)¹⁴. Para esses autores, os efeitos da presença de PMN induzindo a replicação do HIV-1 são mediados pela liberação de TNF- α e IL-6. Quando se associou NG ao PMN na unidade de cultivo junto com células U1, observou-se notável efeito sinérgico sobre a replicação do HIV-1. Com essa associação, objetivou-se mimetizar o que realmente ocorre na prática clínica, visto que a presença de PMN na submucosa endocervical e secreção genital de pacientes com gonorréia é uma constante. Na realidade, esta parte do experimento é a que mais se aproxima do que ocorre *in vivo* e, infelizmente, a que mais efetivamente ativou o sistema de replicação do HIV-1. Junto com a migração de PMN ao sítio da infecção gonocócica ocorre também a migração de linfócitos, células suscetíveis à infecção pelo HIV-1 ou contendo o vírus, caso a paciente já esteja infectada. Mesmo considerando todas as limitações e riscos de uma transposição de achados experimentais *in vitro* para uma situação clínica, os resultados aqui obtidos indicam a possibilidade de redução da disseminação do HIV-1 adotando medidas simples como o controle da infecção gonocócica.

Figura 1 - Aumento relativo da produção de p24 pelas células U1, em presença de *Neisseria gonorrhoeae* (2×10^6 bactérias/mL) e em presença de leucócitos polimorfonucleares (PMN).



CONCLUSÃO

Estes resultados dão sustentação aos achados epidemiológicos do aumento da disseminação desse vírus entre mulheres com infecção gonocócica genital, fornecendo subsídios de caráter experimental que embasam cientificamente os programas de controle da infecção HIV-1, dando maior peso às iniciativas que buscam financiamento para esses programas de intervenção.²³ A utilização de medidas mais simples para o controle da epidemia HIV-1 (como o controle da infecção gonocócica genital) faz parte dos objetivos universais da Organização Mundial da Saúde para controle dessa virose, ajudando pessoas tanto de países industrializados quanto daqueles ainda em desenvolvimento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. JOINT UNITED NATIONS PROGRAMME ON HIV/AIDS (UNAIDS) AND WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). AIDS Epidemic Update. UNAIDS/02.46E, December 2002.
2. BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. *Boletim Epidemiológico-AIDS*, 15(1): 1-57, 2002.
3. PADIAN NS, SHIBOSKI SC, GLASS SO, VITTINGHOFF E. Heterosexual transmission of human immunodeficiency virus in northern California: results from a ten-year study. *Am J Epidemiol* 146:350-357, 1997.
4. PLUMMER FA, SIMONSEN JN, CAMERON DW, ET AL. Cofactors in male-to-female transmission of human immunodeficiency virus type-1. *J Infect Dis* 163:233-239, 1991.
5. BECK EJ, MANDALIA S, LEONARD K, ET AL. Case-control study of sexually transmitted diseases as cofactors for HIV-1 transmission. *Int J STD & AIDS* 1996; 7:34-38.
6. ROBINSON NJ, MULDER DW, AUVERT B, HAYES RJ. Proportion of HIV infections attributable to other sexually transmitted diseases in a rural Ugandan population: simulation model estimates. *Int J Epidemiol* 1997; 26:180-189.
7. LAGA M, MANOKA M, KIVUVU B, ET AL. Non-ulcer sexually transmitted diseases as risk factors for HIV-1 transmission in women: results from a cohort study. *AIDS*, 7:95-102, 1993.
8. COHEN MS, HOFFMAN IF, ROYCE RA, ET AL. Reduction of concentration of HIV-1 in semen after treatment of urethritis: implications for prevention of sexual transmission of HIV-1. *Lancet*, 349:1868-1873, 1997.
9. WEIR SS, FELDBLUM PJ, RODDY RE, ZEKENG L. Gonorrhea as a risk factor for HIV acquisition. *AIDS*, 8:1605-1608, 1994.
10. KASSLER WJ, ZENILMAN JM, ERICKSON B, ET AL. Seroconversion in patients attending sexually transmitted disease clinics. *AIDS*, 8:351-355, 1994.
11. KREISS J, WILLERFORD DM, HENSEL M, ET AL. Association between cervical inflammation and cervical shedding of human immunodeficiency virus DNA. *J Infect Dis* 170:1597-1601, 1994.
12. CLEMETSON DB, MOSS GB, WILLERFORD DM, ET AL. Detection of HIV-DNA in cervical and vaginal secretions. Prevalence and correlates among women in Nairobi, Kenya. *JAMA* 269:2860-2864, 1993.

13. LEVINE WC, POPE V, BHOOMKAR A, ET AL. Increase in endocervical CD4 lymphocytes among women with nonulcerative sexually transmitted diseases. *J Infect Dis* 177:167-174, 1998.
14. HO JL, HE S, HU A ET AL. Neutrophils from human immunodeficiency virus (HIV) seronegative donors induce HIV replication from HIV-infected patients' mononuclear cells and cell lines: An *in vitro* model of HIV transmission facilitated by *Chlamydia trachomatis*. *J Exp Med* 181:1493-1505, 1995.
15. COLIGAN JE, KRUISBEECK AM, MARGULIES DH, SHEVACH EM, STROBER W. Preparation and functional analysis of human non lymphoid cells. In: COLIGAN JE, KRUISBEECK AM, MARGULIES DH, SHEVACH EM, STROBER W, eds. *Current Protocols in Immunology*. New York: Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience 7.23.1-7.23.3, 1992.
16. FOLKS TM, JUSTEMENT J, KINTER A, DINARELLO CA, FAUCI AS. Cytokine-induced expression of HIV-1 in a chronically infected promonocyte cell line. *Science* 238:800-802, 1987.
17. MIETZNER TA, COHEN MS. Vaccines against gonococcal infection. In: LEVINE MM, KAPER J, et al, eds. *The Molecular Approach to new and improved vaccines*. New York: Marcel Dekker, 817-841, 1997.
18. MOSTELLER F, TUKEY JW. Displays and summaries for batches. In: *Data Analysis and Regression: A second Course in Statistics*. Mosteller F, Tukey JW, editors. Addison- Wesley Publishing Co, Reading, MA, 43-77, 1977.
19. FISHER LD, VAN BELLE G. Nonparametric, distribution-free and permutation models: robust procedures. In: *Biostatistics: A methodology for the Health Sciences*. John Willey and Sons. Fisher LD, van Belle G, editors. John Willey and Sons, New York, NY, 304-344, 1993.
20. DUARTE G, COSENTINO LA, MONCADA J, KROHN M, GUPTA P, SCHACHTER J, LANDERS DV. Aspectos biomoleculares da interação entre *Chlamydia trachomatis* e polimorfonucleares na replicação do HIV. *Anais do IIIº Congresso da Sociedade Brasileira de Doenças Sexualmente Transmissíveis (DST in Fortaleza)*. Fortaleza-Ceará, 2000, *DST-J bras Doenças Sex Transm*, 12(5):76, 2000.
21. FLEMING DT, WASSERHEIT JN. From epidemiological synergy to public health policy and practice: the contribution of other sexually transmitted diseases to sexual transmission of HIV infection. *Sex Transm Dis* 75:3-17, 1999.
22. HEDGES SR, SIBLEY DA, MAYO MS, HOOK EW, RUSSEL MW. Cytokine and antibody responses in women infected with *Neisseria gonorrhoeae*: effects of concomitant infections. *J Infect Dis* 78:742-751, 1998.
23. LANDERS DV, DUARTE G. HIV interactions with other sexually transmitted diseases. In: MEAD PM, HAGER WD, FARO S. (Editors), *Protocols for Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology*, 2nd edition. Blackwell Science, Malden-Massachusetts, p. 298-307, 2000.

Endereço para Correspondência:**GERALDO DUARTE**

Departamento de Ginecologia e Obstetrícia e Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo - Avenida Bandeirantes, 3900
14049-900, Ribeirão Preto, São Paulo
e-mail: gduarte@fmrp.usp.br

Recebido em: 10/08/03.

Aprovado em: 02/09/03.

É preciso assumir o desafio de **ELIMINAR**
a **SÍFILIS CONGÊNITA** até 2010.

Nós da SBDST já assumimos esse compromisso.

E VOCÊ?

www.uff.br/dst/www.dstbrasil.org.br