



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL**

**KLEDOALDO OLIVEIRA DE LIMA**

**Características filogenéticas, epidemiológicas, laboratoriais e evolutivas dos  
subtipos B e não-B do HIV-1 em Pernambuco – Nordeste do Brasil**

**Recife / PE**

**2015**

**KLEDOALDO OLIVEIRA DE LIMA**

**Características filogenéticas, epidemiológicas, laboratoriais e evolutivas dos subtipos B e não-B do HIV-1 em Pernambuco – Nordeste do Brasil**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Medicina Tropical, área: Doenças Infecciosas e Parasitárias.

**ORIENTADORA: Profa. Dra. Heloísa Ramos Lacerda de Melo.**

**CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Élcio de Souza Leal.**

**Recife / PE**

**2015**

Ficha catalográfica elaborada pela  
Bibliotecária: Liliane Baltar, CRB4-506

L732c Lima, Kleodoaldo Oliveira de.  
Características filogenéticas, epidemiológicas, laboratoriais e evolutivas dos subtipos B e não-B do HIV-1 em Pernambuco – Nordeste do Brasil / Kleodoaldo Oliveira de Lima. – Recife: O autor, 2015.  
196 f.: il. tab., fig. quadros; 30 cm.

Orientadora: Heloisa Ramos Lacerda de Melo.  
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS.  
Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2015.  
Inclui referências, apêndices e anexos.

1. HIV-1. 2. Epidemiologia molecular. 3. Resistência. I. Melo, Heloisa Ramos Lacerda de (Orientadora). II. Título.

618.9883            CDD (23.ed.)            UFPE (CCS2015-149)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE)  
PRÓ-REITORIA PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO (PROPESQ)  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE (CCS)  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL (PPGMEDTROP)

**RELATÓRIO DA BANCA EXAMINADORA DA TESE DO DOUTORANDO**

**KLEDOALDO OLIVEIRA DE LIMA**

No dia 30 de março de 2015, às 13h00, na Sala Prof. Murillo La Greca - no 3º. and. do CCS/UFPE, os Membros Doutores: a Profa. Dra. Vera Magalhães da Silveira (Presidente da Banca - UFPE), a Profa. Dra. Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho (UFPE), a Profa. Dra. Ana Maria de Brito (CPqAM/FIOCRUZ), a Profa. Dra. Ana Catarina de Souza Lopes (UFPE) e a Pesquisadora Dra. Ana Maria Salustiano Cavalcanti (SES/PE), componentes da Banca Examinadora, em sessão pública, arguíram o doutorando KLEDOALDO OLIVEIRA DE LIMA sobre a sua Tese intitulada “CARACTERÍSTICAS FILOGENÉTICAS, EPIDEMIOLÓGICAS, LABORATORIAIS E EVOLUTIVAS DOS SUBTIPOS B E NÃO-B DO HIV-1 EM PERNAMBUCO – NORDESTE DO BRASIL”, a qual foi orientada pela Profa. Dra. Heloísa Ramos Lacerda de Melo (UFPE) e co-orientada pelo Prof. Dr. Élcio de Souza Leal (UFPA). Ao final da arguição de cada membro da Banca Examinadora e resposta do doutorando, as seguintes menções foram publicamente fornecidas.

Profa. Dra. Vera Magalhães da Silveira

APROVADO

Profa. Dra. Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho

APPROVADO

Profa. Dra. Ana Maria de Brito

APPROVADO

Profa. Dra. Ana Catarina de Souza Lopes

Aprovado

Pesquisadora Dra. Ana Maria Salustiano Cavalcanti

APPROVADO

---

Profa. Dra. Vera Magalhães da Silveira

---

Profa. Dra. Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho

---

Profa. Dra. Ana Maria de Brito

---

Profa. Dra. Ana Catarina de Souza Lopes

---

Pesquisadora Dra. Ana Maria Salustiano Cavalcanti



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL**

**REITOR**

Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

**PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**

Francisco de Sousa Ramos

**DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**

Nicodemos Teles de Pontes Filho

**COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
MEDICINA TROPICAL**

Valdênia Maria Oliveira de Souza

**VICE-COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
MEDICINA TROPICAL**

Vera Magalhães da Silveira

**CORPO DOCENTE PERMANENTE**

Ana Catarina de Souza Lopes

Ana Lúcia Coutinho Domingues

Célia Maria M. Barbosa de Castro

Edmundo Pessoa de A. Lopes Neto

Fábio André dos Santos Brayner

Heloísa Ramos Lacerda de Melo

Maria Amélia Vieira Maciel

Maria Rosângela C.D. Côelho

Marli Tenório Cordeiro

Ricardo Arraes de A. Ximenes

Valdênia Maria de O. Souza

Vlaúdia Maria Assis Costa

Vera Magalhães de Silveira

**CORPO DOCENTE COLABORADOR**

Maria de Fátima P. Militão de Albuquerque e Rejane Pereira Neves

Ao homem que, desde minha infância, encheu-me de livros e enciclopédias, despertando em mim o interesse pela ciência. Que na adolescência, deu-me o livro “Inteligência Emocional, do Daniel Goleman”, e mais uma vez surpreendendo-me com sua sensibilidade ímpar e seu ato de estimular por palavras ou pela escrita. Ao meu pai, Eduardo Sebastião de Lima, devo a curiosidade, sensibilidade e a paixão pela leitura. A ele e a minha mãe, Maria Auta Oliveira de Lima, um muito obrigado pela dedicação ao cuidar e ao educar, pelos ensinamentos em valorizar tudo o que é sagrado, incluindo os estudos.

Ao Professor Élcio do Souza Leal. Um orientador, mestre e, principalmente, um amigo para toda a vida...

## AGRADECIMENTOS

Ao dom de gostar de estudar, ao prazer de adquirir conhecimento, que só pode ser divino, um presente de Deus...

A mim, pela paciência, dedicação, amor aos estudos e à ciência. Principalmente, por ter aprendido a desprender-se de algumas coisas e a agarrar-se a outras bases estruturais no tempo certo.

À minha família: Eduardo Sebastião de Lima e Maria Auta Oliveira de Lima (pais), Keliane Oliveira de Lima e Kleybson Eduardo Oliveira de Lima (irmãos), pela força, apoio, fé, entusiasmo e principalmente, pelo amor incondicional dedicado a mim nesta jornada.

A meus orientadores, Heloísa Ramos Lacerda (UFPE) e Élcio de Souza Leal (UFPA), pela orientação científica neste trabalho, pela amizade, pelas belas palavras de estímulo, pelos elogios, pela boa vontade de me acolher como aluno, pelos belos e sagrados ensinamentos e por me ensinar a fazer ciência com ética, entusiasmo e dedicação.

Às Doutoras Ana Salustiano e Luzidalva Medeiros por permitirem trabalhar com as sequências *pol* do HIV-1 derivados de suas teses de doutorado e desta forma, em conjunto, fazermos mais um trabalho de relevância para nosso estado de Pernambuco e para nossa região Nordeste.

À Daniela Salustiano, uma grande amiga, uma irmã que adquiri nesses anos de aprendizado acadêmico. Obrigado pela ajuda em alguns ensaios sorológicos da tese e pelas várias discussões teóricas que tivemos sobre a mesma.

A Ullisses Montarroyos, pela colaboração nas análises estatísticas da tese. Obrigado pela atenção e paciência!

Aos Doutores José Carlos Couto-Fernandez, Ana Salustiano e Marli Tenório, por fazerem parte da minha banca de qualificação do projeto de tese. Obrigado pela leitura crítica e pelos aconselhamentos metodológicos e teóricos, suas contribuições foram maravilhosas. Obrigado pela disponibilidade em ajudar.

Aos professores da Pós-graduação em Medicina Tropical da Universidade Federal de Pernambuco, especialmente ao professor Dr. Ricardo Ximenes pela revisão crítica de alguns itens do projeto de tese, e à professora Dra. Maria Rosângela Côelho, por sempre me incentivar na carreira acadêmica, desde a graduação, e por ter me acolhido tão bem no mestrado e doutorado.

Aos colegas de doutorado, especialmente Caroll Araújo, Glaydes Lima, Ana Lúcia e Ana Paula, pelo coleguismo, cumplicidade, momentos de descontração, alegria, e principalmente pela amizade.

Ao funcionário da Pós-graduação em Medicina Tropical, Wálter Galdino, pelo apoio, gentileza e disponibilidade em todas as tarefas que lhe foram pedidas.

A todos os pacientes que, indiretamente, contribuíram para a concretização desta tese. Apesar de se encontrarem em um momento de fragilidade em vossas vidas, não hesitaram em colaborar com a ciência.

Aos futuros leitores desta tese ou dos artigos derivados dela. Espero que além de estudiosos sejam disseminadores da ciência.

“Mesmo que você não vá até o fim, terá encontrado algo...”

(Kimani Maruge – 84 anos – Quênia: Pessoa mais velha do mundo a entrar numa sala de aula para alfabetização)

## RESUMO

Uma grande heterogeneidade da epidemia pelo HIV-1 é observada no Brasil, onde prevalecem os subtipos B, F1 e C e os recombinantes BF e BC. O objetivo principal deste estudo foi caracterizar as cepas do HIV-1 circulantes no estado de Pernambuco, Nordeste do Brasil, através de análises filogenéticas, avaliando-se as características sociodemográficas, laboratoriais e evolutivas entre os subtipos B e não-B. As sequências da região *pol* do HIV-1, que totalizaram 169 amostras, foram obtidas de dois estudos anteriores. Todos os pacientes eram maiores de 18 anos e virgens de terapia antirretroviral. O Alinhamento e a edição manual das sequências foram realizados pelo CLUSTAL X e BioEdit software, respectivamente. Para as inferências filogenéticas e de recombinação gênica foram utilizados os softwares MEGA 5 e SIMPLOT, respectivamente. Pesquisas sorológicas para determinação das co-infecções foram realizadas para os seguintes agentes infecciosos: HBV, HCV, HTLV e sífilis, pelo método de quimiluminescência. Na região analisada (*pol*), os resultados mostraram uma grande frequência do subtipo F do HIV-1 (31.4%) e a circulação de uma cepa H e AG. As frequências dos subtipos B e C foram 60.9% e 1.2%, respectivamente. Foram identificados um recombinante BC e 8 recombinantes BF (4.7%), com estruturas genômicas diferenciadas. Co-infecção HIV-HBV foi mais frequente entre homens que fazem sexo com homens (HSH) portadores do subtipo B do HIV-1, enquanto que co-infecção HIV-sífilis foi associado a HSH com subtipos não-B. O subtipo B foi associado ao sexo masculino, a uma maior carga vira, maior escolaridade e menor contagem de células T CD4+. Houve uma baixa frequência de mutações de resistência transmitidas (2.96%). Códon sob pressão seletiva positiva são mais frequentes em contagem de células T CD4+  $\geq$  200 e em mulheres heterossexuais. Nossos resultados demonstram que a epidemia do HIV-1 em Pernambuco se caracteriza por uma alta proporção de subtipos não-B circulantes, o que revela a importância no monitoramento e melhor conhecimento do papel destas variantes na epidemia, no tratamento antirretroviral, formulação de vacinas, progressão à doença e transmissibilidade.

Palavras-chave: HIV-1; Epidemiologia Molecular; Resistência.

## ABSTRACT

A great heterogeneity of HIV-1 epidemic is observed in Brazil, where subtypes B, F1 and C and recombinant forms BF prevails and BC. The aim of study was to characterize HIV-1 strains circulating in the state of Pernambuco, northeastern Brazil, through phylogenetic analysis, evaluating also the socio-demographic, laboratory and evolutionary characteristics between subtypes B and non-B. The sequences with *pol* region of HIV-1, totaling 169 samples were obtained from two previous studies. All patients were over 18 year old and antiretroviral naïve therapy. The alignment and manual editing of the sequences were performed by CLUSTAL X and BioEdit software, respectively. For the phylogenetic and genetic recombination inferences were used MEGA 5 and SIMPLOT software, respectively. Serological assays of co-infections were performed for the following infectious agents: HBV, HCV, HTLV, and syphilis by chemiluminescence. In the analyzed region (*pol*), the results showed a high frequency of the HIV-1 subtype F (31.4%) and a strain H and AG. The frequency of the subtypes B and C were 60.9% and 1.2%, respectively. They identified a recombinant BC and eight BF recombinant (4.7%) with different genomic structures. Co-infection HIV-HBV was more frequent among men who have sex with men (MSM) with HIV-1 subtype B, while co-infection HIV-syphilis was associated with MSM with subtypes non-B. The subtype B was associated with male gender, higher viral load, higher education and lower T cells count. There was a low frequency of transmitted resistance mutations (2.96%). Codons under positive selection pressure are more common in T cells count  $\geq 200$  and heterosexual women. Our results demonstrate that the HIV-1 epidemic in Pernambuco is characterized by a high proportion of circulating non-B subtypes, which shows the importance of monitoring and better understanding of the role of these variants in epidemic in antiretroviral therapy, vaccine formulation, disease progression and transmissibility.

Keywords: HIV-1; Molecular Epidemiology; Drug Resistance, Viral.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Mapa genético do HIV-1.....	25
Figura 2 – Processo de recombinação genética envolvendo duas variantes do HIV-1.....	28
Figura 3 – Distribuição global dos diferentes subtipos e formas recombinantes do HIV-1 no mundo em dois períodos distintos.....	32
Figura 4 - Distribuição mundial dos subtipos e formas recombinantes do HIV-1 em dois períodos distintos, A: Período de 2000-2003; B: Período de 2004-2007.....	33
Figura 5 – Estimativa mundial, em números absolutos de adultos e crianças, vivendo com HIV – 2013.....	34
Figura 6 - Estimativa mundial do número de crianças e adultos infectados recentemente pelo HIV – 2013.....	35
Figura 7 – Taxa de detecção de aids por região de residência e ano de diagnóstico, Brasil, 2003 – 2012.....	36
Figura 8 – Disseminação do HIV-1 C nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste do Brasil.....	41
Figura 9 – Árvore filogenética inferida a partir do gene <i>pol</i> do HIV-1 F.....	50
Figura 10 - Comparação das estruturas em mosaicos genéticos das CRF_BF existentes no mundo. Não há a estrutura em mosaico da CRF42_BF no LOS ALAMOS HIV Database.....	52
Figura 11 – Distribuição geográfica dos subtipos do HIV-1 na Região Nordeste – Brasil. Em vermelho estão destacados os subtipos de maior prevalência.....	64

Figura 12 – Distribuição dos subtipos do HIV-1, entre 561 pacientes em falha terapêutica, em seis estados da região Nordeste (Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco e Alagoas).....66

Figura 13 – **Inferência filogenética do subtipo B do HIV-1 de cepas do estado de Pernambuco, Nordeste do Brasil.** O alinhamento final continha 894bp, composto por sequências de referência e 103 sequências da pesquisa do qual foram excluídas as mutações de resistência. A estrutura da árvore foi determinada através da análise de maximum likelihood implementada no MEGA 5, com replicatas de 1000 bootstrap e demonstrada como um cladograma. Os clusters realçados em azul possuem suporte bootstrap  $\geq 70$ . Oito clusters filogenéticos das cepas estudadas são visualizadas. Cepa 08PE144, em vermelho, mostra-se clusterizando com sequências do Caribe e cluster filogenético com as identificações das sequências marcadas em azul correspondem a amostras com co-infecção HBV-HIV.....86

Figura 14 –**Filogenia das 53 cepas do HIV-1 subtipo F, região da polimerase. Nordeste do Brasil.** Alinhamento com comprimento de 915bp, excluindo-se as mutações de resistência. Foram utilizadas sequências de referência obtidas do Los Alamos em conjunto com as amostras da pesquisa. A topologia da árvore foi inferida utilizando a metodologia de maximum likelihood implementada no MEGA 5, com replicatas de 1000 bootstrap. A escala em barra indica o número de substituições nucleotídicas por sítio. Sub-cluster F1 da América do Sul é demonstrado em amarelo e o sub-cluster com cepas F1 de outras origens geográficas, em vermelho.....88

Figura 15 – **Inferência filogenética dos subtipos C identificados.** (a) Alinhamento com comprimento de 918bp, composto de sequências de referência, incluindo subtipo C de várias regiões geográficas e cepas 31\_BC, juntamente com as sequências do estudo. Relações evolutivas determinadas pelo método de maximum likelihood (MEGA 5), com replicatas de 1000 bootstrap, cujos valores acima de 70 são mostrados. A escala em barra indica o número de substituições nucleotídicas por sítio. (b) Análise bootscan realizada no SIMPLOT software, demonstrando ponto de recombinação na cepa 09PE181. Linha azul corresponde a regiões genômicas relacionadas ao subtipo C e a verde, ao subtipo B do HIV-1.....90

**Figura 16 – Raros subtipos do HIV-1 identificados em Pernambuco, Nordeste do Brasil.** A topologia das árvores filogenéticas foram determinadas por maximum likelihood (MEGA 5), com 1000 replicatas de bootstrap. Apenas valores  $\geq 70$  de bootstrap foram demonstrados. Os alinhamentos tinham 918bp de comprimento, englobando cepas de referência e as duas cepas da pesquisa: 08PE056 e 07PE009. (a) Identificação de uma URF AG, com padrão indeterminado de recombinação avaliado pelos vários métodos empregados. (b) Relato da circulação de uma cepa H.....92

**Figura 17 – Identificação de recombinantes BF.** (a) Árvore filogenética inferida por maximum likelihood (MEGA5), com replicatas de 1000 bootstrap, constando de sequências de referência dos diversos subtipos e CRFs BF, juntamente com as sequências da pesquisa. O alinhamento continha 915bp. Apenas valores  $\geq 70$  de bootstrap foram demonstrados e a escala em barra indica o número de substituições nucleotídicas por sítio. (b) Análise de bootscannig realizada pelo SIMPLOT software demonstrando os diversos padrões de mosaicos entre as URFs BF analisadas.....95

## LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1 – Variáveis sociodemográficas.....	71
Quadro 2 – Variáveis laboratoriais.....	73
Tabela 1 – Estimativas do tempo de ancestral comum mais recente (TMRCA) para sequências do HIV-1 F oriundas de várias regiões do mundo.....	47
Tabela 2 – Frequência dos subtipos do HIV-1 na Região Nordeste – Brasil e características dos estudos analisados.....	62
Tabela 3 – Características da população do estudo, constituída de indivíduos HIV-positivos com amostras coletadas nos períodos de 2002-2003 e 2007-2009 em Pernambuco, Nordeste – Brasil.....	84
Tabela 4 – Avaliação temporal da proporção relativa do HIV-1 B e F nos períodos de 2002/2003 e 2007-2009.....	97
Tabela 5 - Identificação de códons sob pressão seletiva no gene <i>pol</i> dos subtipos B e F do HIV-1.....	98
Tabela 6 – Associação das características sociodemográficas e laboratoriais entre os subtipos B e não-B do HIV-1.....	100
Tabela 7 - Características dos indivíduos co-infectados HIV-HBV nos subtipos B e não-B do HIV-1.....	103
Tabela 8 - Características dos indivíduos co-infectados HIV-sífilis nos subtipos B e não-B do HIV-1.....	103
Tabela 9 - Padrão de resistência antirretroviral e códons associados à resistência primária para a protease e transcriptase reversa do HIV-1.....	105

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>ABC</b>	Abacavir
<b>ANG</b>	Angola
<b>ATV</b>	Atazanavir
<b>BED-CEIA</b>	Imunoensaio enzimático de captura para determinação da infecção recente do HIV-1
<b>BRA</b>	Brasil
<b>CCS-UFPE</b>	Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco
<b>cDNA</b>	Ácido Desoxiribonucléico complementar
<b>CMIA</b>	Imunoensaio de micropartículas por quimioluminescência
<b>CRFs</b>	Formas Recombinantes Circulantes
<b>CTA</b>	Centro de Testagem e Aconselhamento em DST/AIDS.
<b>DDI</b>	Didanosina
<b>ECLIA</b>	Imunoensaio de eletroquimioluminescência
<b>EFV</b>	Efavirenz
<b>ETR</b>	Etravirina
<b>FTC</b>	Entricitabina
<b>FVP</b>	Fosamprenavir
<b>HBL</b>	Hospital Barão de Lucena
<b>HC-UFPE</b>	Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco
<b>HSH</b>	Homens que fazem sexo com homens
<b>HTS</b>	Heterossexual / Heterossexual

<b>IDV</b>	Indinavir
<b>IST</b>	Infecções Sexualmente Transmissíveis
<b>ITRN</b>	Inibidor de Transcriptase Reversa análogo de nucleosídeos
<b>ITRNN</b>	Inibidor de Transcriptase Reversa não análogo de nucleosídeos
<b>IP</b>	Inibidor de Protease
<b>LACEN/PE</b>	Laboratório de Saúde Pública do Estado de Pernambuco
<b>LPV</b>	Lopinavir
<b>ML</b>	Maximum likelihood method
<b>MRCA</b>	Ancestral comum mais recente
<b>MSM</b>	Men who have sex with men (Homens que fazem sexo com homens)
<b>NFV</b>	Nelfinavir
<b>NJ</b>	Neighbour-joining method
<b>NVP</b>	Nevirapina
<b>OMS</b>	Organização Mundial da Saúde
<b>PCR</b>	Reação da polimerase em cadeia
<b>PHIV+</b>	Parceiro de paciente HIV-positivo
<b>PPGMT-UFPE</b>	Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical da Universidade Federal de Pernambuco
<b>RDC</b>	República Democrática do Congo
<b>RMR</b>	Região Metropolitana do Recife
<b>ROM</b>	Romênia
<b>RPV</b>	Rilpivirina
<b>SDRM</b>	Mutações de resistência primárias transmitidas

<b>SQV</b>	Saquinavir
<b>TARV</b>	Terapia Antirretroviral
<b>TMRCA</b>	Tempo do ancestral comum mais recente
<b>TR</b>	Transcriptase Reversa
<b>UDI</b>	Usuários de drogas injetáveis
<b>UFPE</b>	Universidade Federal de Pernambuco
<b>UNIFESP</b>	Universidade Federal de São Paulo
<b>URFs</b>	Forma Únicas Recombinantes
<b>ZDV</b>	Zidovudina
<b>3TC</b>	Lamivudina

## SUMÁRIO

<b>APRESENTAÇÃO.....</b>	<b>20</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>22</b>
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>24</b>
2.1 Características gerais da biologia molecular do HIV-1.....	24
2.1.1 Estrutura genômica do HIV-1.....	24
2.1.2 Variabilidade genética do HIV-1 e mecanismos de recombinação viral.....	26
2.1.3 Importância dos estudos de epidemiologia molecular do HIV-1.....	29
2.2 Origem e evolução dos principais subtipos e recombinantes do HIV-1 no Brasil.....	30
2.3 Particularidades virológicas do subtipo F do HIV-1 e suas características epidêmicas no Brasil.....	58
2.4 Particularidades da epidemia do HIV-1 na região Nordeste.....	60
<b>3 OBJETIVOS.....</b>	<b>68</b>
3.1 Objetivo geral.....	68
3.2 Objetivos específicos.....	68
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>69</b>
4.1 População e local do estudo.....	69
4.2 Variáveis do estudo.....	70
4.2.1 Variável dependente.....	70
4.2.2 Variáveis independentes.....	70
4.3 Sequenciamento do gene da polimerase ( <i>pol</i> ) do HIV-1.....	75

4.4 Análise filogenética.....	76
4.5 Análise de recombinação intersubtipo.....	77
4.6 Diagnóstico das co-infecções.....	79
4.7 Análises da resistência antirretroviral.....	81
4.8 Análises da diversidade genética e de pressão seletiva positiva nos subtipos B e F identificados a partir do gene <i>pol</i> do HIV-1.....	82
4.9 Análise estatística.....	83
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>83</b>
5.1 Características da população do estudo.....	83
5.2 Diferentes subtipos e formas recombinantes do HIV-1 em Pernambuco – Nordeste / Brasil.....	85
5.3 Determinação da frequência relativa temporal dos subtipos B e F do HIV-1.....	97
5.4 Aumento da diversidade intra-subtipo do gene <i>pol</i> do HIV-1 B e F.....	97
5.5 Pressão seletiva positiva no gene <i>pol</i> do HIV-1 B e F.....	98
5.6 Diferenças epidemiológicas e laboratoriais entre os subtipos B e não-B.....	99
5.7 Susceptibilidade aos antirretrovirais.....	104
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>105</b>
<b>7 CONCLUSÕES.....</b>	<b>113</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>115</b>
<b>APÊNDICE A – FORMULÁRIO DA PESQUISA PARA OBTENÇÃO DE DADOS</b>	<b>135</b>
<b>APÊNDICE B – SEQUÊNCIAS DE REFERÊNCIA UTILIZADAS NAS ANÁLISES DO SIMPLOT.....</b>	<b>139</b>

<b>APÊNDICE C - ARTIGO 1: Submissão à revista PLoS ONE .....</b>	<b>140</b>
<b>APÊNDICE D - ARTIGO 2: Submissão à revista Journal of Clinical Virology...</b>	<b>166</b>
<b>ANEXO A- CARTA DE ANUÊNCIA DO LACEN/PE.....</b>	<b>194</b>
<b>ANEXO B – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA DO CCS-UFPE.....</b>	<b>195</b>

## APRESENTAÇÃO

Em 2006, desfrutei de uma maravilhosa experiência profissional: trabalhar em um Centro de Testagem e Aconselhamento (CTA) na cidade de Paulista - PE para o diagnóstico laboratorial do HIV-1, do Vírus da Hepatite B (HBV), do Vírus da Hepatite C (HCV) e sífilis. Tive a oportunidade de realizar várias capacitações em diagnóstico laboratorial de doenças infecciosas e de aconselhamento para a prevenção de Doenças Sexualmente Transmissíveis (DST). A oportunidade de trabalhar com indivíduos com infecção pelo HIV me fez perceber o verdadeiro papel do profissional de saúde nos cuidados, prevenção e diagnóstico, especialmente numa população de baixa renda. Os treinamentos, os relatos dos pacientes, suas histórias e as discussões de casos reavivaram em mim a vontade de seguir na formação acadêmica, e com isto, entrei no mestrado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da UFPE (PPGMT-UFPE), onde desenvolvi minha dissertação de mestrado com orientação da professora Dra. Heloísa Lacerda (UFPE), intitulada: “Estimativa de incidência da infecção recente pelo Vírus da Imunodeficiência Humana em dois Centros de Testagem e Aconselhamento (CTA) em Pernambuco – Brasil, de 2006 a 2009”. Na dissertação, atuamos em colaboração com a Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), onde fiz um intercâmbio para treinamento no Laboratório de Retrovirologia, coordenado pelo professor Dr. Ricardo Diaz (UNIFESP-SP) e, ao mesmo tempo, também contamos com as contribuições e importantes observações do Dr. Bharat Parekh (CDC-USA) nos processos metodológicos da pesquisa. Fui incluído como participante do grupo de estudo sobre resistência antirretroviral do HIV-1 em Pernambuco, coordenado pela professora Dra. Heloísa Lacerda (UFPE). Os ensaios de sequenciamento e avaliação da resistência antirretroviral foram realizados no Laboratório Central de Saúde Pública de Pernambuco (LACEN-PE), cuja equipe publicou alguns artigos sobre o tema de resistência e infecção recente do HIV-1 no estado de Pernambuco. Tomado pelo sentimento de apreciação em estudar virologia, especialmente os aspectos epidemiológicos moleculares do HIV-1, resolvi prosseguir meus estudos no PPGMT-UFPE ingressando no doutorado. Ciente que faltava aprofundar alguns conhecimentos moleculares sobre o HIV-1 na nossa região, e de posse de quase duas centenas de sequências *pol* do vírus, resolvi me dedicar às abordagens

filogenéticas e evolutivas para melhor entender e caracterizar a epidemia. Assim, desenvolvi esta tese a qual aborda as características filogenéticas, epidemiológicas, laboratoriais e evolutivas dos subtipos B e não-B do HIV-1 de Pernambuco – Brasil, com a orientação dos professores Dra. Heloísa Lacerda (UFPE) e Dr. Élcio Leal (UFPA).

Esta tese contém, separada em capítulos diferentes, uma revisão da literatura abordando as características moleculares gerais do HIV-1, os estudos de sua epidemiologia molecular no Brasil e suas particularidades na região Nordeste e no estado de Pernambuco. Em seguida, apresentamos os aspectos metodológicos da pesquisa, com detalhamento sobre a população do estudo e as metodologias empregadas. Por fim, há os artigos. No primeiro, intitulado: **“Caracterização molecular do HIV-1 entre 2002 e 2009 revela um aumento da variabilidade viral e detecção de raros subtipos e recombinantes”**, no qual caracteriza-se os subtipos e recombinantes circulantes no estado de Pernambuco – Brasil, além de revelar algumas características evolutivas quanto ao acúmulo de mutações. No segundo, denominado: **“Características epidemiológicas, laboratoriais e padrão de susceptibilidade aos antirretrovirais dos subtipos B e não-B do HIV-1 em Pernambuco, região Nordeste do Brasil”**, realizou-se uma correlação entre os resultados filogenéticos com os dados laboratoriais e epidemiológicos das amostras.

## 1 INTRODUÇÃO

No Brasil, estima-se que 718.000 indivíduos vivam com HIV/aids, o que corresponde a uma prevalência de 0.4% na população. De acordo com o último Boletim epidemiológico em HIV-AIDS (BRASIL, 2013), em 2012, a taxa de detecção nacional de casos de aids foi de 20.2/100 mil habitantes (hab.). Nos últimos dez anos, os maiores aumentos dessas taxas de detecção foram observados nas regiões Norte (92.7%) e Nordeste (62.6%), coincidentemente as regiões mais pobres do país. Na região Nordeste, o estado de Pernambuco obteve a maior taxa de detecção de casos de aids no ano de 2012, com 20.9 casos/100 mil hab., sendo o único estado da região cuja taxa foi superior à média nacional. Além disso, detém o maior número de crianças menores de 5 anos com casos da doença (BRASIL, 2013).

Quanto à epidemiologia molecular do HIV-1 no país, o subtipo B é o de maior prevalência, com exceção da região Sul, onde o HIV-1 C e suas formas recombinantes são predominantes. Porém, em todo o território nacional, os subtipos F e C são co-circulantes com o B (SANTOS et al., 2006; SOUZA et al., 2008). Adicionalmente, várias Formas Recombinantes Circulantes do HIV (CRFs) foram identificadas, como o CRF31\_BC na região Sul (DIAS et al., 2009), CRF28\_BF e CRF29\_BF em Santos (DE SÁ FILHO et al., 2006), CRF39\_BF e CRF40\_BF no Rio de Janeiro (GUIMARÃES, et al. 2008), CRF\_46BF em São Paulo (SANABANI et al., 2010), CRF70 e 71BF em Pernambuco (PESSÔA et al., 2014a) e a CRF72\_BF em Minas Gerais (PÊSSOA et al., 2014b). Além disso, as Formas Únicas Recombinantes do HIV-1 (URFs) têm apresentado altos índices em algumas regiões e se sobrepujado às CRFs (BRENNAN et al., 2007; GUIMARÃES et al., 2010).

Diante da enorme diversidade do HIV-1 no Brasil, um melhor conhecimento da variabilidade genética do HIV-1 é crucial para a compreensão de mecanismos de recombinação inter-subtipos, úteis para o desenvolvimento de vacinas, para a avaliação da eficácia da terapia antirretroviral, no estudo da patogênese viral, na diferenciação das diferentes vias de transmissão pelos diversos subtipos ou recombinantes, na avaliação de resistência a drogas antirretrovirais e na diferenciação de esquemas terapêuticos (DIAS et al., 2009; THOMSON et al., 2002).

Na Região Nordeste, Santos et al. (2011) relataram uma frequência de 21% de recombinantes BF na Bahia, enquanto no Ceará, Arruda et al. (2011) observaram uma menor proporção de subtipos não-B (8.1% F e 5.4% C), sendo o subtipo B majoritário (85.1%). Estudo realizado por Cavalcanti et al. (2007) revelou uma taxa de 11.8% de subtipo F do HIV-1 em pacientes com falha terapêutica na região. Neste mesmo trabalho, as amostras de Pernambuco apresentaram a maior prevalência (22%) para este subtipo. Em outro trabalho realizado em Pernambuco com pacientes virgens de terapia antirretroviral, Medeiros et al. (2006) constataram 22.6% do subtipo F. Recentemente, Cavalcanti et al. (2012) demonstraram um aumento da prevalência de subtipos F (37.7%) em amostras de pacientes recém-diagnosticados em Centro de Testagem e Aconselhamento em municípios da Região Metropolitana do Recife (RMR). Estes estudos foram realizados com um segmento parcial do genoma do vírus (região *pol*) e não utilizaram métodos de inferência filogenética para uma melhor identificação dos subtipos ou recombinantes. Assim, permanecia-se a dúvida quanto a verdadeira caracterização da epidemia no estado. Pessoa et al. (2014a), a partir de segmentos *pol*, previamente caracterizados como subtipo F, obtidos de doadores de banco de sangue, identificaram duas CRFs no estado: as CRFs70 e 71\_BF. Apesar do achado, havia um grande número de sequências *pol* isoladas de pacientes virgens de terapia antirretroviral, coletadas em diferentes períodos de pessoas recentemente diagnosticados em Centros de Testagem e Aconselhamento da RMR e do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (HC/UFPE), o que resultou na proposta de avaliá-las quanto às características filogenéticas, evolutivas, sociodemográficas e laboratoriais com a finalidade de melhor contribuir para a caracterização do HIV-1 em Pernambuco, Nordeste – Brasil.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Características Gerais da Biologia Molecular do HIV-1

#### 2.1.1 Estrutura Genômica do HIV-1

O HIV é pertencente à família *Retroviridae*, gênero *Lentivirus* (WIGG, 2002). Detalhadas análises filogenéticas de diferentes regiões do genoma ou de sequências completas do HIV-1 permitiram caracterizá-lo em diferentes grupos, subtipos, sub-subtipos, Formas Recombinantes Circulantes (CRFs) e Formas Únicas Recombinantes (URFs) ( TAYLOR et al., 2008).

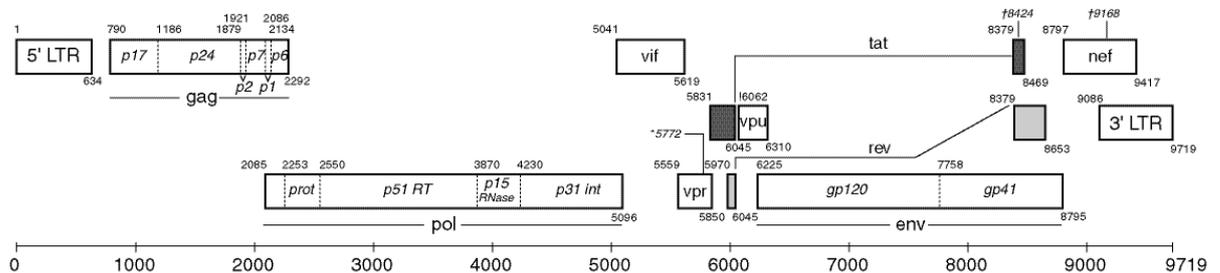
O HIV-1 apresenta uma elevada taxa de mutação, o que acarreta uma ampla diversidade genética, caracterizada pela detecção de várias subpopulações virais em um mesmo indivíduo, criando o conceito de quasiespécies. Estas são definidas como genomas virais não idênticos, mas proximamente relacionados (CLEMENTI & LAZZARIN, 2010). Os métodos mais convencionais de genotipagem têm uma sensibilidade limitada para a detecção de variantes minor virais cuja frequência é menor que 20-30% das quasispecies circulantes, e essa limitação metodológica pode acarretar em uma subestimativa na taxa de resistência antirretroviral em indivíduos virgens de Terapia Antirretroviral (TARV). O desenvolvimento de métodos de sequenciamento de DNA, mais sensíveis e eficazes, tem permitido a detecção dessas variantes virais encontradas em baixa proporção nos indivíduos infectados (HAALAND, JOHNSON & TANG, 2013).

Em relação à organização estrutural, o HIV possui glicoproteínas em seu envelope derivadas de um precursor, denominado de gp160, o qual é clivado por proteases celulares presentes no aparelho de Golgi, produzindo as duas glicoproteínas de superfície: gp120 (proteína externa de superfície) e gp41 (proteína transmembrana). No interior do envelope encontra-se um segundo envoltório, a matriz, constituída pela proteína p17, fundamental para a integridade viral. O capsídeo é formado pela proteína p24 e no seu interior encontra-se o material

genético, composto por duas moléculas idênticas de RNA fita simples com polaridade positiva, associadas às proteínas do nucleocapsídeo p7 e p6 e às enzimas virais: transcriptase reversa (RT), integrase (IN), protease (PR) e RNase H (WIGG, 2002).

Quanto à organização genômica, as três principais regiões correspondem aos genes estruturais: *gag*, *pol* e *env* (figura 1). A região *gag* é responsável pela codificação de proteínas estruturais: proteína da matriz (p17), proteína do capsídeo (p24) e as do nucleocapsídeo (p6 e p7), derivadas do precursor p55. O gene *pol* é responsável por codificar precursores das enzimas da protease, transcriptase reversa e integrase. Por fim, a *env* codifica o precursor (gp160) das glicoproteínas do envelope (gp120 e gp41) (STRUCHINER E PINTO, 2006; <http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/MAP/landmark.html>).

Figura 1 – Mapa genético do HIV-1.



Fonte: <http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/MAP/landmark.html>.

Além dos genes estruturais, há os genes regulatórios *tat* e *rev* e os genes acessórios ou auxiliares *vif*, *vpr*, *vpu* e *nef*. O *tat* controla a expressão gênica, aumentando os níveis de RNA viral e elevando a transcrição inicial e o alongamento da cadeia e o gene *rev* regula o processamento e o transporte do RNA viral do núcleo ao citoplasma. Em relação aos genes acessórios, o *vif* (fator de infectividade viral) forma um complexo com proteínas celulares (Elongina B, fator CBF-beta e Culina 5) que vai induzir a ubiquitinação da proteína celular APOBEC3G; o *vpr* (proteína viral R) atua na regulação da expressão de genes celulares e virais,

alterando o mecanismo celular, facilitando a replicação; o *vpu* (proteína viral U) é importante para a liberação dos vírions das células infectadas e o *nef* está associado ao aumento da infectividade viral e é essencial para a manutenção de altas cargas virais (WIGG, 2002; <http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/MAP/landmark.html>).

### **2.1.2 Variabilidade Genética do HIV-1 e mecanismos de recombinação viral**

A enorme variabilidade genética do HIV-1 está relacionada a vários fatores: ausência de atividade de correção (exonuclease) da enzima transcriptase reversa (TR) viral, ocasionando erros na incorporação de nucleotídeos no filamento de DNA complementar (cDNA) formado; grande produção diária de novas partículas virais e consequente infecção de muitas células T CD4+, possibilitando a replicação de mais vírus; e, ainda, à capacidade da TR de intercalar-se entre uma fita de RNA para outra durante o processo de transcrição, gerando fitas de DNA viral que possuem recombinação de duas moléculas diferentes (HUÉ et al., 2004; STRUCHINER E PINTO, 2006; THOMSON et al., 2002). Esta diversidade pode acarretar diferentes propriedades biológicas entre as variantes virais, como diferenças na adaptação evolutiva, na taxa de mutações, na aquisição de droga-resistência e no tropismo celular (LEAL e VILLANOVA, 2010).

Outros fatores também contribuem para a geração de diversidade do HIV-1, um deles é o processo de transmissão do vírus a um novo hospedeiro susceptível. Verifica-se que uma progênie do vírus, produzida no início da infecção, é resultante da expansão de uma ou poucas partículas virais oriundas do contágio, embora diversos mecanismos interfiram nesse processo: a imunidade inata, o número de partículas virais de determinada variante genética no inóculo e a densidade de células-alvo. Além desse primeiro processo de afunilamento da diversidade durante a transmissão (bottleneck), também ocorre um processo de seleção natural, fazendo com que os vírus encontrados em estágios iniciais da infecção sejam diferentes dos observados em estágios tardios, conforme o observado em relação ao tropismo viral pelos receptores CCR5 e CXCR4. Após a infecção primária, a maioria dos pacientes

abrigam vírus que infectam macrófagos e células T quiescentes normais (vírus M-trópicos). Em períodos mais tardios da infecção, há a presença de vírus T-trópicos, isto é, os que têm a capacidade de infectar células T ativadas e transformadas (imortalizadas). Os vírus M-trópicos são classificados como R5 vírus e os T-Trópicos como X4 vírus devido à utilização preferencial dos correceptores de quimiocinas CCR5 e CXCR4 para sua entrada na célula, respectivamente (CLEMENTI e LAZZARIN, 2010; STRUCHINER E PINTO, 2006).

A variabilidade genética do HIV-1 pode ser explicada, ainda, por sua alta taxa de substituição de nucleotídeos; embora, sua composição nucleotídica varie pouco com o passar do tempo (VAN DE LUYL & BERKHOUT, 2012). Snoeck et al. (2011) sugeriram que a estrutura genômica da molécula de RNA viral é a responsável por essa conservação genética. Por outro lado, há variação na composição dos nucleotídeos entre os diferentes genes do HIV-1 e entre os diversos subtipos do grupo M, entretanto a replicação viral na presença de TARV e a seleção de mutações associadas à resistência antirretroviral não modificam a frequência nucleotídica do gene *pol* (VAN DE LUYL & BERKHOUT, 2012).

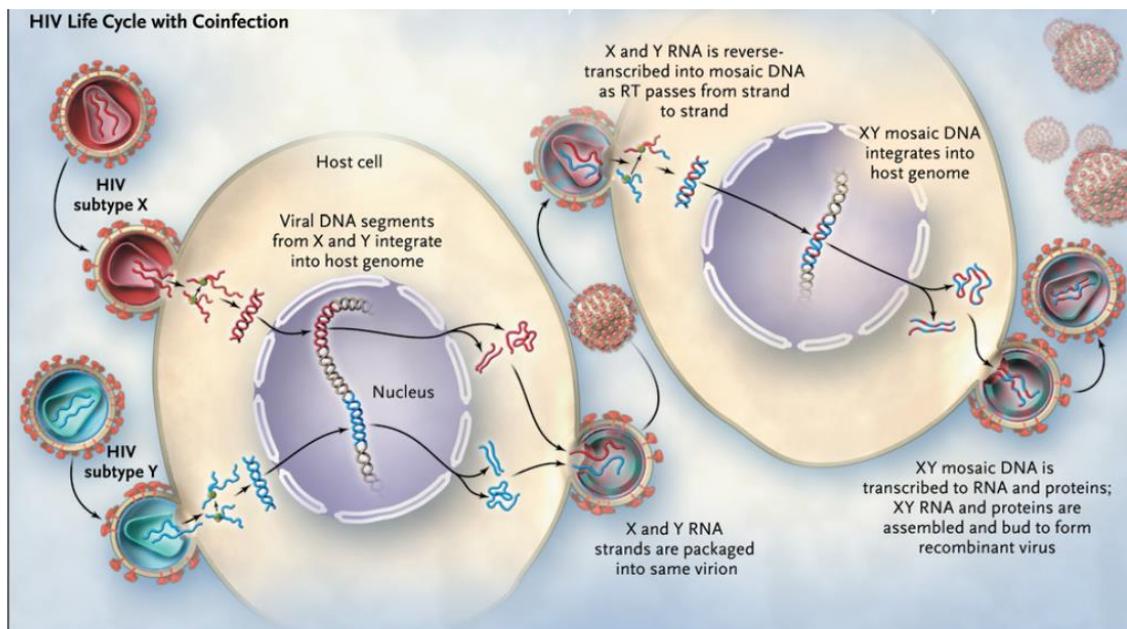
O HIV-1 classifica-se em quatro grandes grupos: M (major), N (nonmajor ou nonoutlier), O (outlier) e, o mais recentemente descoberto grupo P (VALLARI et al., 2011). O grupo M é o predominante em todas as regiões do mundo, responsável pela pandemia global. O grupo O é encontrado, principalmente, em Camarões e países vizinhos, enquanto que o N e o P são limitados a alguns isolados dos Camarões (SANTOS, et al., 2006; VALLARI et al. 2011).

Por ser o mais prevalente, o grupo M é o mais estudado, sendo subdividido em nove subtipos: A, B, C, D, F, G, H, J e K. Os subtipos são caracterizados por formarem grupos equidistantes em árvores filogenéticas. Certos subtipos apresentavam uma estrutura genética mais complexa após seu genoma completo ser sequenciado. Por exemplo, foi mostrado que o subtipo descrito anteriormente como “E” era, na verdade, uma CRF contendo componentes do subtipo A, redefinindo-se como CRF01\_AE. Além disso, características genéticas distintas também foram visualizadas em sub-subtipos (A1, A2, A3, A4 e F1, F2), os quais constituem linhagens virais distintas dentro de um subtipo (SANTOS et al. 2006; SOUZA et al., 2008; STRUCHINER E PINTO, 2006; TAYLOR et al., 2008; VALLARI

et al. 2011). Ainda se pode definir as CRFs quando três ou mais indivíduos, sem ligação epidemiológica direta, encontram-se infectados pela mesma variante viral; e URFs, como formas únicas recombinantes intersubtipo recuperados de um único indivíduo (TAYLOR et al., 2008).

Formas recombinantes do vírus são frequentemente reportadas em regiões onde dois ou mais subtipos predominam. O mecanismo de recombinação do HIV-1 acarreta um aumento da diversidade viral, ocorrendo quando um indivíduo é co-infectado com duas cepas virais distintas que se replicam na mesma célula (Fig. 1) (SANABANI et al., 2009; SOUZA et al., 2008; TAYLOR et al., 2008). Foram identificados, até o momento, 68 CRFs no mundo (<http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/CRFs/CRFs.html>).

Figura 2 – Processo de recombinação genética envolvendo duas variantes do HIV-1.



Fonte: Taylor et al. (2008).

### 2.1.3 Importância dos Estudos de Epidemiologia Molecular do HIV-1

A combinação entre o uso das análises filogenéticas de sequências do HIV com dados demográficos, via de transmissão do vírus, características clínicas e laboratoriais permitem uma melhor compreensão da epidemia e tem como finalidade estruturar e adequar melhores estratégias de prevenção, principalmente em populações mais afetadas (CHALMET et al., 2010; JUNQUEIRA et al., 2011).

A escolha de uma apropriada região genética é crucial para uma efetiva análise filogenética. Embora, análises de genoma completo do HIV-1 têm sido empregadas para estudos de transmissão, há alguns entraves na sua utilização, principalmente no seu alto custo de seqüenciamento (HUÉ et al., 2004). Rotineiramente, a região *pol* permanecia impopular para análises filogenéticas devido a sua extrema conservação genética, quando comparada à região *env*. Entretanto, Hué et al. (2004) relataram inúmeras vantagens em se utilizar este gene para o estudo de eventos de transmissão do HIV-1: a região *pol* é rotineiramente sequenciada pelos testes de genotipagem para determinação de mutações de resistência, o que gera um grande banco de sequências disponíveis; a determinação do subtipo através desta região é frequentemente realizada; e o fragmento *pol* possui suficiente variabilidade genética intrínseca para permitir a reconstrução de eventos de transmissão filogenéticos. Além disso, eventos de recombinação apresentam uma tendência em ser mais frequentes nas regiões *gag/pol*, (DE SÁ FILHO et al., 2005).

Em resposta ao artigo de Stürmer et al. (2004), onde foi afirmado que a região *pol* não era suficiente para a reconstrução de eventos de transmissão filogenéticos e que a região V3 do envelope deveria ser utilizada em conjunto para tal abordagem, Hué et al. (2005a) contra argumentaram e enfatizaram que a região *pol* suporta necessária variação genética para esses tipos de análise ao identificar os mesmos padrões de clusters filogenéticos obtidos do gene *pol*, *env* e *gag* das mesmas amostras de HIV-1 e, ao mesmo tempo, relataram que a grande diversidade e divergência presente no gene *env* pode comprometer a identificação de clusters de transmissão.

Sabe-se que a presença de TARV causa um viés na seleção de códons e, especificamente, nos relacionados com resistência que sofrem seleção positiva (CHOISY et al., 2004; LEAL, HOLMES & ZANOTTO, 2004). Portanto, a presença de seleção em códons relacionados com TARV pode distorcer filogenias e causar um viés nas análises (LEMEY et al., 2005).

Diversos trabalhos ressaltam os benefícios da utilização de métodos filogenéticos em análise conjunta com dados epidemiológicos, configurando uma nova e importante área de interesse, a epidemiologia molecular. As sequências genéticas resultantes dos testes de resistência antirretroviral constituem uma importante fonte para esse campo de estudo, contribuindo para um melhor conhecimento da disposição geográfica e epidemiológica da epidemia local do HIV-1, bem como para a reformulação de estratégias de prevenção e intervenção em saúde pública (HUÉ et al., 2004; HUÉ et al. 2005b; GIFFORD et al., 2007).

Outras abordagens na utilização das análises filogenéticas, no campo da epidemiologia molecular do HIV-1, referem-se à avaliação da extensão de novas transmissões geradas a partir de indivíduos no estágio agudo da infecção (BROWN et al. 2009) e na determinação das múltiplas rotas de transmissão de droga-resistência na população infectada (KAYE et al., 2008).

Além disso, estudos sobre evolução viral podem ser utilizados para a determinação de parâmetros epidemiológicos que não são acessíveis por outras vias, como o observado na filodinâmica molecular, que provém parâmetros aplicáveis tanto para surtos quanto para estimativas globais em epidemias estabelecidas há mais tempo (VERMUND & LEIGH-BROWN, 2012). Gilbert et al., (2007), por exemplo, combinaram análises filogenéticas, históricas e epidemiológicas para a elaboração da reconstrução da pandemia do subtipo B.

## **2.2 Origem e evolução dos principais subtipos e recombinantes do HIV-1 no Brasil**

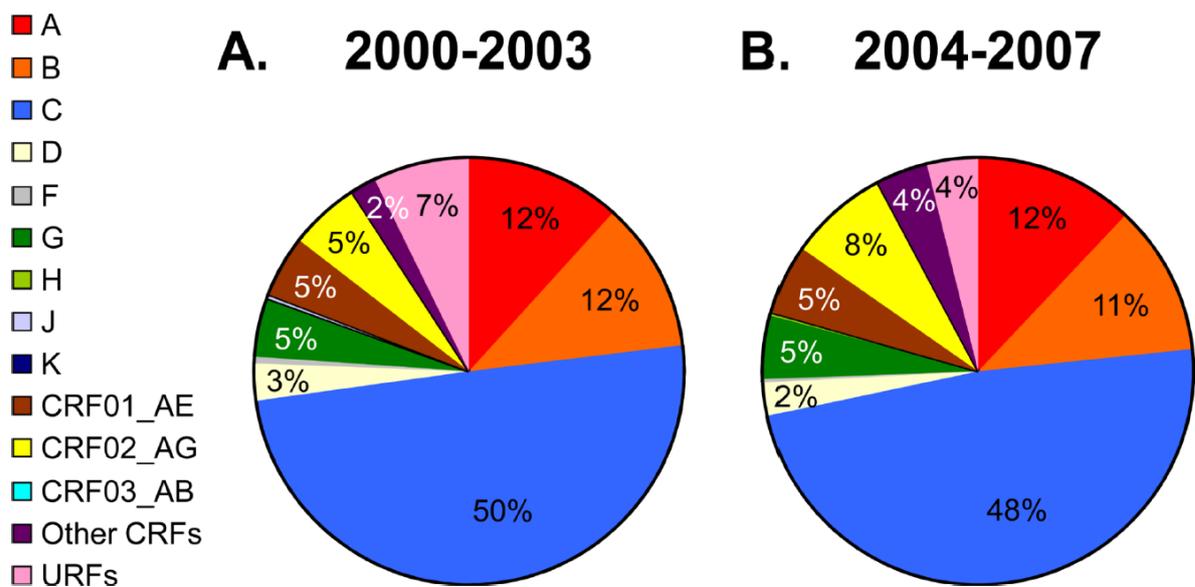
Mesmo sendo uma epidemia relativamente recente, o HIV-1 tomou proporções pandêmicas muito rapidamente e cada nação ou continente apresenta suas próprias características epidemiológicas, dinâmica de transmissão e grupos populacionais mais afetados (VERMUND & LEIGH-BROWN, 2012). Recentemente, Faria et al. (2014) publicaram artigo sobre a origem e disseminação do HIV-1, revelando que o mesmo emergiu na República Democrática do Congo (RDC), na cidade de Kinshasa (capital do país), por volta de 1920, e mostram que uma pluralidade de fatores contribuíram para a expansão epidêmica do grupo M, como: fatores sócio-históricos, intervenções iatrogênicas e mudanças de comportamento sexual. Os autores revelaram que um maior crescimento exponencial do HIV-1 na população da RDC foi resultado da administração de injeções com material não-estéril em clínicas de doenças sexualmente transmissíveis, aumento da atividade dos profissionais do sexo na capital do país, disseminação do vírus para novas regiões seguindo rotas comerciais e de imigração, e aumento do número de casos de doenças com úlcera genital, o que facilita a propagação viral.

Muitas falhas ocorreram no início da epidemia, e continuam ocorrendo hoje, facilitando a disseminação do HIV-1, entre elas, as falhas no atraso do rastreamento sorológico do HIV-1 em bancos de sangue, a falta de uma agressiva campanha de conscientização dos riscos de transmissão sexual, do uso de preservativos e, também, a falta de uma política de suprimento de agulhas e seringas descartáveis para UDIs (MAHY et al., 2009).

No início, as epidemias nas mais diversas nações eram associadas, majoritariamente, com algum subtipo específico. Entretanto, devido às propriedades recombinantes do genoma do HIV, várias cepas recombinantes emergiram e ganharam dimensões epidêmicas (ROBERTSON et al., 2000). De acordo com Hemelaar et al. (2011), houve um aumento global na proporção das CRFs e URFs, com uma diminuição no número absoluto de infecções nos períodos analisados na pesquisa (2000-2003 e 2004-2007) para os subtipos B e C, embora esses constituam os principais subtipos disseminados globalmente (figura 3). Como

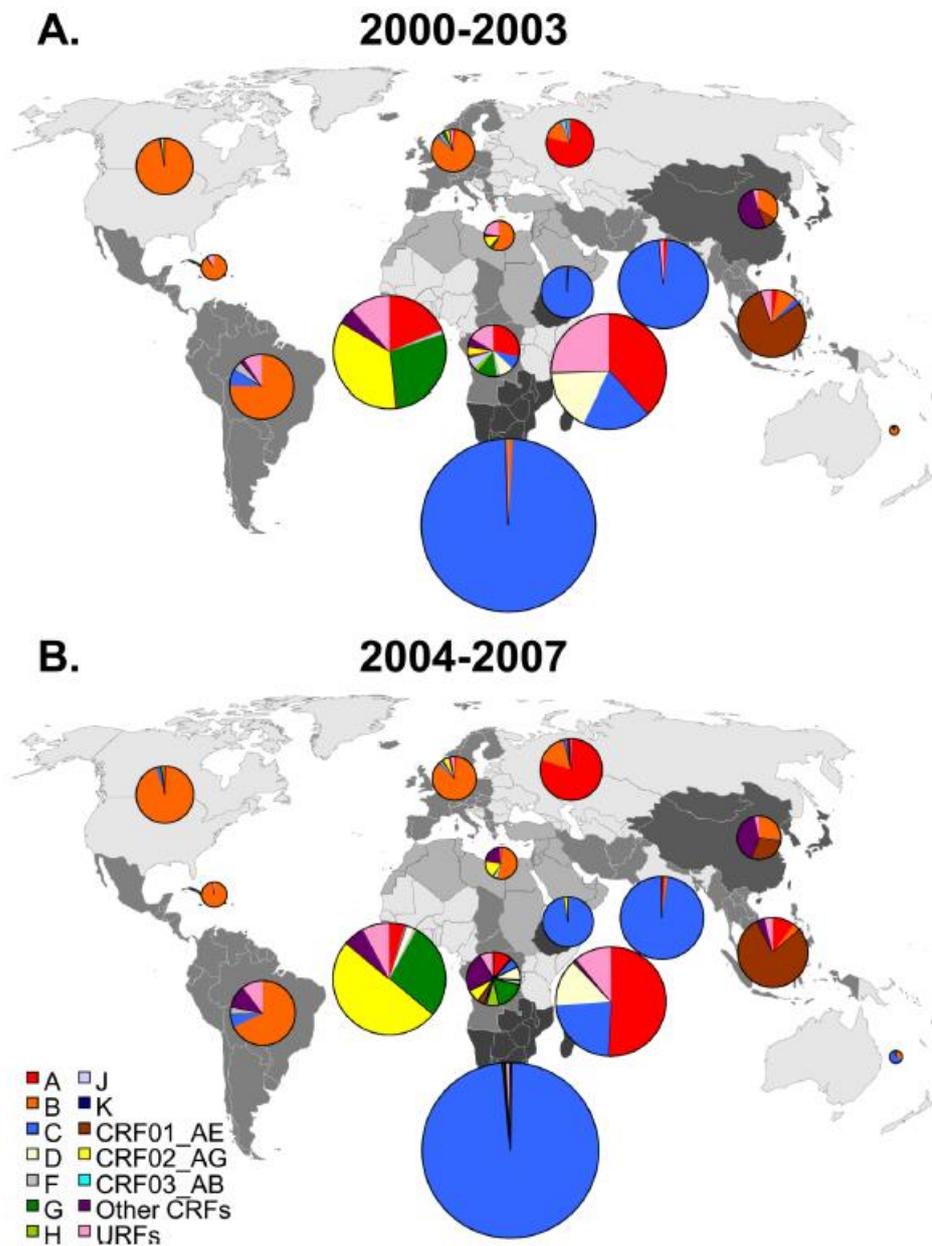
ilustrado na figura 4, verifica-se que, na América Latina, houve um aumento na proporção das formas recombinantes seguida da diminuição dos subtipos B e F, revelando a importância destas cepas na epidemia deste continente. Apesar da disseminação de outros subtipos ou formas recombinantes, pode-se denotar, ainda, a maior prevalência do subtipo B nos países ocidentais (Continente americano, Europa ocidental), do subtipo C na África Subsaariana, Leste Africano e Índia, do subtipo A na Rússia e Leste Europeu, da CRF01\_AE no Sudeste Asiático e da CRF02\_AG no Oeste Africano (figura 4) (HEMELAAR, et al. 2011).

Figura 3 – Distribuição global dos diferentes subtipos e formas recombinantes do HIV-1 no mundo em dois períodos distintos.



Fonte: Hemelaar et al., (2011).

Figura 4 – Distribuição mundial dos subtipos e formas recombinantes do HIV-1 em dois períodos distintos, A: Período de 2000-2003; B: Período de 2004-2007.



Fonte: Hemelaar et al., (2011).

A América Latina apresenta um grande número de pessoas vivendo com HIV (figura 5), além disso, é a região do ocidente com maior proporção de novas infecções pelo HIV, com dados estimados no ano de 2013, que indicam a contínua expansão da epidemia no continente (figura 6). Corroborando com este fato, o Brasil foi responsável por 2% do total mundial das novas infecções pelo vírus em 2013,

constituindo a maior proporção entre os países ocidentais, juntamente com os Estados Unidos (UNAIDS, 2013).

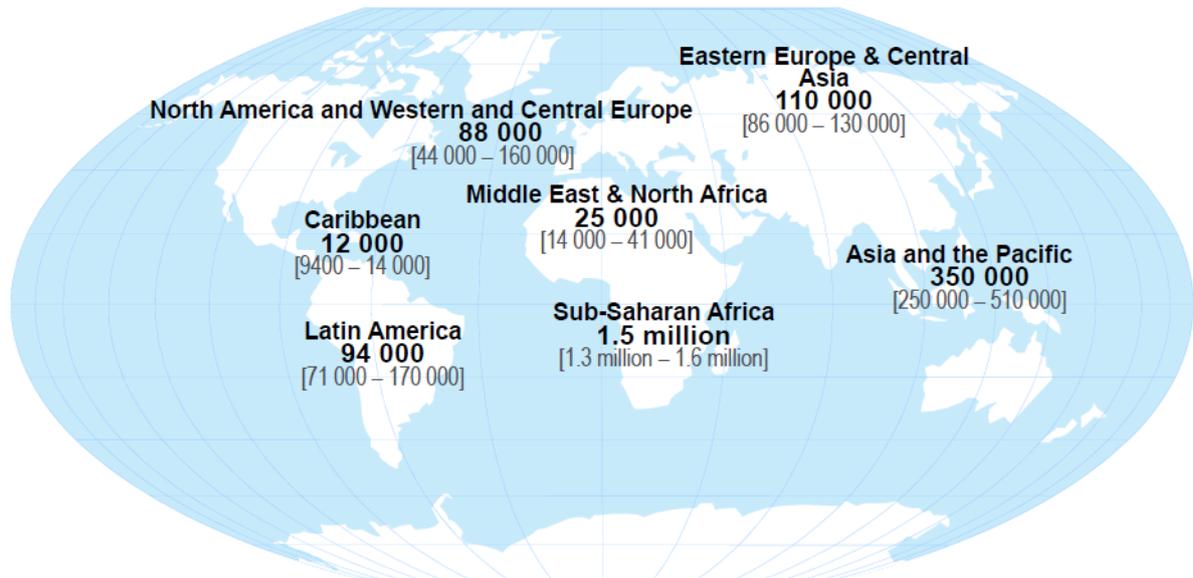
Figura 5 – Estimativa mundial, em números absolutos, de adultos e crianças vivendo com HIV – 2013.



Fonte: UNAIDS (2013).

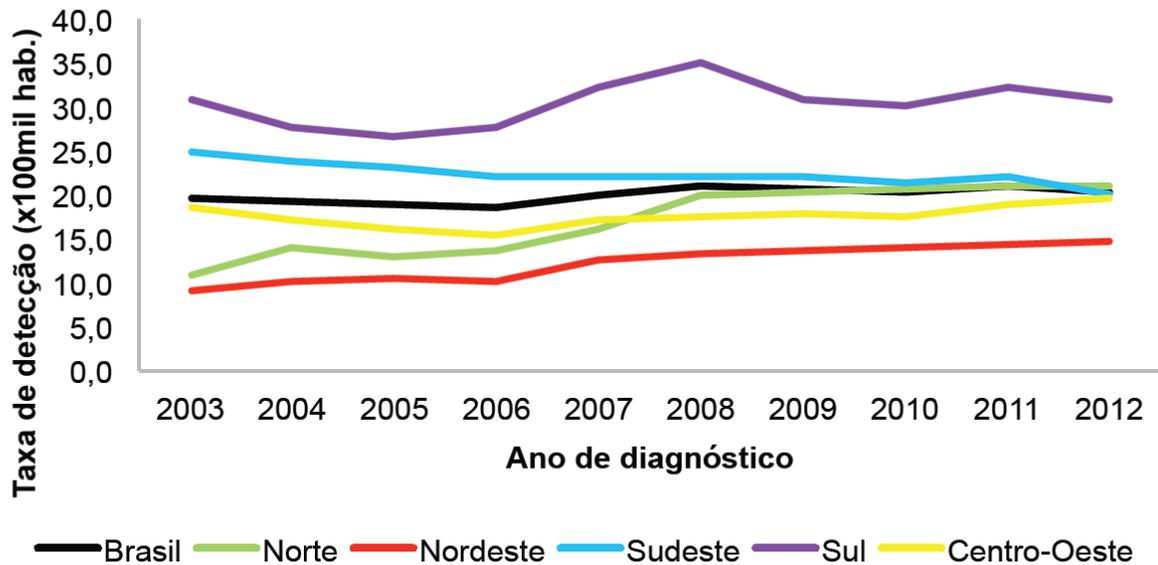
Figura 6 – Estimativa mundial do número de crianças e adultos infectados recentemente pelo HIV (ano de 2013).

Fonte: UNAIDS (2013).



Embora a taxa de detecção de casos de aids, no Brasil, tenha se mantido constante nos últimos dez anos, às custas de uma diminuição de 18,6% na região Sudeste, observa-se ainda um aumento nas outras regiões, com destaque para região Norte e Nordeste (figura 7) (BRASIL, 2013). Além disso, nesse mesmo período foi constatado uma mudança do perfil etário dos casos de aids no país, com as maiores taxas encontradas entre aqueles com 30-39 anos e uma tendência de aumento entre os que possuem de 20-24 anos. Cabe destacar um aumento dos casos de aids no sexo masculino (67,8%) e 12,2% de redução no sexo feminino, além de um aumento de 22% na proporção dos casos em homens que fazem sexo com homens (HSH) e uma redução de 3% em heterossexuais (BRASIL, 2013).

Figura 7 - Taxa de detecção de aids por região de residência e ano de diagnóstico, Brasil, 2003 – 2012.



Fonte: Ministério da Saúde / Secretaria de Vigilância à Saúde / Departamento de DST, aids e Hepatites Virais (BRASIL, 2013).

A epidemia do HIV-1 no Brasil é causada por múltiplos subtipos do grupo M, sendo o B o mais prevalente, seguido pelo F e C. Adicionalmente, vários recombinantes foram identificados no país, entre eles, os BF e BC. As prevalências dos diferentes subtipos e CRFs virais variam de acordo com a região geográfica, deixando claro que as suas distribuições na epidemia podem ser explicadas por efeitos locais específicos durante a dispersão do vírus ou devido às diferentes rotas de entrada do HIV no país (BELLO, GUIMARÃES e MORGADO, 2006; BRÍGIDO et al. 2007; RISTIC et al., 2011; SA-FILHO et al., 2007).

O epicentro inicial da epidemia aconteceu nas cidades de São Paulo e Rio de Janeiro, onde foram oficialmente reportados os primeiros casos (oito em São Paulo e três no Rio de Janeiro), sendo o primeiro caso, retrospectivamente identificado, ocorrido em São Paulo no ano de 1980, acometendo um homem com práticas homossexuais (BELLO, GUIMARÃES e MORGADO, 2006). Esses achados revelam que a introdução do HIV no Brasil deu-se primeiramente na região Sudeste antes dos anos 80, e rapidamente a epidemia tomou uma abrangência nacional,

ocupando, atualmente, todo o território brasileiro (BRITO, CASTILHO & SZWARCOWALD, 2000). O Subtipo B do HIV-1 é o mais prevalente, seguido dos subtipos F1, recombinantes BF e C, numa menor proporção, sendo o último mais prevalente na região Sul (BELLO et al. 2008; SANTOS et al., 2006; SOUZA et al., 2008). Recentemente, foram identificadas três novas CFRs, as CRFs 70 E 71\_BF (PÊSSOA et al. 2014a), em Pernambuco, e a CRF72\_BF1, em Minas Gerais (PESSÔA et al., 2014b). Além dessas, houve a detecção de outras CRFs no Brasil: CRF28\_BF e CRF29\_BF, em Santos (DE SA FILHO et al., 2006), CRF 39\_BF e CRF40\_BF, no Rio de Janeiro (GUIMARÃES et al., 2008), CRF46\_BF, em São Paulo (SANABANI, et al., 2010) e a CRF31\_BC, no sul do país (DIAS et al., 2009; SANTOS et al., 2006).

Verifica-se, também, a detecção de subtipos e recombinantes mais raros, em menores proporções, e com distribuição geográfica variada: Na região Nordeste foram identificados recombinantes FD (0.6%) e BF/F (0.6%), e esta cepa FD apresentava uma antiga circulação no estado da Bahia, cujo paciente tinha mais de 10 anos de diagnóstico (MONTEIRO, et al., 2009); no Sudeste verifica-se a circulação de recombinantes com mosaicos do subtipo G em São Paulo (BRÍGIDO, et al., 2005), a detecção de casos de transmissão autóctone do subtipo D (COUTO-FERNANDEZ, et al., 2006), da contínua demonstração da circulação do CRF02\_AG (EYER-SILVA & MORGADO, 2007; VALESCO-DE-CASTRO, et al., 2014) e do aparecimento de cepas recombinantes com fragmentos K (VALESCO-DE-CASTRO, et al., 2014) no Rio de Janeiro; no Centro-Oeste revela-se a presença de cepas BC, F1C e F1CB (FERREIRA, et al., 2011); na região Norte, a circulação do subtipo C foi observada em menor proporção que em outros locais do país (VICENTE, et al., 2000; CUNHA et al., 2012) e a constatação da presença da CRF\_02AG (MACHADO, et al., 2009).

A circulação de vários subtipos e CRFs representa um importante cenário na evolução viral, do impacto dessa diversidade na epidemia do HIV-1 e na progressão à doença (DIAS et al., 2009). Os mosaicos genéticos do HIV-1 podem apresentar algumas vantagens evolutivas que podem promover seu aumento na prevalência da epidemia com o passar do tempo, podendo acarretar repercussões no desenvolvimento de futuras vacinas, na terapêutica antirretroviral e na aquisição de resistência às drogas antirretrovirais (DE SÁ FILHO et al., 2005; DIAS et al., 2009).

Outra importância no estudo da diversidade viral para a avaliação das vantagens evolutivas que o vírus pode vir a adquirir é a transmissibilidade de cepas recombinantes. Fica evidenciado, assim, a importância da epidemiologia molecular para a vigilância epidemiológica das rotas de transmissão viral (DIAS et al., 2009).

O Subtipo C foi primeiro identificado na África do Sul e Etiópia em amostras de 1984 e 1986, respectivamente (SOARES et al., 2003). Atualmente, este subtipo é o mais prevalente no mundo, sendo responsável por aproximadamente metade das infecções globais (SOARES, et al., 2003; FONTELLA, SOARES & SCHRAGO, 2008; DELATORRE & BELLO, 2012; DELATTORRE, et al., 2013). Segundo Delatorre & Bello (2012), em estudo sobre a filodinâmica do HIV-1 C no Leste Africano, onde este subtipo tem altas taxas de prevalência, a maioria das cepas dessa região segregam-se em um grupo monofilético e em uma segunda grande linhagem monofilética C da Etiópia, sendo estas cepas etíopes caracterizadas como recombinantes C/C'. As análises dos autores ainda indicaram que o clado monofilético do Leste Africano foi, provavelmente, originado no Burundi, no início dos anos 1960, espalhando-se, em seguida, para a Etiópia, Quênia, Tanzânia e Uganda.

Na América do Sul, Fontella, Soares & Schrago (2008) mostraram que cepas do HIV-1 C formavam um grupo monofilético, indicando que a entrada desse subtipo no continente ocorreu como um episódio único ou em múltiplas ocasiões com cepas geneticamente relacionadas. Além disso, verificaram que cepas da Argentina e Uruguai foram muito proximamente relacionadas com as brasileiras e concluíram que o HIV-1 C pode ter entrado no continente através do Brasil e se espalhado para outros países do Cone Sul (Argentina, Uruguai e Paraguai). Entretanto, em estudo posterior, Jones et al. (2009) revelaram que, apesar do HIV-1 C formar um grande clado Sul-americano, algumas cepas não agrupam no mesmo, sugerindo que possa existir sequências do subtipo C de diferentes origens circulando no continente e que a Argentina poderia também ser a porta de entrada dessa variante na região. Vários trabalhos indicam uma origem do Leste Africano como fonte do HIV-1 C para a América do Sul (BELLO et al., 2008; VÉRAS et al., 2011; DELATORRE et al., 2013), contudo, a rota externa pela qual este subtipo tinha chegado ao continente permanecia interrogada. De Oliveira et al. (2010) evidenciaram, por dados filogenéticos, demográficos e temporais, que o Reino Unido teria sido uma espécie

de “trampolim” essencial para a disseminação do subtipo C do Leste Africano para a América do Sul, ao revelarem que um grupo de isolados do Reino Unido agrupavam-se basalmente ao clado maior composto de cepas do Reino Unido e Brasil, interligando este clado principal a cepas do Leste Africano. Adicionalmente, Vêras et al. (2011) demonstraram que sequências C da Venezuela agrupavam-se com cepas da República Democrática do Congo, fora do cluster da América do Sul, indicando que uma separada e singular epidemia de HIV-1 C ocorre naquele país, diferente do restante do continente.

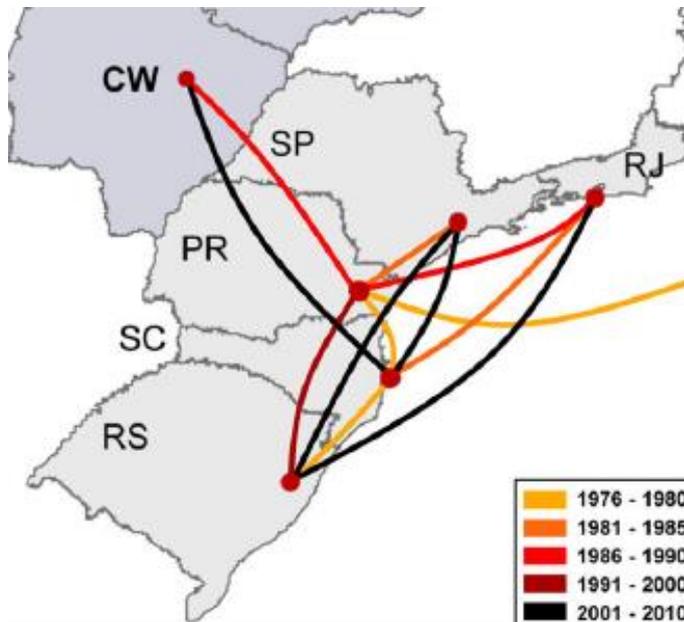
No Brasil, vários estudos têm revelado que o subtipo C tornou-se endêmico na região Sul (SOARES, et al., 2003; SANTOS, et al., 2006; BRÍGIDO et al., 2007; DIAS et al., 2009). Regiões onde o subtipo C prevalece têm-se observado um aumento da epidemia em taxas maiores do que em locais onde outros subtipos dominam. Na região Sul, que vem registrando um aumento no número de suas infecções (BRASIL, 2013), verifica-se a predominância do subtipo C e CRF31\_BC, com taxas variando de 21-56% e 0.5-35%, respectivamente (GRÄF & PINTO, 2013), principalmente em cidades que relatam as maiores taxas de incidência em casos de aids no país, como Itajaí e Balneário Camboriú (BRÍGIDO et al., 2007).

Sobre a origem e evolução do subtipo C no país, amostras retrospectivas sequenciadas pelo Grupo de HIV da Organização Mundial da Saúde (World Health Organization HIV Network) demonstraram que este subtipo já circulava no Brasil em 1992 (SOARES et al., 2003). Vários estudos indicam que o HIV-1 C brasileiro forma um grupo monofilético quando comparados com outras cepas ao redor do mundo, sustentando a hipótese que sua introdução, no país, foi um evento único ou uma mistura de cepas geneticamente relacionadas (SOARES et al., 2003; BELLO et al., 2008), além disso, apresentam específicas assinaturas de aminoácidos na região da protease e transcriptase reversa (SOARES et al., 2003). Usando metodologias abordando métodos coalescentes Bayesianos, Bello et al. (2008) determinaram que o evento fundador das cepas do subtipo C, no Brasil, ocorreu no início dos anos 1980, cujas cepas formaram um grupo monofilético dotadas de bom suporte estatístico com cepas do Burundi (Leste Africano). Os autores sustentaram essa hipótese com o achado de uma infecção por subtipo C, em um adulto diagnosticado com aids em 1991, e pela detecção da CRF31\_BC, em um indivíduo com data de infecção do início dos anos 90. Adicionalmente, dois de seus pacientes que foram

classificados como subtipo C tinham data de infecção de 1986 e 1988. Delatorre et al. (2013) corroboram com o fato das cepas pertencentes ao grande clado C brasileiro serem originadas, provavelmente, do Burundi. Entretanto, Vêras et al. (2011) afirmaram que o clado C brasileiro é relacionado a cepas do Leste Africano, porém, o exato país de origem não pôde ser inferido nas análises. Como mencionado anteriormente, De Oliveira (2010) relataram que sequências do Reino Unido demonstravam uma inter-relação com sequências do Brasil e do leste Africano, podendo esse país, devido as suas relações culturais com a América do Sul, ter sido uma ponte entre as duas epidemias.

Diferentemente de Bello et al. (2008), Vêras et al. (2011) estimaram que a introdução do HIV-1 C, no Brasil, data do período de 1960-1970 e suas análises filogeográficas evidenciaram que o Paraná ou Rio Grande Do Sul foram as possíveis portas de entrada desse subtipo no país, e defendem que tenha sido o epicentro da epidemia, de onde o vírus disseminou-se para São Paulo, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, enquanto que o menor influxo viral sai deste último estado para Santa Catarina e São Paulo. Delatorre et al. (2013), corroborando com os dados de Vêras et al. (2011), demonstraram que as cepas C foram introduzidas no estado do Paraná nos meados da década de 1970, de onde se disseminou rapidamente para os estados vizinhos, sendo o Paraná e Santa Catarina os principais disseminadores da epidemia C (figura 8). Além disso, também foi relatado que todas as sequências C brasileiras que se agruparam fora do grande clado C BR eram provenientes do Rio de Janeiro e relacionavam-se com cepas de diversas regiões da África, com amostras diagnosticadas entre 2006 e 2011, supondo que exista um contínuo influxo de sequências C originadas da África para o Brasil (DELATORRE et al., 2013).

Figura 8 – Disseminação do HIV-1 C nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste do Brasil.



Fonte: DELATORRE et al., (2013).

Santos et al. (2006) identificaram a primeira CRF BC brasileira, a CRF31\_BC, em amostras provenientes do Rio Grande do Sul, cuja prevalência era de 11%, considerada alta para uma recombinante viral recentemente descoberta. Dados evolucionários sugerem que esta CRF31\_BC emergiu no início dos anos 1990, com uma taxa evolucionária de crescimento populacional semelhante ao subtipo C e superior ao B (SANTOS et al., 2007).

Alguns trabalhos relatam uma associação entre o subtipo C e a transmissão heterossexual (SOARES et al., 2005; SILVA et al., 2010; SILVEIRA et al., 2012), entretanto, Soares et al. (2005) e Silva et al. (2010) associam a presença deste subtipo principalmente entre mulheres heterossexuais. Além disso, Silveira et al. (2012) revelaram uma associação estatística significativa entre esta variante viral e uma maior contagem de células T CD4+ em pacientes recém-infectados, quando comparados a subtipos não-C. Apesar de vários estudos associarem o HIV-1 C à transmissão heterossexual, Kahle et al. (2014) relataram que este subtipo não está

associado a um aumento no risco de transmissão entre heterossexuais. Ao estudarem casais heterossexuais sorodiscordantes, os autores verificaram que não havia diferença nas taxas de transmissão entre os parceiros sexuais que albergavam HIV-1 C ou HIV-1 não-C.

Em relação à resposta ao tratamento antirretroviral, Soares et al. (2007) relataram que o subtipo C está associado a uma menor acúmulo de mutações a Inibidores da Transcriptase Reversa Análogos de Nucleosídeos (ITRN) e a Inibidores de Protease (IP) do que o subtipo B em indivíduos sob terapia antirretroviral (TARV). Além disso, observou-se uma maior supressão viral no início da TARV relacionado com o HIV-1 C. Em outra pesquisa, Cunha et al. (2012) detectaram, *in vitro*, que cepas B tem maior propensão à resistência à zidovudina (ZDV) do que cepas C.

Embora seja menos prevalente no mundo que outras variantes do HIV-1, o subtipo B é o mais disseminado, principalmente nos países ocidentais, e por isso foi o mais extensivamente estudado (GILBERT et al., 2007). Sobre suas origens e disseminação no continente americano, Gilbert et al. (2007), baseando-se em hipóteses levantadas em outros estudos que sugeriam que o Haiti teria sido o epicentro da epidemia de aids nas Américas, realizaram inferências filogenéticas com metodologia mais detalhada e rigorosa para testá-las. Esses autores, por meio de análises do gene *env*, constataram que as cepas haitianas do HIV-1 situavam-se na base da árvore filogenética das sequências do subtipo B, supondo fortemente que o HIV-1 B chegou e começou a se disseminar no continente a partir desse país. No mesmo trabalho, os autores também identificaram que o clado composto por cepas de Trinidad e Tobago estavam diretamente relacionadas a cepas haitianas, indicando que a epidemia majoritariamente heterossexual deste país poderia ser explicada por uma única introdução ligada ao Haiti. Os autores evidenciaram, ainda, que um clado pandêmico, formado por cepas HIV-1 B de 96 diferentes países, apresentava-se como um cluster monofilético, cuja árvore dispunha de cepas haitianas na posição basal, confirmando a hipótese de que todas as cepas B ao redor do mundo emanaram-se de um evento fundador ligado ao Haiti, sendo o mais provável que o vírus ancestral tenha passado de comunidades haitianas para não-haitianas nos Estados Unidos, e daí espalhando-se para outras nações. Corroborando com a hipótese sobre a origem haitiana da epidemia do HIV-1 B no

continente americano, Vermund & Leigh-Brown (2012) citam que a aids foi reconhecida inicialmente no Haiti, antes de qualquer outro país, com exceção das cidades de Los Angeles, Nova Iorque e São Francisco, que tinham casos confirmados da doença.

Em outro artigo sobre a disseminação do subtipo B nas Américas, Junqueira et al. (2011) também apontaram que a introdução desta variante no continente se deu pelo Caribe. As análises de filogenia molecular realizadas, além de indicar uma origem africana das sequências B americanas, mostraram a dispersão de três clados a partir do cluster caribenho, situado na parte basal das sequências americanas. O menor clado e mais próximo do clado caribenho, era composto por seis sequências, sendo três da Venezuela e uma da Colômbia, indicando que a dispersão inicial do HIV-1 B do Caribe foi em direção a países vizinhos. Os outros dois grandes clados dividiam o mesmo ancestral do clado menor (Caribe) e eram formados por cepas de vários países do continente americano. Observou-se também que cepas cubanas agrupavam junto com sequências da América do Sul, sugerindo que a epidemia cubana originou-se a partir dessa porção do continente; e que cepas B da América do Norte apresentavam maior variação genética do que as Sul-americanas quando comparadas a cepas do Caribe.

Murillo et al. (2013) abordaram a origem e disseminação do HIV-1 em seis países da América Central (Belize, Honduras, El Salvador, Nicarágua, Costa Rica e Panamá), cujos resultados mostraram uma enorme prevalência do subtipo B (98.9%), havendo múltiplas introduções do HIV-1 B nessa parte do continente americano, representado pela presença de cinco clusters monofiléticos. Entretanto, um único cluster continha mais de 62% das sequências B da América Central, apresentando bom suporte estatístico, sugerindo que a maioria dos casos foram originados a partir de uma única introdução de uma cepa ancestral. Corroborando com dados de Gilbert et al. (2007) e Junqueira et al. (2011), o mesmo estudo também demonstrou que cepas B haitianas ocupavam uma posição basal nas árvores filogenéticas, apontando para a origem haitiana do HIV-1 B americano.

Em análise do tempo de emergência do subtipo B nas Américas, Gilbert et al. (2007) estimaram que o tempo de introdução do ancestral comum mais recente (MRCA) do HIV-1 B no continente americano foi em 1966 (IC95%: 1962-1970),

enquanto que Junqueira et al. (2011) demonstraram ser 1964 (IC95%: 1950-1967), portanto, ambos concordaram que a dispersão deste subtipo no continente americano ocorreu nos anos 60.

O subtipo B apresenta certo grau de variabilidade genética (LEAL & VILLANOVA, 2010). Identificam-se algumas variantes principais: o subtipo B' encontrado na Tailândia; uma variante B de Trinidad e Tobago caracterizado por uma deleção da treonina na parte terminal do loop da alça V3; uma variante na Coréia do Sul, a qual possui um atípico motif GPGS na coroa da alça V3 e por fim o subtipo B-Br encontrado principalmente no Brasil (PINTO, et al., 2008; LEAL & VILLANOVA, 2010). O subtipo B-Br é caracterizado pela alta frequência do motif GWGR no loop da V3, no gene *env*. Altas frequências desses isolados são encontradas no Brasil com dados de prevalência superiores a 30%, enquanto que são observados apenas ocasionalmente em outros países, como China, França, Filipinas, Cuba e República Tcheca (LEAL & VILLANOVA, 2010).

Um trabalho de Pinto et al. (2008), utilizando sequências B oriundas de vários países, denotou que cepas GWGR tendem a formar um clado monofilético distinto. Por outro lado, análises filogenéticas realizadas com sequências do HIV-1 B de vários continentes evidenciaram que cepas brasileiras tendem a ser agrupar em um único clado, cujas amostras GWGR e GPGR são igualmente distribuídas no cluster, demonstrando um ancestral comum (ÉLCIO & VILLANOVA, 2010). Comentando este último resultado, Bello, Soares & Schrago (2011) afirmam que esta última observação pode ter sido resultado de recombinação intra-subtipo entre as cepas GWGR e GPGR analisadas no estudo. Uma importante característica dos isolados B GWGR está no fato que alguns estudos apontam uma progressão mais lenta para a aids em indivíduos portadores desta variante (SANTORO-LOPES et al., 2000; CASSEB et al., 2002; BRITO et al., 2006).

Análises evolucionárias estimam que o início da epidemia do HIV-1 subtipo B no Brasil ocorreu no início dos anos 70 (BELLO, GUIMARÃES & MORGADO, 2006). O tempo do ancestral comum mais recente para as cepas B-Br (GWGR) foi estimado ser de 1966 (1954-1975), que coincide com a idade do clado pandêmico americano das cepas B (1969, IC95%: 1966-1972), determinado por Gilbert et al. (2007).

Portanto, estes dados sugerem que o evento fundador que originou a linhagem B-Br ocorreu no início da epidemia do HIV-1 B no Brasil (BELLO et al., 2007a).

O subtipo F foi definido a partir de um surto epidêmico entre crianças que viviam em orfanatos, na Romênia, durante os anos de 1989-1990 (HERSH et al., 1991; BANDEA et al., 1995; TRIQUES et al., 2000). No Brasil, sua primeira identificação aconteceu em quatro amostras coletadas entre 1989-1990, isto é, ao mesmo tempo em que este subtipo distinto foi revelado na Romênia (LOUWAGIE et al., 1994). Posteriormente, o HIV-1 F foi novamente identificado no Brasil em 1992, proveniente de um indivíduo do Rio de Janeiro, heterossexual e sintomático (MORGADO et al., 1994). Desde então, o HIV-1 F vem sendo identificado em muitas regiões do mundo, e em vários países da América do Sul (Argentina, Chile, Paraguai, Uruguai), França, Rússia, Luxemburgo, Espanha, Sérvia, Camarões, Gabão, Angola, República Democrática do Congo e Guiné (TRIQUES et al., 1999; GUIMARÃES et al., 2009; FREIMANIS et al., 2012; SILJIC et al., 2013).

Em um primeiro estudo mais detalhado sobre a variabilidade genética do subtipo F do HIV-1, cuja origem era predominantemente africana, Triques et al. (1999) observaram que o mesmo era subdividido em 3 grupos (F1, F2 e F3). Além disso, eles verificaram que sequências F da Romênia e Brasil se agrupavam no clado F1, sugerindo que a epidemia F destes países tivesse uma origem africana. O clado F2 era constituído de cepas originadas no Camarões e o F3, de cepas oriundas de vários países Centro-Africanos. Posteriormente, após as análises do primeiro sequenciamento do genoma completo das cepas F1, F2 e F3, Triques et al. (2000) evidenciaram que o subgrupo F3 era, na verdade, um novo subtipo do HIV-1, designado de subtipo K, pois esta variante era equidistante em relação a outros subtipos do HIV-1, enquanto que as cepas F1 e F2 apresentavam menor distância entre si, denotando que ambas eram subgrupos do F. Outro estudo envolvendo genoma completo do HIV-1 F identificou a presença de recombinantes FD e suas análises filogenéticas mostraram que a sua divergência ocorreu próximo aos subclusters F1 e F2, sugerindo que os processos de recombinação envolvendo cepas F são relatados desde os primórdios de suas origens (LAUKKANEN et al., 2000). Fernández-García et al. (2008) caracterizaram uma variante do subtipo F circulante em São Petersburgo – Rússia, cujas sequências, coletadas de indivíduos

heterossexuais, formavam um clado monofilético próximo, porém distinto, das cepas F1.

Análises evolutivas revelaram que os isolados mais antigos relacionados às sequências F1 eram oriundos da República Democrática do Congo e que sua diversificação ocorreu naquele país no final dos anos 1950 (GUIMARÃES et al., 2009). No Brasil, o primeiro estudo sobre a história evolucionária desse subtipo estimou que o início desta epidemia ocorreu no início da década de 1980 (BELLO, GUIMARÃES & MORGADO, 2006). Vários outros estudos abordaram a história evolutiva do HIV-1 F, determinando o tempo de seus ancestrais comuns mais recentes (TMRCA), inclusive para cepas brasileiras (tabela 1).

Tabela 1 – Estimativas do tempo de ancestral comum mais recente (TMRCA) para seqüências do HIV-1 F oriundas de várias regiões do mundo.

<b>Autores</b>	<b>Banco de dados (País)</b>	<b>Gene</b>	<b>Ano de amostragem</b>	<b>N</b>	<b>Tratamento</b>	<b>TMRCA (95% HPD)</b>
Bello, Guimarães & Morgado (2006)	Brasil	<i>V3 (env)</i>	1989-1997	41	-	1981 (1961-1985)
Bello et al., (2007)	Brasil	<i>C2-V3 (env)</i>	1998-2004	16 08	naive <sup>a</sup> TARV <sup>b</sup>	1978 (1972-1983)
		<i>TR+PR (pol)</i>	2002-2005	53	TARV	1977 (1963-1988)
Aulicino et al. (2007a)	Argentina e seqüências de referência	Genoma completo <i>C2C3(env)</i>	-	320	-	1976 (1966-1982)
Guimarães et al. (2009)	Angola e outras seqüências mundiais <sup>c</sup>	<i>gp 41 (env)</i> <i>gp120 (env)</i> <i>TR+PR<sup>d</sup> (pol)</i> <i>(AO)<sup>e</sup></i>	2006 (AO)	09 (AO)	-	1958 (1934-1971)
Mehta et al. (2011)	Seqüências de referência mundiais	<i>pol</i>	1987-2007	531	-	F 1967 (1956-1976) F1 1973 (1966-1980) F2 1979 (1973-1985) FAO 1975 (1968-1980) FRO <sup>f</sup> 1978 (1972-1983) FBR <sup>g</sup> 1980 (1975-1985)
Bello, Afonso & Morgado (2012)	RDC+Bélgica	<i>pol</i>	1987-2003	a05	naive	F 1983 (1978-1989)
	AO		2001-1010	32	naive	FBR 1977 (1972-1981)
	BR		1989-2009	49	naive	FRO AD <sup>h</sup> 1980 (1973-1987)
	RO adulto		1997-2004	18	naive	FR CH <sup>i</sup> 1985 (1978-1989)
	RO crianças		1993-2004	18	naive	
	RO crianças		2003-2007	333	TARV	
Mbisa et al. (2012)	Seqüências de referência	<i>pol</i>	-	673	-	1983 (1981-1985)
Paraskevis et al. (2015)	Espanha	<i>pol</i>	2009-2013	420	Naive	1993 (1979-2003)

<sup>a</sup>naive: virgens de tratamento antirretroviral; <sup>b</sup>TARV: tratamento antirretroviral; <sup>c</sup>Seqüências de referência retiradas do banco de dados do Los Alamos HIV database. <sup>d</sup>PR+TR: Protease mais parte da transcriptase reversa; <sup>e</sup>AO: Angola; <sup>f</sup>RO: Romênia; <sup>g</sup>BR: Brasil; <sup>h</sup>AD: adultos; <sup>i</sup>CH: crianças.

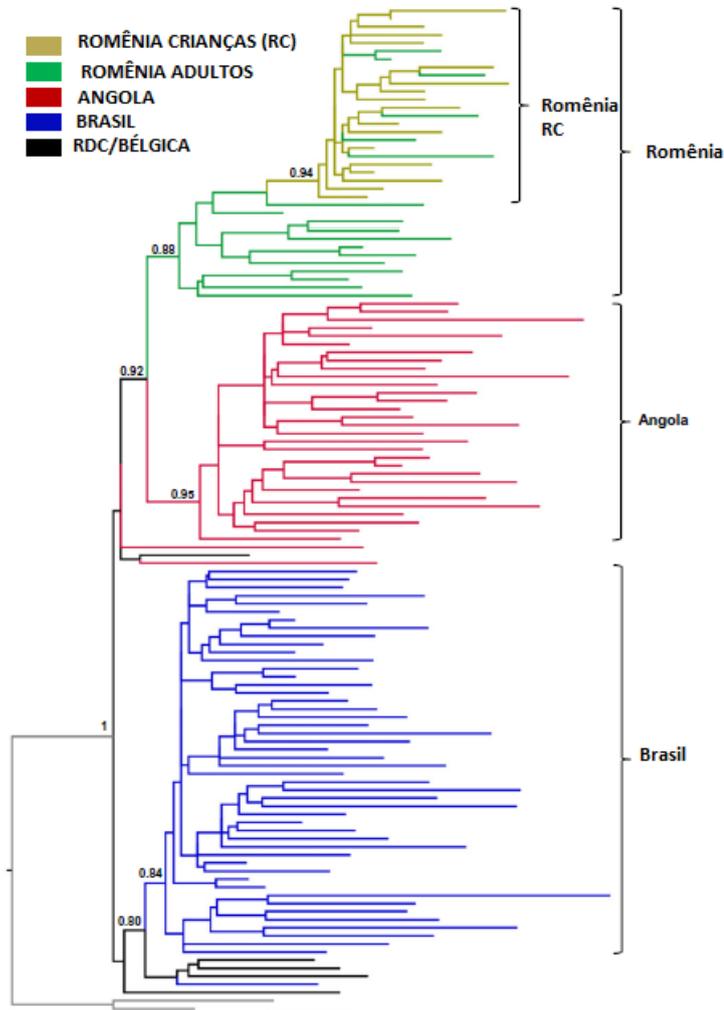
Inicialmente, pensava-se que haveria uma relação epidemiológica e evolutiva entre as sequências F do Brasil e Romênia, devido ao fato de que esta cepa viral foi identificada simultaneamente nos dois países. Entretanto, Bandea et al. (1995) visualizaram em suas análises filogenéticas que não há uma ligação epidemiológica entre as duas epidemias, pois as cepas F1 da Romênia e Brasil agrupavam-se em dois clusters relacionados, porém distintos.

Posteriormente, vários trabalhos abordando a história evolutiva do HIV-1 F foram realizados, conforme relatados na tabela 1. Na pesquisa de Guimarães et al. (2009), os autores observaram que cepas F1 provenientes de Angola eram proximamente relacionadas à sequências da Romênia, e ambas eram igualmente distantes filogeneticamente das cepas Sul-Americanas, indicando que a epidemia F1 da América do Sul tinha uma relação evolutiva diferenciada dos outros dois países. Entretanto, Mehta et al. (2011) encontraram resultados divergentes de Guimarães et al. (2009), demonstrando que uma linhagem ou múltiplas introduções de cepas angolanas foram responsáveis pela origem da epidemia F1 romena, por observarem um clado específico de sequências da Angola dentro do grande clado Romeno, e ainda a observação de algumas sequências angolanas na parte externa do clado maior da Romênia. Quanto às sequências F1 brasileiras, estas ficaram separadas do grupo de sequências Angola-Romênia em outro cluster filogenético, indicando uma origem diferenciada da epidemia F1 brasileira em relação a estes dois países. Desta forma, neste mesmo artigo, Mehta et al. (2011) relatam a incógnita existente sobre as origens do subtipo F no Brasil. Estes autores especulam que o HIV-1 F brasileiro possa ter origens da Angola, devido ao grande fluxo sócio-político entre estes dois países na época em que este subtipo foi introduzido no Brasil, raciocínio compartilhado também por Aulicino et al. (2007a). Entretanto as análises filogenéticas realizadas neste e em outros estudos contrariam esta hipótese (GUIMARÃES et al., 2009; MEHTA et al., 2011). Outra observação importante, baseia-se no relato de Mehta et al. (2011) determinarem que cepas de distintas regiões geográficas do mundo intercalavam-se com o HIV-1 F brasileiro, enfraquecendo ainda mais a hipótese supracitada.

Bello, Afonso & Morgado (2012), analisando as relações evolutivas das epidemias do HIV-1 F em Angola, Brasil e Romênia, demonstraram que as cepas F1 desses três países segregam-se em grupos monofiléticos específicos, contrariando

os dados de Mehta et al. (2011), que não demonstraram uma segregação completa das cepas romenas e angolanas. Os resultados de Bello, Afonso & Morgado (2012) mostram, claramente, que as cepas F circulantes em crianças romenas (epidemia parenteral em crianças romenas) foram derivadas da população adulta e que a origem e diversificação do subtipo F1 ocorreu, muito provavelmente, na República Democrática do Congo e subsequentemente dispersou-se para outros países. Além disso, os resultados das inferências filogenéticas suportam a hipótese que as epidemias F1 da Romênia e Angola emergiram de um único efeito fundador de cepas proximamente relacionadas, como sugeridas em outros estudos, sendo mais relacionadas entre si do que com cepas F1 brasileiras (GUIMARÃES et al., 2009; MBISA et al., 2012) (figura 9).

Figura 9 – Árvore filogenética inferida a partir do gene *pol* do HIV-1 F.



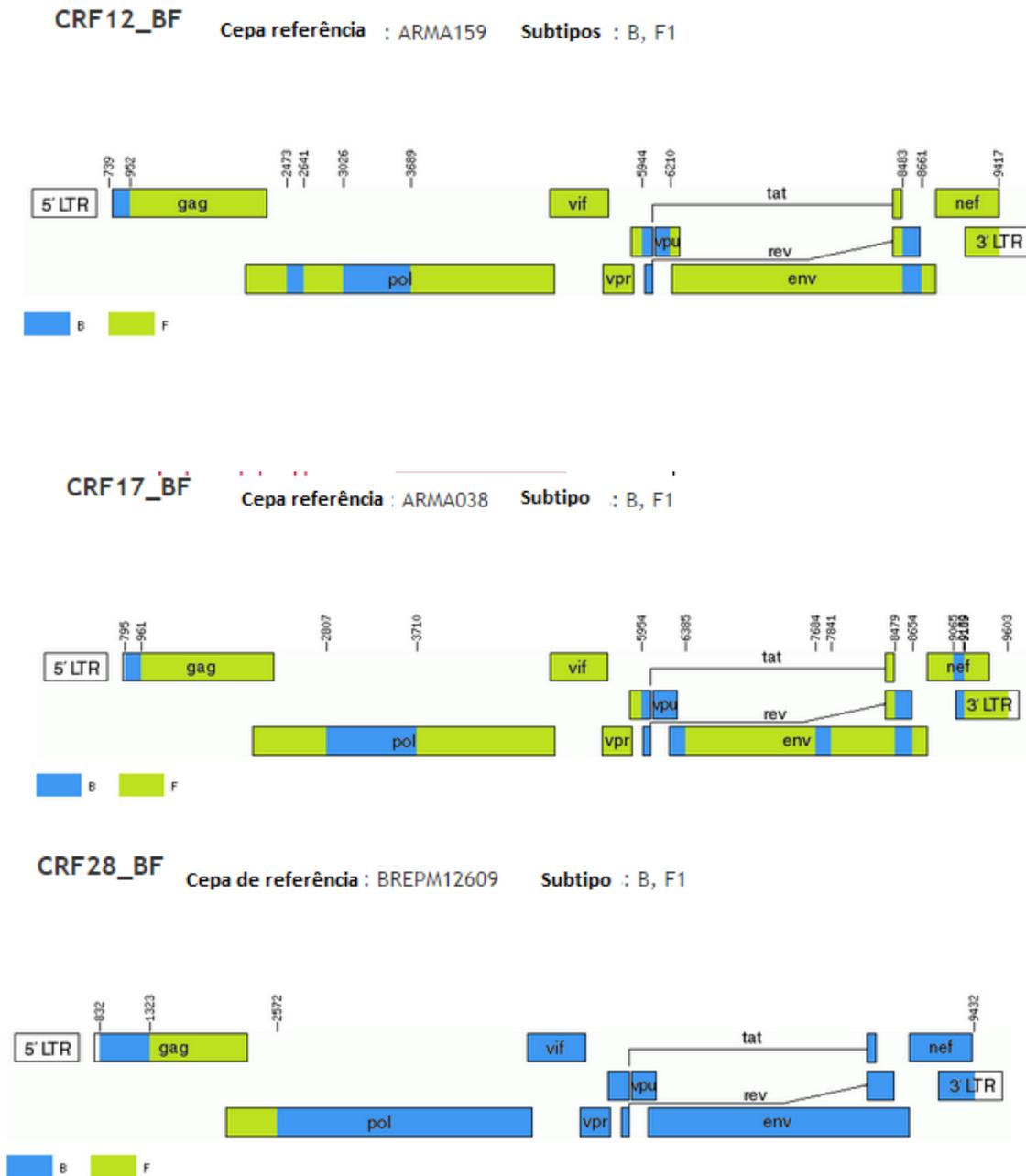
Fonte: Bello, Afonso & Morgado, (2012).

Na América do Sul, a prevalência dos recombinantes BF é maior do que o observado para o subtipo F (AULICINO et al., 2011; DILERNIA et al., 2011; SIERRA et al., 2005), indicando a importância do papel destes recombinantes na epidemia da aids no continente. A identificação de cepas BF em amostras coletadas entre 1986-1987 na Argentina e 1992 no Brasil revelou a antiga circulação destas variantes no continente, além disso, sequenciamento completo do genoma viral demonstrou que muitas cepas caracterizadas como subtipo F, na verdade, são BF, indicando que a presença destas variantes é corriqueira na região (CARR et al., 2001; DILERNIA et al., 2011; GOMEZ et al., 2002; SANABANI et al., 2010;

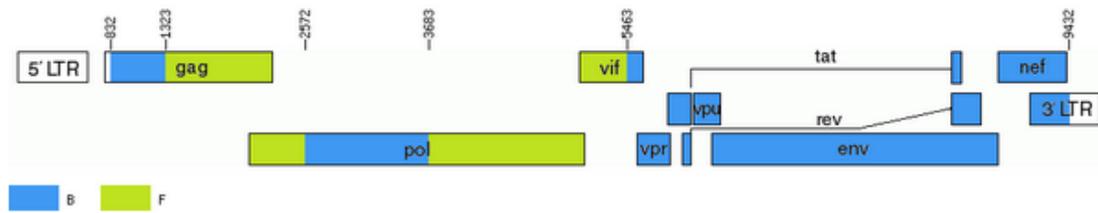
THOMPSON et al., 2004). Aulicino et al. (2007b) revelaram que os recombinantes BF da Argentina, onde há uma grande prevalência dos mesmos, possuem uma altíssima taxa de crescimento populacional, maior do que qualquer outro subtipo do HIV-1. Os autores relacionaram esta elevada frequência de transmissão a um provável alto fitness viral, o que favorece a disseminação desses recombinantes. A capacidade de maior dispersão dos recombinantes BF na América do Sul também foi avaliada por Leal et al. (2008), cujos resultados indicaram que estas cepas BF apresentavam um maior número de infecções secundárias oriundas de uma única infecção, definido como  $R_0$ , do que suas cepas parentais “puras” B e F.

Clusters filogenéticos contendo cepas BF foram recentemente identificados em outros lugares do mundo, além da América do Sul, como na Itália (SALADINI et al., 2012) e China (LEUNG et al., 2010), indicando a presença de cadeias de transmissão *in loco*. Embora a maioria das CFRs BF tenha origem Sul-Americana, algumas foram identificadas em outras regiões, como a CFR42\_BF em Luxemburgo e a CRF47\_BF na Espanha (FERNÁNDEZ-GARCÍA et al., 2010; LOS ALAMOS, 2014). As CRFs BF são as formas recombinantes mais comuns do HIV-1, determinadas 14 até o momento, das quais 12 foram originadas na América do Sul (LOS ALAMOS, 2014), sendo elas: CRF12\_BF e CRF17\_BF na Argentina (AULICINO et al., 2012; CARR et al., 2001); CRF28BF, CRF29\_BF, CRF39\_BF, CRF40\_BF, CRF46\_BF, CRF70\_BF, CRF71\_BF e CRF72\_BF no Brasil (DE SÁ FILHO et al., 2006; GUIMARÃES et al., 2008; PESSÔA et al., 2014a; PESSÔA et al., 2014b; SANABANI et al., 2010), CRF38\_BF no Uruguai (RUCHANSKY et al., 2009); e CRF44\_BF no Chile. A seguir, há uma comparação das estruturas em mosaicos de todas as CRFs BF presentes no Los Alamos HIV database (LOS ALAMOS, 2014) (figura 10).

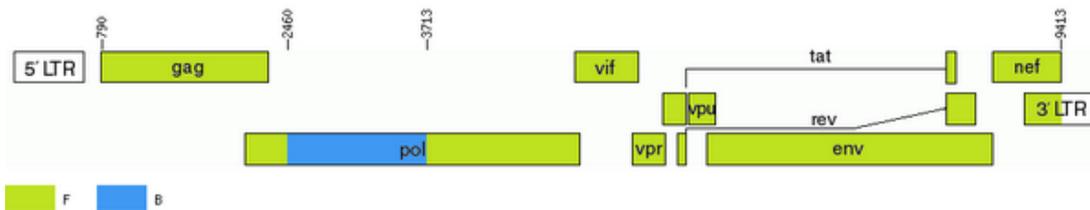
Figura 10 – Comparação das estruturas em mosaicos genéticos das CRF\_BF existentes no mundo. Não há a estrutura em mosaico da CRF42\_BF no LOS ALAMOS HIV Database.



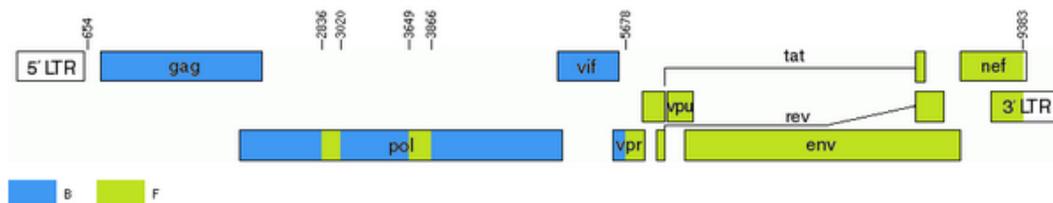
**CRF29\_BF** Cepa de referência : BREPM16704 Subtipo : B, F1



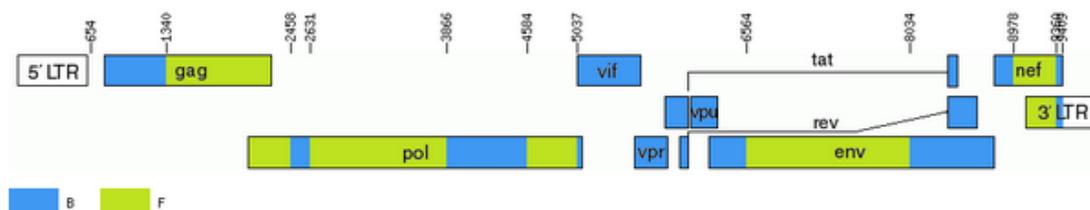
**CRF38\_BF** Cepa de referência: UY03\_3389 Subtipo : B, F1



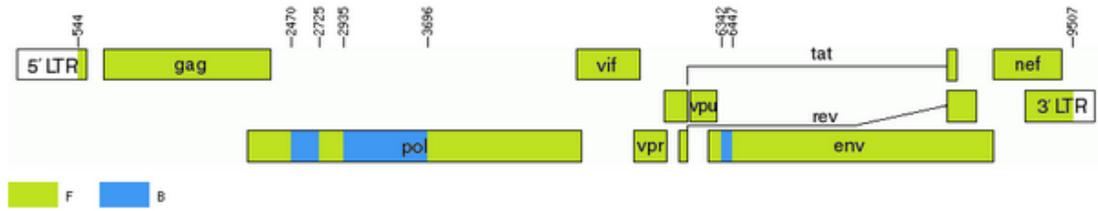
**CRF39\_BF** Cepa de referência : 03BRRJ103 Subtipo : B, F1



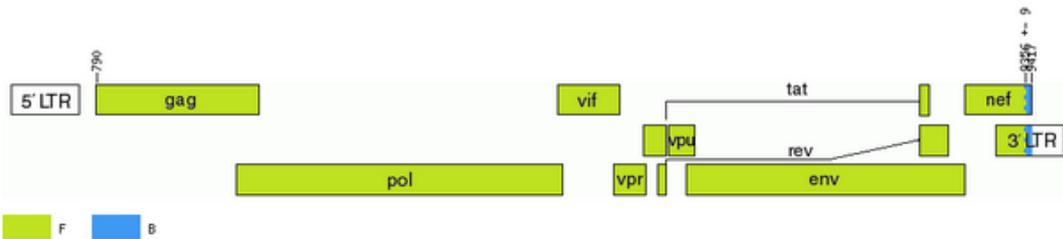
**CRF40\_BF** Cepa de referência : 05BRRJ055 Subtipo : B, F1



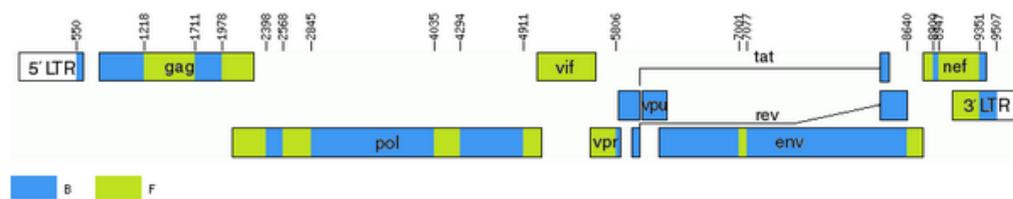
**CRF44\_BF** Cepa de referência : CH80 Subtipo : B, F1



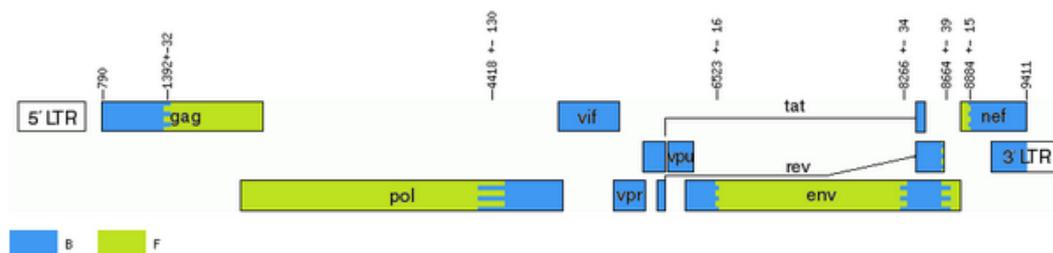
**CRF46\_BF** Cepa de referência : 01BR087 Subtipo : B, F1



**CRF47\_BF** Cepa de referência : P1942 Subtipo : B, F1



**CRF72\_BF** Cepa de referência: MG002 Subtipo : B, F1





Na figura 10, podemos visualizar que a maioria das CRFs BF brasileiras possui maior proporção de segmento genômico de origem F1, principalmente as recentemente identificadas.

A primeira recombinante BF encontrada na América do Sul, a CRF12\_BF, teve sua origem datada do início dos anos 1970s (TMRCA: 1969, IC95%:1946-1981), cuja data foi semelhante à introdução do subtipo F no continente (1969, IC95%:1959-1978) (DILERNIA et al., 2011). Desta forma, os autores concluíram que logo após o ingresso do HIV-1 F, o mesmo recombinou-se brevemente com o subtipo B, cuja circulação era mais antiga, originando as recombinantes BF. Leal et al. (2008) também observaram que, no Brasil, cepas BF surgiram quase simultaneamente à introdução do subtipo F no país. Isto pode explicar o por quê da América do Sul possuir uma prevalência bem maior desta recombinante do que o F “puro”.(DILERNIA et al., 2011; SANABANI et al., 2010).

Dados de Bello et al. (2010) são contraditórios aos de Dilernia et al. (2011) quanto à origem da CRF12\_BF. Os primeiros relatam que a epidemia 12\_BF originou-se em 1983 (1978-1988). Entretanto, Bello et al. (2010) defendem que seus resultados são consistentes com dados epidemiológicos da epidemia argentina, relatando a circulação de cepas 12\_BF em crianças em meados dos anos 1980s e a transmissão vertical desta variante entre 1987-1989. A importância do estudo do recombinante 12\_BF da Argentina está no fato da mesma possuir uma importante relação epidemiológica e evolutiva com outras recombinantes BF encontradas na América do Sul (Chile e Venezuela) e Espanha (SIERRA et al., 2005).

Embora Aulicino et al. (2011) descreveram uma diminuição da prevalência da CRF12\_BF na Argentina com o passar do tempo, entre 1986-2006, a maioria das URF\_BF identificadas (57%) ainda demonstravam um padrão CRF12\_BF-like. Apesar da CRF12\_BF demonstrar relações evolutivas com cepas BF de outros países, como relatado no parágrafo anterior, Thomson et al. (2004) revelaram que cepas BF brasileiras têm origem independente e, desta forma, não são relacionadas às CRF12\_BF. Além disso, eles verificaram que os recombinantes BF brasileiros são derivados de processos de recombinação independente entre várias cepas B e F do HIV-1, diferentemente ao ocorrido na Argentina. Entretanto, os mesmos autores hipotetizaram que a variante 12\_BF da Argentina tenha se originado do Brasil, a

partir de dados que demonstram a relação dos segmentos F das recombinantes argentinas com o HIV-1 F brasileiros e ao fato deste subtipo ser raramente identificado na Argentina na sua forma “pura”.

A alta diversidade e prevalência dos recombinantes BF na América do Sul e Brasil estão ligadas a possíveis fatores evolutivos ou epidemiológicos, tais como: maior fitness; maior transmissibilidade viral e contínua geração de URFs BF pela recombinação em indivíduos com infecção dupla pelo pelos subtipos B e F (DELGADO et al., 2010; SIERRA et al., 2005; SOARES DE OLIVEIRA et al., 2012).

Análises evolucionárias revelaram que as CRF28 e 29\_BF têm sua origem datada em 1988-1989 na epidemia brasileira e dada da história evolutiva dessas variantes revelam que as mesmas apresentaram um período inicial de crescimento exponencial na epidemia, seguido de decréscimo no número de infecções. Os autores relataram que a diminuição da prevalência das CRF28 e 29\_BF combina com a alta taxa de recombinação existente entre os subtipos B e F, assumindo, assim, que novas CRFs e URFs BF continuem a emergir na população brasileira (RISTIC et al., 2011).

Para nosso conhecimento, a identificação da circulação de recombinantes BF no Brasil ocorreu no Rio de Janeiro, em amostras coletadas em 1992, de dois indivíduos com ligações epidemiológicas (SABINO et al., 1994). Ramos et al. (1995) revelaram que a presença de recombinação BF (7.6%) e infecções duplas (3.6%) no Rio de Janeiro eram, desde tempos mais remotos, parte comum da epidemia do HIV-1, indicando uma circulação antiga destas variantes no Brasil. Outro fato importante foi relatado por Sanabani et al. (2006), que revelaram que entre 14 cepas caracterizadas como subtipo F, após amplificação de um fragmento genômico do vírus, 8 eram recombinantes BF ao ser analisado o genoma completo, denotando a alta frequência destas variantes.

### **2.3 Particularidades virológicas do subtipo F do HIV-1 e suas características epidêmicas no Brasil**

Sabe-se que a pandemia do HIV-1 é caracterizada por uma grande diversidade genética viral, encontrando-se vários subtipos, sub-subtipos e formas recombinantes (CRFs ou URFs) (EASTERBROOK et al., 2010; SANTOS & SOARES, 2010). Mas, além desta heterogeneidade, são verificadas diferenças regionais entre as prevalências das variantes virais nos diversos continentes e países. Além disso, a epidemiologia molecular do HIV-1 é um processo muito dinâmico, na qual alguns subtipos ou recombinantes podem, com o tempo, sobrepujar a prevalência de outras variantes que anteriormente eram majoritárias em alguma região (SANTOS & SOARES, 2010).

A prevalência dos subtipos não-B tem aumentado em todo o mundo, inclusive em áreas onde o HIV-1 B era predominante, como o Ocidente (ABECASIS, et al., 2013; SANTORO et al., 2012). No Brasil, esta tendência de disseminação dos subtipos não-B também é observada, havendo além do subtipo B, importantes frequências de outros subtipos e recombinantes em diversas regiões do país, tais como: Subtipo C e CRF31\_BC na região Sul (BRÍGIDO et al., 2007; GRÄF & PINTO, 2013), Recombinantes BF e subtipo C no Sudeste (ALCADE et al., 2012; DE SÁ FILHO et al., 2008; GUIMARÃES et al., 2010) e do subtipo F e recombinantes BF na região Nordeste (CAVALCANTI et al., 2012; SANTOS et al., 2011).

A diversidade do HIV-1 acarreta diferentes propriedades genotípicas e fenotípicas às variantes virais, rendendo-lhes distintas características quanto à transmissibilidade, progressão à doença, resistência aos antirretrovirais, dispersão populacional, fitness viral e padrões epidemiológicos (BELLO et al., 2007b; CARIDE et al., 2001; GIFFORD et al., 2007; PIMENTEL et al., 2013; SANTORO et al., 2012; TANURI et al., 1999). O subtipo F1 é um dos que possuem menos genomas disponíveis no Los Alamos HIV Database entre os subtipos mundialmente distribuídos, sendo superior em quantidade apenas em relação a variantes mais raras e restritas geograficamente, como a A2, H, J e K (LOS ALAMOS, 2014). Devido à sua menor proporção em países ocidentais mais desenvolvidos (ABECASIS et al., 2013) há um número limitado de dados sobre a epidemia do HIV-

1 F1. Entretanto, vários trabalhos, principalmente na América do Sul, abordam a correlação deste subtipo com resistência antirretroviral, características evolutivas, associação com determinadas categorias de exposição, influência na resposta a vacinas terapêuticas e na formação de recombinantes BF (BELLO et al., 2007b; DE SÁ FILHO et al., 2005; DUMANS et al., 2002; FERREIRA et al., 2012; MASCIOTRA et al., 2000).

Tanuri et al. (1999) relataram, em estudo realizado no Brasil, que em pacientes virgens de TARV havia igual sensibilidade entre o HIV-1 F e B para os IPs indinavir e saquinavir. Entretanto, em um artigo mais recente sobre padrão de resistência antirretroviral na Espanha, foi demonstrado que o subtipo F possuía mais mutações relacionadas à resistência aos IPs (L10V, M36I, I50V), quando comparado ao subtipo B (ANTA et al., 2013). Em outro trabalho, Caride et al. (2001) revelaram que a resistência aos IPs no subtipo B estava associada à mutação L90M, enquanto no F havia uma maior correlação com G48V e V82A/F. Diante desses resultados apontado uma maior resistência do HIV-1 F a alguns IPs, Krauchenco et al. (2009) observaram, *in vitro*, que a maior resistência do HIV-1 F aos IPs está no fato que suas proteases são significativamente menos susceptíveis à inibição por estas drogas, e o acúmulo de polimorfismos naturais na protease do subtipo F rende mais atividade catalítica à enzima, resultando numa maior viabilidade viral (KRAUCHENCO et al., 2009).

Por outro lado, um estudo realizado em São Paulo com indivíduos sob falha terapêutica, verificou-se que o subtipo F apresentava menor taxa de resistência a ITRNN comparado aos subtipos B e C (MUNERATO et al., 2010). Enquanto que Santoro et al. (2012), demonstraram que o subtipo F possuía maior proporção das mutações T215F e K219E, para ITRN, e Y181C para ITRNN, quando comparado ao HIV-1 B, embora nenhuma diferença quanto à frequência dos IPs foi detectada. Quanto aos inibidores de integrase, não foram encontradas mutações major de resistência no HIV-1 F no Brasil. (PASSAES et al., 2009).

Verificou-se que a razão de diferenças nucleotídicas sinônimas e não-sinônimas ( $d_S/d_N$ ) entre os subtipos B e F do gene da protease são semelhantes (TANURI et al., 1999). Por outro lado, Bello et al. (2007b) relataram que a divergência intra-subtipo aumenta constantemente em ambos os subtipos com o

passar do tempo. Os autores também observaram que havia um aumento tanto nas mutações sinônimas quanto nas não-sinônimas, indagando que o sucesso de uma vacina poderia diminuir continuamente com o tempo, dependendo do alvo aplicado.

Alguns estudos relacionam a presença do subtipo F1 com a transmissão heterossexual (MASCIOTRA et al., 2007; MONTANO et al., 2005). Além disso, no Brasil, é verificada uma alta taxa de recombinantes BF na epidemia, o que sugere uma alta frequência de infecções duplas entre os subtipos B e F, revelando a importância deste último na origem das formas recombinantes brasileiras (DE SÁ FILHO et al., 2005; GUIMARÃES et al., 2002).

A distribuição do subtipo F do HIV-1 na epidemia brasileira é bastante heterogênea. Além da grandeza geográfica do país, as proporções dos subtipos virais podem variar de acordo com a região genética utilizada na determinação de subtipagem, no ano de obtenção das amostras e com a categoria de exposição escolhida para a amostragem. Na região Sudeste, as taxas de prevalência do HIV-1 F variam de 4.8-12% (ALENCAR et al., 2013; BRÍGIDO et al., 2005; DE SÁ FILHO et al., 2008; EYER-SILVA & MORGADO, 2007; SANABANI et al., 2013; VALESCO-DE-CASTRO et al., 2014), na região Sul, de 1.2-9.8% (BRÍGIDO et al., 2007; GRÄF et al., 2011; SILVA et al., 2010; SILVEIRA et al., 2012), no Centro-Oeste, de 3.3-6.2% (CARDOSO et al., 2009; FERREIRA et al., 2011). Portanto, até o presente momento, para nosso conhecimento, maiores taxas foram detectadas na Região Norte (2.8-44.8%) (MACHADO et al., 2009; VICENTE et al., 2000) e Nordeste (1.8-37.7%) (ALENCAR et al., 2013; ARAÚJO et al., 2010; CAVALCANTI et al., 2007; CAVALCANTI et al., 2012; COUTO-FERNANDEZ et al., 1999; GADELHA et al., 2003; MEDEIROS et al., 2006; MONTEIRO et al., 2009; SANTOS et al., 2011).

#### **2.4 Particularidades da epidemia do HIV-1 na Região Nordeste**

Diversos estudos abordam a epidemiologia molecular do HIV-1 na Região Nordeste (tabela 2). É notável a observação que estes trabalhos concentram-se nos estados da Bahia, Ceará e Pernambuco.

A característica comum em todos os estados nos quais houve mais pesquisas relacionadas à determinação do subtipo viral do HIV-1 (Bahia, Ceará e Pernambuco) é o domínio da frequência do subtipo B em toda a região. Isto mostra que, não apenas no Brasil, mas também na Região Nordeste, o HIV-1 B é majoritário (ALENCAR et al., 2013; CAVALCANTI et al., 2007; INOCÊNCIO et al., 2009). Embora, a epidemia se mostra heterogênea, na região, com características peculiares nos principais estados estudados.

No Ceará, a principal característica epidêmica revelou-se com uma alta proporção do subtipo B, alcançando níveis sempre superiores a 80%, além disso, observou-se uma baixa frequência do subtipo F e recombinantes BF (ARRUDA et al., 2011; GADELHA et al., 2003). Na Bahia, a maioria dos trabalhos revelou uma alta proporção de recombinantes BF, com taxas comuns maiores de 10% (DOURADO et al., 2007; MONTEIRO et al., 2009; PEDROSO et al., 2007; SANTOS et al., 2009; SANTOS et al. 2011; SOARES et al., 2014). Em Pernambuco, trabalhos iniciais denotaram, como característica principal, a alta frequência do HIV-1 F, com taxas superiores a 20% (MEDEIROS et al., 2006; CAVALCANTI et al., 2007; CAVALCANTI et al., 2012), entretanto, esses estudos avaliaram sequências *pol* do HIV-1, o que pode ter subestimado a proporção de recombinantes. Recentemente, Pêsoa et al., (2014a) sequenciaram o genoma completo de 24 amostras caracterizadas previamente como F1 através da região *pol*, obtidas no estudo de Alencar et al., (2013) e os resultados evidenciaram a presença de duas novas CRFs, as CRFs 70 e 71\_BF, as primeiras identificadas em Pernambuco e em outros estados da Região Nordeste (figura 11).

Tabela 2 – Frequência dos subtipos do HIV-1 na Região Nordeste – Brasil e características dos estudos analisados.

<b>Autores/Ano</b>	<b>Cidade/ Estado</b>	<b>Ano de Amostragem</b>	<b>Tamanho da amostra (N)</b>	<b>Gene Viral</b>	<b>TARV / Nãive</b>	<b>Subtipos (%)</b>
Inocêncio et al. 2009 <sup>a</sup>	Salvador / BA	2007 / 2008	34	<i>Pol</i>	Naive	B (70) F (21) C (3) BF (3)
Alencar et al. 2013 <sup>a</sup>	Recife/ PE	2009 – 2011	110	<i>Pol</i>	Naive	B (73) F (24) C (2) BF (1)
Soares et al. 2014 <sup>a</sup>	Salvador / BA	2009 – 2010	47	<i>Pol</i>	Naive	B (70.2) F (14.9) C (4.3) BF (10.6)
Couto- Fernandez et al. 1999	Salvador / BA	1994 – 1996	126	<i>Env</i>	Naive	B (92.1) F (1.6) BC (0.8) BF (5.5)
Dourado et al. 2007	Salvador / BA	1998 – 2000	19	<i>env, pol, gag</i>	Naive	B (57.9) BF (10.5) ND (31.6)
Pedroso et al. 2007	Salvador / BA	2000 – 2004	166	<i>pol env</i>	Naive	B (84) F (8) C (2.5) BF (14) BC (0.5)
Santos et al. 2009	Feira de Santana / BA	2008 - 2009	52	<i>pol</i>	TARV / Naive	B (63.5) F (7.6) C (1.9) BF (26.9)
Monteiro et al. 2009	Salvador / BA	2002	261	<i>env, gag</i>	-	B (81.7) F (0.6) BF (17.1) BD (0.6)
Araújo et al. 2010	Salvador / BA	2006	61	<i>env, gag</i>	-	B (91.8) F (4.9) BF (3.3)
Santos et al. 2011	Salvador / BA	2006	57	<i>Pol</i>	TARV / Naive	B (78.9) F (5.3) BF (15.8)
Medeiros et al. 2006	Recife / PE	2002 – 2003	84	<i>Pol</i>	Naive	B (72.6) F (22.6) C (1.2) BF (3.6)

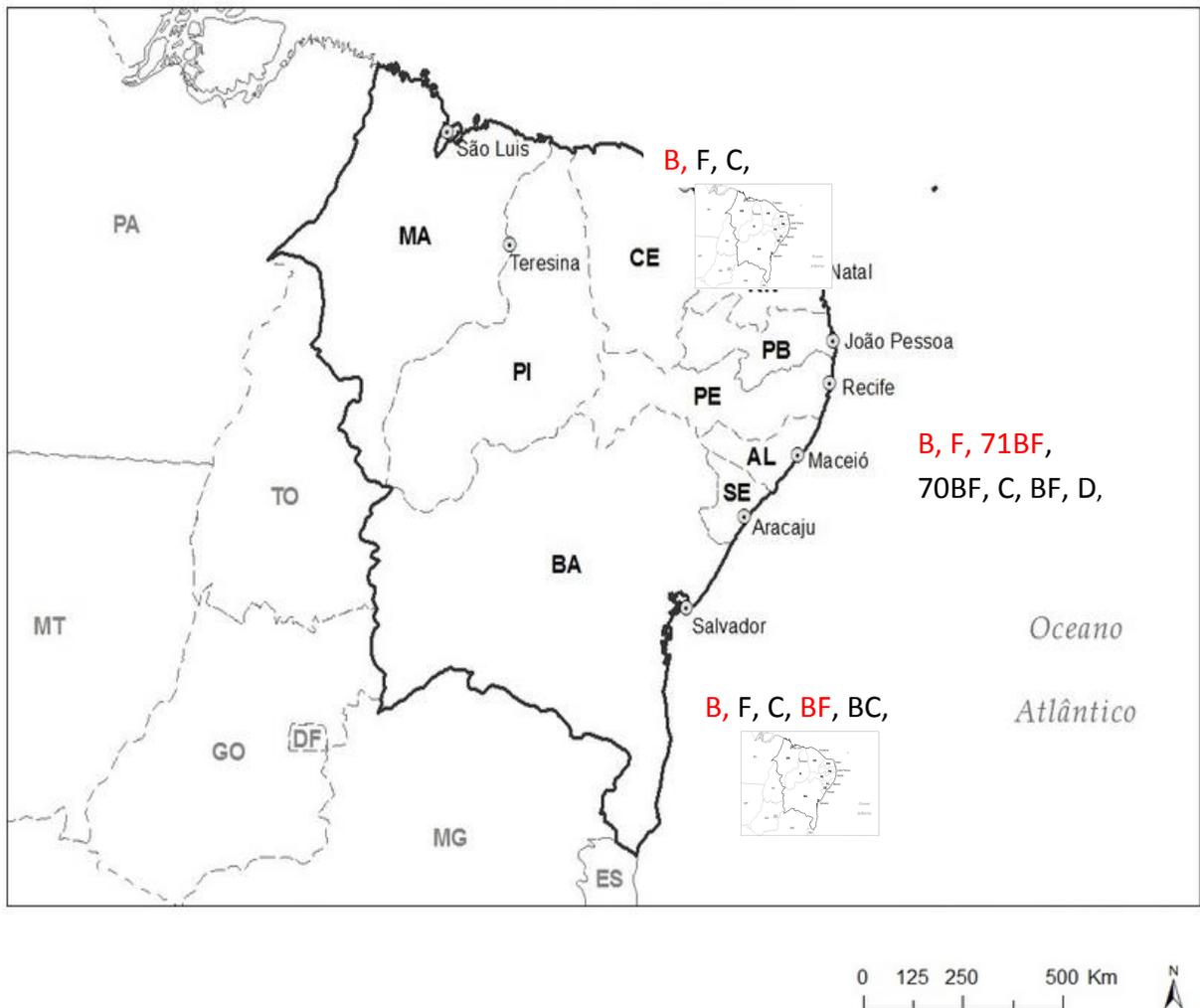
<b>Autores/Ano</b>	<b>Cidade/ Estado</b>	<b>Ano de Amostragem</b>	<b>Tamanho da amostra (N)</b>	<b>Gene Viral</b>	<b>TARV / Näive</b>	<b>Subtipos (%)</b>
Cavalcanti et al. 2007	PI, CE, RN, PB, PE e AL	2002-2004	502	<i>Pol</i>	TARV	B (82.4) F (11.8) C (1.0) BF (4.6) D (0.2)
Cavalcanti et al. 2012	Recife / PE	2007 – 2009	130	<i>Pol</i>	Naive	B (56.9) F (37.7) C (3.1) BF (2.3)
Gadelha et al. 2003	Fortaleza / CE	2000	149	<i>env, gag</i>	-	B (81.2) F (2.7) BF (2.7) ND (13.4)
Arruda et al. 2011	Fortaleza / CE	2008 – 2009	64	<i>Pol</i>	Naive	B (85.1) F (8.1) C (5.4) BF (1.4)
Pêsoa et al. 2014 <sup>a</sup>	Recife / PE	2007-2011	24/110 <sup>b</sup>	Genoma Completo	Naive	71BF (10) <sup>c</sup> 70BF (3.6) BF (6.4) B (73.6) F1 (0.9) C (1.8)

<sup>a</sup> Os referidos trabalhos fazem parte de um estudo de abrangência nacional.

<sup>b</sup> Pêsoa et al. (2014a) analisaram 24 amostras previamente classificadas como F1 oriundas do estudo de Alencar et al. (2013), o qual sequenciou 110 amostras de Recife – PE.

<sup>c</sup> Frequências calculadas com base no número de sequências do trabalho original onde as amostras foram coletadas. Duas amostras foram excluídas da análises por não terem seu genoma completo sequenciado.

Figura 11 – Distribuição geográfica dos subtipos do HIV-1 na Região Nordeste – Brasil. Em vermelho estão destacados os subtipos de maior prevalência.



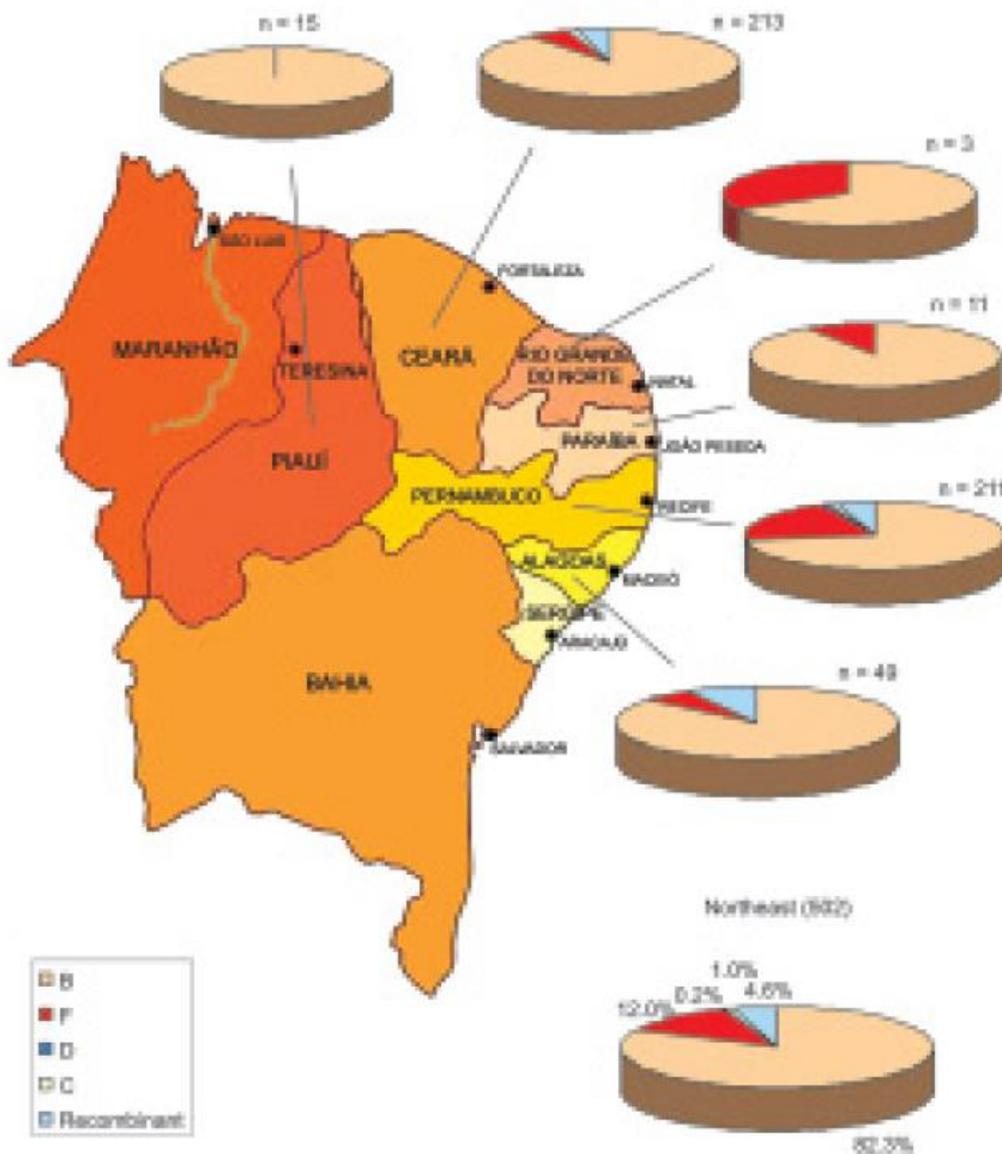
Fonte: [http://www.colinstattoos.com/mapa-regiao-nordeste-do-brasil/mapasparacolorir\\*com\\*br%7Cmapa%7Cregiao%7Cnordeste%7Cregiao-nordeste-nomes-capitais\\*.jpg/peetee\\*mine\\*nu%7CNordeste-mapa%7C/](http://www.colinstattoos.com/mapa-regiao-nordeste-do-brasil/mapasparacolorir*com*br%7Cmapa%7Cregiao%7Cnordeste%7Cregiao-nordeste-nomes-capitais*.jpg/peetee*mine*nu%7CNordeste-mapa%7C/)

Ainda a respeito aos dados da tabela 2, observa-se que há um crescimento na frequência do subtipo F no Ceará e em Pernambuco, ao ser comparado à taxa dos distintos subtipos com o período de amostragem, juntamente com uma ligeira diminuição no número de recombinantes BF (ALENCAR et al., 2013; ARRUDA et al., 2011; CAVALCANTI et al., 2012; GADELHA et al., 2003; MEDEIROS et al., 2006). Todavia, como discutido no parágrafo anterior, o aumento na frequência do HIV-1 F seja, na verdade, uma maior dispersão de URFs ou CRFs BF, como demonstrado

em Pêsoa et al., (2014a). Na Bahia, verifica-se uma diminuição da taxa do HIV-1 B observada nos estudos cujas datas de amostragem variam entre 2007 e 2010, quando comparados a trabalhos mais antigos. Também é observada uma elevada circulação de BF em todos os períodos, portanto, a diferença entre o HIV- 1 B e não-B, naquele estado, diminuiu nos últimos anos (DOURADO et al., 2007; MONTEIRO et al., 2009; PEDROSO et al., 2007; SANTOS et al., 2009; SANTOS et al. 2011; SOARES et al., 2014).

Cavalcanti et al. (2007) realizaram o trabalho com maior número de amostras da região Nordeste para a análise de resistência antirretroviral (N=516) e subtipagem (N=502) (figura 12). Foram incluídos os estados do Piauí (PI), Ceará (CE), Rio Grande do Norte (RN), Paraíba (PB), Pernambuco (PE) e Alagoas (AL). Os autores enfatizaram a alta frequência do HIV-1 F em PE (21.9%). Interessante notar que, as outras maiores frequências para este subtipo foram na PB (9.9%) e AL (6.7%), estados fronteiriços de PE. O Ceará apresentou apenas 6% de cepas F. Desta forma, podemos denotar a importância em se analisar em maior profundidade estas cepas, seja para sua melhor caracterização, seja para um maior conhecimento de seus processos evolutivos.

Figura 12 – Distribuição dos subtipos do HIV-1, entre 561 pacientes em falha terapêutica, em seis estados da região Nordeste (Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco e Alagoas).



Fonte: Cavalcanti et al. (2007).

Assim como observado no Brasil, um estudo realizado por Dourado et al. (2007) na cidade de Salvador – BA, identificou que a infecção pelo HIV-1 estava associada ao gênero masculino e à renda familiar baixa, indicando uma epidemia tendendo à heterossexualização e pauperização (BRITO, CASTILHO &

SZWARCWALD, 2000; DOURADO et al., 2007). Entretanto, a região Nordeste guarda importantes diferenças quanto à epidemia do HIV-1 em adição às aquelas mencionadas nos parágrafos anteriores. A primeira relaciona-se à resistência primária aos antirretrovirais, isto é, à resistência transmitida. Pernambuco apresentou as menores taxas de resistência primária da região Nordeste, com 3.6% e 4.6% nos estudos de Medeiros et al. (2006) e Cavalcanti et al. (2012), respectivamente. Taxas maiores foram detectadas no Ceará, 9.5% (ARRUDA et al., 2011), e na Bahia, 18.9% (PEDROSO et al., 2007) e 17% (SOARES et al., 2014). Pedroso et al. (2007) ainda identificaram uma alta frequência de resistência primária em crianças infectadas por transmissão vertical em Salvador - BA (26.9%). Quanto ao tipo de resistência primária, em Pernambuco, Medeiros et al. (2006) detectaram apenas resistência aos ITRN, sendo duas das três cepas com esta característica classificadas como F. Posteriormente, Cavalcanti et al (2012) relataram resistência às 3 principais classes de antirretrovirais neste estado (ITRN, ITRNN e IP), sendo a maioria do subtipo B. Na Bahia, Pedroso et al (2007) e Soares et al. (2014) demonstraram resistência aos ITRN, ITRNN e IP, sobressaindo-se a alta taxa de resistência primária aos IPs (5%). Por fim, o Ceará também mostrou resistência a essas 3 principais classes, e assim como a Bahia, o subtipo predominante nas cepas com mutações transmitidas foi o B.

Cavalcanti et al. (2007), em seu estudo sobre resistência antirretroviral em pacientes em falha terapêutica da região Nordeste, relataram que não havia diferença estatisticamente significativa entre a presença de mutações e os subtipos B e F. Entretanto, os autores apontaram que algumas mutações foram mais associadas ao subtipo F: 211 para ITRN; 110 para ITRNN e 20, para os IPs.

Em relação a outras características epidemiológicas, Cavalcanti et al. (2007) verificaram que o subtipo F estava associado estatisticamente ao sexo feminino ( $p < 0.001$ ), além disso, Santos et al. (2009) demonstraram que subtipos não-B, representados pelos F e BF, estavam associadas à co-infecção com HTLV e a presença de vaginites em uma amostragem que incluía apenas mulheres. Contudo, não foram observadas outras diferenças epidemiológicas, clínicas e laboratoriais entre esses subtipos em alguns estudos realizados no Nordeste do Brasil (CAVALCANTI et al., 2007; CAVALCANTI et al., 2012; LACERDA et al., 2007).

Estudos filogenéticos baseados na região *pol* do HIV-1 foram realizados em várias partes do mundo, entretanto, os mesmos focaram determinados subtipos, rotas de transmissão, origens e regiões geográficas, com poucas informações sobre subtipos mais raros. Portanto, revela-se a importância na elaboração de trabalhos levando em consideração a abordagem filogenética e epidemiológica de outros subtipos menos estudados e em regiões geográficas particularmente afetadas pela epidemia.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Realizar análise filogenética e evolutiva de sequências da região *pol* do HIV-1, relacionando-as com informações sociodemográficas e laboratoriais em pacientes diagnosticados em HIV/aids no estado de Pernambuco – Nordeste do Brasil.

#### **3.2 Objetivos específicos:**

- Identificar os subtipos e formas recombinantes que compõe a epidemia do HIV-1 em Pernambuco, Nordeste – Brasil, por inferências filogenéticas.
- Determinar o padrão de recombinação genética entre as formas recombinantes identificadas.
- Analisar a associação das características sociodemográficas com os subtipos B e não-B do HIV-1.
- Analisar a associação das características clínicas e laboratoriais entre os subtipos B e não-B do HIV-1.
- Identificar as mutações de resistência aos antirretrovirais encontradas entre as sequências e avaliar o padrão de susceptibilidade às três principais classes de antirretrovirais (ITRN, ITRNN e IP).

- Identificar as mudanças da pressão seletiva positiva nos códons das sequências do HIV-1 B e F avaliadas quanto ao status de infecção, contagem de células T CD4+ e categoria de exposição.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 População e local do estudo

O estado de Pernambuco, na região Nordeste do Brasil, é banhado pelo oceano Atlântico e possui uma população estimada de mais de 9 milhões e 200 mil pessoas, distribuídas numa área de 98148 km<sup>2</sup>, ocupando a sétima posição entre os estados mais populosos do país (<http://www.ibge.gov.br/estadosat/perfil.php?sigla=pe>).

Cento e sessenta e nove sequências *pol* do HIV-1 foram obtidas de dois estudos anteriores (MEDEIROS et al., 2006; CAVALCANTI et al., 2012), cujos objetivos principais foram a avaliação da resistência primária aos antirretrovirais. Amostras sanguíneas foram obtidas de pacientes atendidos no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco, coletadas no período de 2002 a 2003 (MEDEIROS et al., 2006) e de indivíduos que procuraram espontaneamente os cinco maiores Centros de Testagem e Aconselhamento (CTAs) em DST/aids da Região Metropolitana do Recife, Estado de Pernambuco – Nordeste do Brasil, coletadas no período de 2007 a 2009 (CAVALCANTI et al., 2012). Sessenta e quatro sequências foram obtidas do primeiro estudo (MEDEIROS et al., 2006) e cento e cinco do segundo (CAVALCANTI et al., 2012). Os pacientes eram oriundos de diversas cidades da região metropolitana do Recife (capital do estado de Pernambuco) ou de cidades do interior.

A seleção das amostras seguiu alguns critérios: os pacientes foram diagnosticados para a infecção pelo HIV-1 de acordo com as recomendações do Ministério da Saúde do Brasil e todos eram virgens de terapia antirretroviral. A amostragem foi de conveniência e originada de diferentes populações:

heterossexuais, homens que fazem sexo com homens (HSH), profissionais do sexo, gestantes, usuários de drogas injetáveis (UDI), usuários de drogas não-injetáveis (UDNI), parceiros de pessoas HIV-positivas e hemotransfundidos.

## **4.2 Variáveis do estudo**

### **4.2.1 Variável dependente**

O subtipo viral do HIV-1 foi determinado como dependente e categorizado com subtipo B e subtipo não-B. Denominou-se como subtipos não-B todos as outras variantes virais que não foram caracterizadas como pertencentes ao subtipo B pela inferência filogenética, foram elas: Subtipos C, F1, H e as formas recombinantes AG, BF e BC.

### **4.2.2 Variáveis independentes**

Todas as informações foram analisadas de forma anônima e obtidas dos bancos de dados das pesquisas supracitadas (MEDEIROS et al., 2006; CAVALCANTI et al., 2012). Informações sociodemográficas e comportamentais adicionais foram retiradas dos arquivos médicos dos locais onde os indivíduos foram diagnosticados (Hospital das Clínicas ou CTAs).

As variáveis independentes foram agrupadas nas seguintes categorias: Sociodemográficas e laboratoriais.

QUADRO 1 - Variáveis sociodemográficas.

<b>Variável</b>	<b>Definição</b>	<b>Categorização</b>
Idade <b>(idade)</b>	Expressa em anos. Correspondente ao período da coleta.	-
Data de obtenção da amostra <b>(dataamseq)</b>	Data correspondente em que a amostra para genotipagem do HIV-1 deu entrada no LACEN-PE.	-
Data do diagnóstico da infecção pelo HIV-1 <b>(datadiag)</b>	Data correspondente à primeira confirmação sorológica para infecção pelo HIV-1.	-
Gestação <b>(gestação)</b>	Paciente em gestação no momento da coleta para genotipagem.	1- Sim 2- Não 3- Não se aplica
Sexo <b>(sexo)</b>	Sexo biológico do paciente.	1- Masculino 2- Feminino 3- Não informado
Escolaridade <b>(escol)</b>	Expressa em anos de educação formal.	1- Analfabeto 2- < 8 anos 3- >= 8 anos 4- Não informado
Local de residência <b>(cidade)</b>	Cidade onde o indivíduo reside.	1- Recife 2- Olinda 3- Paulista 4- Jaboatão dos Guararapes 5- Cabo de Santo Agostinho 6- Outra cidade na RMR Qual? _____ 7- Outra cidade fora da RMR Qual? _____ 8- Não informado.
Local de origem das amostras <b>(origamostra)</b>	Locais (CTAs ou Hospital) onde as amostras dos pacientes, para realização da genotipagem do HIV-1, foram	1- CTA Recife 2- CTA Olinda

	coletadas.	<ul style="list-style-type: none"> <li>3- CTA Paulista</li> <li>4- CTA Jaboatão</li> <li>5- CTA Cabo</li> <li>6- Hospital das Clínicas</li> </ul>
<p>Categoria de exposição</p> <p><b>(expos)</b></p>	Tipo de prática/comportamento de risco relatado pelos pacientes.	<ul style="list-style-type: none"> <li>1- HSH / masculino</li> <li>2- HTS / masculino</li> <li>3- HTS / feminino</li> <li>4- Parceiro de HIV+</li> <li>5- Profissional do sexo</li> <li>6- UDI</li> <li>7- UDNI</li> <li>8- Transfusão de sangue</li> <li>9- Não informado</li> </ul>
<p>Inserção no mercado de trabalho.</p> <p><b>(merctrab)</b></p>	Tipo de vínculo com o mercado de trabalho.	<ul style="list-style-type: none"> <li>1- Empregado</li> <li>2- Autônomo (informal)</li> <li>3- Desempregado</li> <li>4- Estudante</li> <li>5- Dona de casa</li> <li>6- Aposentado</li> <li>7- Não informado</li> </ul>
<p>Estado civil</p> <p><b>(estcivil)</b></p>	Estado civil legal do indivíduo no tempo da coleta das amostras	<ul style="list-style-type: none"> <li>1- Solteiro</li> <li>2- Casado/Relação estável</li> <li>3- Separado/divorciado</li> <li>4- Viúvo</li> <li>5- Não informado</li> </ul>

CTA: Centro de Testagem e Aconselhamento em DST/AIDS; HSH: Homens que fazem sexo com homens; HTS: Heterossexuais; RMR: Região Metropolitana do Recife; UDI: Usuários de drogas injetáveis; UNDI: Usuários de drogas não-injetáveis.

QUADRO 2 - Variáveis laboratoriais.

<b>Variável</b>	<b>Definição</b>	<b>Categorização</b>
Determinação de infecção recente pelo HIV-1 <b>(infrecente)</b>	Caracterização de infecção recente/tardia através do ensaio de captura BED (BED – CEIA) (Calypte Biomedical Corporation, Estados Unidos).	1- Infecção recente (Recent seroconversion) 2- Infecção tardia (Long-term seroconversion) 3- Não realizado / não se aplica
Contagem de células T CD4+ <b>(cd4)</b>	Número de linfócitos T CD4+ circulantes no sangue periférico. Resultados expressos em nº células/ml.	-
Data da realização da contagem de células T CD4+ <b>(datacd4)</b>	Data mais próxima à data de obtenção da amostra para sequenciamento, em que a contagem de células T CD4+ foi realizada.	-
Carga viral <b>(cvhiv)</b>	Presença de RNA viral circulante no sangue periférico. Resultados expressos em nº cópias RNA viral/ml.	-
Data da realização da carga viral <b>(datacv)</b>	Data mais próxima à data de obtenção da amostra para sequenciamento, em que a determinação da carga viral foi realizada.	-
Deteção de infecção presente/passada pelo HBV em pacientes HIV positivos <b>(hbvhiv)</b>	Deteção do Anti-HBc total em pacientes com sorologia prévia, confirmada para HIV	1- Sem co-infecção 2- Co-infectados 3- Não-realizado/não-disponível
Co-infecção HCV-HIV <b>(hcvhiv)</b>	Resultado sorológico positivo para o HIV, juntamente com um teste sorológico Anti-HCV reagente e deteção do HCV-RNA (CONCENSO SOCIEDADE PAULISTA DE INFECTOLOGIA, 2004)	1- Sem co-infecção 2- Co-infecção
Presença de HCV-RNA <b>(hcvrna)</b>	Utilização de ensaios qualitativos para a deteção de HCV-RNA.	1- HCV-RNA negativo 2- HCV-RNA positivo
Carga viral HCV-RNA <b>(cargahcv)</b>	Quantificação do HCV-RNA no sangue periférico. Resultados expressos em UI/ml.	-

<p>Co-infecção HTLV-HIV <b>(htlvhiv)</b></p>	<p>Resultado sorológico positivo para HIV, juntamente com teste imunoenzimático repetidamente positivo para HTLV com confirmação da soro-reatividade através de Western blot (WB) (SANTOS E LIMA, 2005).</p>	<p>1- Sem co-infecção 2- Co-infecção</p>
<p>Co-infecção Sífilis-HIV <b>(sífilis)</b></p>	<p>Resultado sorológico positivo para HIV, juntamente com teste treponêmico e não-treponêmico reagentes para sífilis (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).</p>	<p>1- Sem co-infecção 2- Co-infecção</p>
<p>Título do VDRL <b>(vdrl)</b></p>	<p>Determinação da titulação de anticorpos da técnica de VDRL quantitativa</p>	<p>1- ( ) 1/2 2- ( ) 1/4 3- ( ) 1/8 4- ( ) 1/16 5- ( ) 1/32 6- ( ) 1/64 7- ( ) 1/128 8- ( ) 1/256 9- ( ) Não realizado / não disponível. Motivo: _____</p>

HBV: Vírus da Hepatite B; HCV: Vírus da Hepatite C; HTLV: Vírus Linfotrófico de células T Humanas.

Pesquisas sorológicas para a detecção de infecção para o HBV, HCV, HTLV e sífilis foram realizadas nas amostras coletadas no período de 2007-2009. Dados para o BED-CEIA estavam disponíveis apenas para as amostras de 2007-2009. A contagem de células T CD4+ e quantificação de carga viral do HIV-1 que não constavam no banco de dados das pesquisas foram obtidas dos registros do Laboratório Central de Saúde Pública do Estado de Pernambuco (LACEN-PE), sendo coletados aqueles resultados mais próximos da data de diagnóstico para a infecção pelo HIV-1 do indivíduo. Todos os dados foram coletados por um questionário padronizado (APÊNCIDE A). A contagem de linfócitos T CD4+ foi realizada por citometria de fluxo (FACSCalibur, Becton Dickison, USA) e a quantificação das cargas virais foram obtidas pelas metodologias do nucleic acid

sequence-based amplification assay (NASBA, Organon Teknika, Netherlands) e branched chain DNA (bDNA) assay (VERSANT HIV-1 RNA 3.0 assay, Siemens, USA). O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (CCS-UFPE) sob o número 114.722 (ANEXO A).

### **4.3 Sequenciamento do gene da polimerase (*pol*) do HIV-1**

Inicialmente o RNA viral foi extraído do plasma utilizando o QIAamp<sup>®</sup> RNA Mini kit (Qiagen, Alemanha). O sequenciamento da protease inteira (PR) e parte da transcriptase reversa (TR) do gene da polimerase (*pol*) do HIV-1 foi realizado pelo ViroSeq<sup>™</sup> HIV-1 Genotyping System (Abbott Laboratories, US) (MEDEIROS et al., 2006) e TRUGENE<sup>®</sup> HIV-1 Genotyping Assay (Siemens Diagnostics, US) (CAVALCANTI et al., 2012), e analisados pelo sequenciador automático DNA ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems, US) e através do OpenGene<sup>®</sup> Sequencing System (Siemens Diagnostics, US), respectivamente.

Resumidamente, as etapas da técnica envolvem: a preparação das amostras para obtenção do RNA viral; a transcrição reversa; a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) propriamente dita; e a reação de sequenciamento, seguido pela detecção automática das sequências através da fluorescência emitida pelos marcadores terminadores de cadeia. Todos os procedimentos metodológicos seguiram as instruções dos fabricantes. Fragmentos de 918 bp (pares de bases) foram obtidos, englobando a protease e parte da transcriptase reversa, cobrindo aproximadamente dois terços da mesma, correspondendo às posições 2262 – 2549 da protease e 2661 – 3290 da transcriptase reversa relativa a cepa de referência HXB2 (número de acesso no Genbank: K03455).

#### 4.4 Análise filogenética

As sequências *pol* da pesquisa foram primariamente analisadas pelo REGA HIV-1 & 2 Automated Subtyping Tool (Version 2.0) (<http://www.bioafrica.net/regagenotype/html/subtypinghiv.html>) para determinação preliminar da classificação do subtipo viral. O REGA é uma ferramenta de bioinformática que utiliza métodos filogenéticos para a determinação do subtipo em sequências específicas, através da metodologia de recombinação bootscanning, que envolve a construção de árvores neighbor-joining em partições dos fragmentos genéticos ao longo do alinhamento e a comparação destes fragmentos com sequências de referência (DE OLIVEIRA et al., 2005; ALCÂNTARA et al., 2009). Uma pesquisa individual das sequências do estudo foi realizada com o HIV BLAST ([http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/BASIC\\_BLAST/basic\\_blast.html](http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/BASIC_BLAST/basic_blast.html)). O HIV BLAST constitui um banco de dados com sequências de DNA do HIV-1, e as sequências mais similares comparadas às nossas foram obtidas para avaliação filogenética adicional (ALTSCHUL et al., 1997). Além disso, várias sequências de referências foram obtidas pelo HIV sequence database do Los Alamos (<http://www.hiv.lanl.gov/components/sequence/HIV/search/search.html>).

Os alinhamentos compostos pelas sequências do estudo e as sequências de referência obtidas nos bancos de dados supracitados, foram realizados pelo programa CLUSTAL X (THOMPSON et al., 1997), seguido de edição manual através do BioEdit software (HALL et al., 1999), no qual foram excluídos sítios com gaps ou ambiguidades. Vários alinhamentos foram construídos para as diversas análises filogenéticas, englobando: sequências da pesquisa, sequências similares retiradas do BLAST e sequências de referência obtidas do HIV sequence database do Los Alamos.

Os modelos de substituição nucleotídica para cada alinhamento foram inferidos adotando-se os critérios do likelihood ratio test (LRT) com o Bayesian Information Criterion (BIC) utilizando o programa MEGA version 5 (TAMURA et al., 2011), e o General Time Reversible com distribuição Gama e taxa de variação entre os sítios invariantes (GTR+G+I) foi o principal modelo evolutivo escolhido para os diversos alinhamentos. As inferências filogenéticas foram realizadas a partir dos

métodos de distância genética de Neighbor-joining (NJ) e o de máxima verossimilhança (Maximum-likelihood - ML) implementados no MEGA 5 e o suporte estatístico da topologia das árvores foram avaliados por 1000 replicatas (bootstrap). As árvores filogenéticas geradas puderam ser visualizadas no Figtree versão 1.3.1.

#### **4.5 Análise de Recombinação intersubtipo**

Após análise de subtipagem, as inferências filogenéticas foram realizadas e a identificação e a caracterização de possíveis recombinantes do HIV-1 foi obtida da seguinte forma:

A) Inicialmente, árvores filogenéticas foram inferidas pelo método de distância NJ, apenas com sequências de referência correspondentes aos nove subtipos do grupo M do HIV-1, obtendo ótimos suportes bootstrap. Sequências da pesquisa foram avaliadas em seus padrões de agrupamento com as sequências de referência e bootstraps obtidos. Se alguma sequência estudada agrupou-se fora de qualquer cluster dos subtipos de referência (padrão externo), apresentaram um padrão basal aos mesmos ou diminuía o suporte bootstrap para menos que 70%, eram consideradas conflitantes e retiradas para análises mais detalhadas de recombinação. As árvores de NJ foram construídas seguindo o modelo evolutivo de Kamura-2-parâmetros, adotando-se um bootstrap de 1000 como suporte dos ramos. Em seguida, árvores de ML foram inferidas com todas as sequências da pesquisa e cepas de referência que permaneceram após o screening com a metodologia NJ, a fim de confirmar a topologia e suporte dos clados. A inferência filogenética por ML foi realizada com o modelo de substituição nucleotídica GTR+G+I, conforme descrito. Ambas as metodologias, NJ e ML, foram realizadas no software MEGA5.

A posterior caracterização dos recombinantes foi demonstrada pelo RIP, BLAST GENOTYPING e SIMPLOT.

- B) O Recombinant Identification Program (RIP 3.0) (<http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/RIP/RIP.html>) identifica recombinação intersubtipo do HIV-1 pelo do cálculo de similaridade entre as sequências do estudo e cepas de referência contidas no software em cada sliding window, que pode ser determinado pelo pesquisador durante a análise. Para isto foi utilizado um window size de 200bp e um nível de confiança (confidence threshold) de 90%, com remoção de todos os gaps (stripped all gaps). O cálculo de similaridade é realizado através do método de p-distância, além disso, o programa disponibiliza um gráfico (plot) de similaridade, no qual o eixo y corresponde à porcentagem de similaridade entre as sequências do estudo e as de referência e o eixo x, à posição dos nucleotídeos das sequências investigadas (SIEPEL, et al. 1995).
- C) O BLAST Genotyping (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genotyping/formpage.cgi>) utiliza uma metodologia (sliding window) que auxilia na identificação do genótipo de sequências virais. Para isto, cada sequência estudada é comparada à sequências de referência de um vírus particular. Scores são plotados para cada sequência de referência nas sliding Windows. O banco de dados: Human Immunodeficiency Virus 1 (HIV-1) 2009 – RefSet foi selecionado para esta análise.
- Ambas as metodologias (RIP e BLAST Genotyping) ajudaram na orientação e seleção de sequências de referências para análise no SIMPLOT software.
- D) As análises de bootscanning foram feitas pelo SIMPLOT software versão 3.5.1 (LOLE et al., 1999). O bootscanning é uma metodologia que emprega métodos filogenéticos para a identificação de recombinantes, nele há a construção de árvores NJ suportadas estatisticamente por valores bootstrap em cada partição sliding window determinada no início da análise pelo pesquisador. Foram adotados os seguintes parâmetros: modelo de substituição nucleotídica F84 com suporte de 1000 bootstrap, uma sliding window de 200bp movendo-se a um step size de 20bp, nível de confiança de 90% e razão das taxas de transição/transversão determinadas empiricamente para cada alinhamento avaliado. Gaps foram removidos automaticamente do alinhamento. Sequências foram consideradas recombinantes quando apresentavam um bootstrap de 70%, no mínimo, para mais de um subtipo do

HIV-1 ao longo da cadeia nucleotídica. Sequências que não alcançavam este valor de 70% de bootstrap ou que apresentavam ambiguidades entre subtipos na mesma região genômica em grandes segmentos foram consideradas mal resolvidas e extraídas da pesquisa. O SIMPLOT software fornece um gráfico no qual o eixo y é representado pelo número de árvores permutadas correspondentes ao subtipo determinado e o eixo x correspondente à posição dos nucleotídeos no alinhamento da sequência avaliada. As sequências de referência utilizadas para a análise no SIMPLOT estão do apêndice B. A metodologia do jumping profile Hidden Markov Model (jpHMM) (ZHANG et al., 2006) foi utilizada em conjunto com o SIMPLOT software para a determinação da estrutura em mosaico dos recombinantes BF identificados. A jpHMM é uma abordagem probabilística utilizada para comparar uma sequência a um alinhamento múltiplo, particularmente útil no estudo dos genomas recombinantes.

#### **4.6 Diagnóstico das co-infecções**

O diagnóstico laboratorial das infecções para o HBV, HCV, HTLV e sífilis foi realizado em 97/105 (92.4%) das amostras oriundas dos anos de 2007-2009. Não havia alíquotas de plasma disponíveis para os anos de 2002/2003. Amostras sanguíneas foram coletadas em tubos com EDTA e após centrifugação, alíquotas de plasma foram separadas e estocadas a -70°C em freezers do LACEN-PE .

Para o diagnóstico de infecção presente e/ou passada do HBV foram realizadas a pesquisa sorológica do HBsAg e do Anti-HBc total (Architect System, Abbott Diagnostic Division, Ireland). Todos os resultados reagentes, neste screening primário, foram retestados por outra metodologia (Elecsys Cobas Assay, Roche Diagnostics, USA). Resultados discordantes estavam relacionados com reação fraca ou limítrofe (zona cinzenta) na primeira testagem (Architect System, Abbott Diagnostic Division, Ireland) e não reagentes na segunda (Elecsys Cobas Assay, Roche Diagnostics, USA), sendo considerados não reagentes.

A metodologia do Architect System baseia-se em um imunoenensaio de micropartículas por quimioluminescência (CMIA), em que micropartículas paramagnéticas são revestidas com anticorpos específicos ou antígenos recombinantes, assim os anticorpos ou antígenos pesquisados na amostra do paciente ligam-se a estas micropartículas e, posteriormente, há a ligação com conjugados de anticorpos marcados com acrídínio (composto quimioluminescente) ao complexo anterior, em seguida, há a sua ativação por soluções ativadoras e pré-ativadores, liberando luz. Existe uma relação direta entre a quantidade de antígenos ou anticorpos da amostra e a quantidade de luz medida, através de unidades de luz relativas (RLUs) (Architect System, 2012). Enquanto que no Elecsys Cobas Assay há o emprego de um imunoenensaio eletroquimioluminescente (ECLIA), cuja metodologia baseia-se na adição de antígenos ou anticorpos biotinilados para a ligação com os mesmos da amostra do paciente, em seguida, há a sua ligação com o rutênio, formando um complexo “sanduíche”, o qual liga-se a micropartículas revestidas com estreptavidina, cuja mistura é aspirada para dentro de uma célula reativa, onde as micropartículas são magneticamente capturadas na superfície de um eletrodo, o qual aplica uma voltagem que induz emissão de quimioluminescência, medida por um fotomultiplicador (COBAS®, 2010).

Para a infecção pelo HCV, realizou-se o screenig sorológico para determinação do anti-HCV por CMIA (Architect System, Abbott Diagnostic Division, Ireland) e, em seguida, para os resultados reagentes, a quantificação do HVC-RNA utilizando a metodologia da PCR em tempo real (COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, Roche Diagnostic, Germany), a qual permite a preparação automatizada das amostras, seguida por amplificação e detecção automatizada por PCR do RNA alvo e da sonda oligonucleotídica específica duplamente marcada e específica para o alvo (COBAS®, 2011).

Para determinação da infecção sífilítica, o diagnóstico sorológico foi realizado com um teste treponêmico utilizando a metodologia CMIA (Architect System, Abbott Diagnostic Division, Ireland). Os resultados reagentes foram retestados com um ensaio não-treponêmico (Venereal Disease Research Laboratory – VDRL, Wiener Lab, Argentina), e os casos de resultados conflitantes entre os dois testes (CMIA e VDRL) foram reanalisados com outro teste treponêmico empregando a técnica de hemaglutinação indireta para detecção de anticorpos anti-*Treponema pallidum*

(Syphilis TPHA, HUMAN Diagnostic, Germany), conforme fluxograma estabelecido pelo Ministério da Saúde do Brasil (<http://www.aids.gov.br/pagina/regulamentacao-de-testes>; <http://www.cdc.gov/Mmwr/preview/mmwrhtml/mm5732a2.htm>). A metodologia do VDRL baseia-se no fundamento que “reaginas” presentes em indivíduos infectados por *T. pallidum* são detectadas no plasma através da reação com um antígeno cardiolipínico purificado e estabilizado, produzindo uma floculação visível ao microscópio. O TPHA emprega eritrócitos de aves recobertos com antígenos de *T. pallidum*. Assim, na presença de anticorpos sifilíticos, no plasma do indivíduo, os eritrócitos sensibilizados aglutinam-se, formando um padrão característico na placa de microtitulação (HUMAN, 2010)

O diagnóstico para infecção pelo HTLV foi realizado através do Architect System (CMIA) (Abbott Diagnostic Division, Ireland). Todos os ensaios seguiram as instruções dos fabricantes.

#### **4.7 Análise da resistência antirretroviral**

A presença de mutações de resistência primária (Surveillance Drug Resistance Mutations - SDRM) foi determinada através da submissão das sequências ao HIV Drug resistance database – Stanford University (<http://cpr.stanford.edu/cpr.cgi>), empregando a lista padronizada de SDRMs estabelecida pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (BENETT et al., 2009), a qual constitui das seguintes mutações: Para ITRN (41L; 65R; 67NGE; 69DIns; 70RE; 74VI; 75MTAS; 77L; 115F; 116Y; 151M; 184VI; 210W; 215YFISCDVE; 219 QENR), para ITRNN (100I; 101EP; 103NS; 106MA; 179F; 181CIV; 188LHC; 190ASE; 225H; 230L) e para IP (23I; 24I; 30N; 32I; 46IL; 47VA; 48VM; 50VL; 53LY; 54VLMATS; 73STCA; 76V; 82ATFSCML; 83D; 84VAC; 85V; 88DS; 90M). O padrão de susceptibilidade às três principais classes de antirretrovirais (ITRN, ITRNN e IP) foi analisado pelo HIVdb Program – Stanford University (<http://sierra2.stanford.edu/sierra/servlet/JSierra>).

#### **4.8 Análises da diversidade genética e de pressão seletiva positiva nos subtipos B e F identificados a partir do gene *pol* do HIV-1**

As análises de diversidade genética comparam a distância entre sequências obtidas em diferentes períodos de tempo. Foram determinadas as distâncias genéticas das sequências pertencentes aos subtipos B e F dos anos de 2002-2003 e 2007-2009 através do MEGA version 5 (TAMURA et al., 2011), utilizando o modelo de Maximum Composite Likelihood e o método bootstrap de estimativa de variância com 1000 replicatas, adotando-se uma taxa de variação entre os sítios ( $\Gamma$ ) de acordo com o modelo evolutivo escolhido para cada alinhamento. As diversidades genéticas intra-subtipos entre os anos analisados (2002-2003 e 2007-2009) foram inferidas através do nucleotide diversity ( $\pi$ ), implementado no MEGA version 5 (TAMURA et al., 2011), para esta análise, as sequências foram agrupadas em diferentes alinhamentos, de acordo com o subtipo viral e período de obtenção das amostras, assim a diversidade intra-subtipo foi calculada através do comando “compute diversity within subpopulations” sob o modelo de Maximum Composite Likelihood.

Mudanças na pressão seletiva positiva em códons dos subtipos B e F do HIV-1 foram detectadas quanto a contagem de células T CD4 e categoria de exposição. Realizou-se a estimativa de seleção para cada códon dos diversos alinhamentos através do MEGA version 5 (TAMURA et al., 2011), com o método de Maximum Likelihood e o adotando-se o modelo evolutivo escolhido para cada alinhamento.

Medidas de pressão seletiva são realizadas através do cálculo da taxa de mutações não-sinônimas ( $d_N$ ) dividido por mutações sinônimas ( $d_S$ ), representada por  $\omega$ . Sítios conservados apresentam valores de  $0 < \omega < 1$ , sítios com evolução neutra têm  $\omega = 1$ , enquanto sítios sob pressão seletiva positiva apresentam um  $\omega > 1$  (YOSHIDA et al., 2011).

## 4.9 Análise estatística

O teste de qui-quadrado de Person e o teste exato de Fisher foram utilizados para a análise das variáveis categóricas, sendo o subtipo viral a variável dependente. Para a comparação de medianas, em variáveis contínuas, aplicou-se Kruskal-Wallis. Para selecionar as variáveis mais significantes empregou-se uma regressão logística stepwise. Variáveis com uma moderada associação ( $p \leq 0.2$ ) com a variável dependente foram incluídas no modelo, enquanto que um limiar com  $p \leq 0.05$  foi adotado para a eliminação stepwise de variáveis consideradas como fatores de risco. Utilizou-se o teste do Qui-quadrado para comparar as proporções entre os subtipos B e F nos dois períodos analisados na pesquisa (período 1: 2002/2003 e período 2: 2007-2009). Nas análises estratificadas, o teste do qui-quadrado ou de Fisher foram utilizados para comparar a presença de co-infecções (HIV-HBV e HIV-sífilis) entre os subtipos B e não-B para as variáveis: categoria de exposição, contagem de células T CD4+, carga viral, sexo e escolaridade. Os dados foram analisados com o software STATA V.13 (StataCorp., USA).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Características da população do estudo

A idade média da população foi de 34 anos e a maioria era do sexo masculino (58.3%). Entre as mulheres, 13% eram gestantes. As principais vias de transmissão do vírus foram a prática heterossexual (30.4% eram heterossexuais masculinos e 41.7%, femininos) e homens que fazem sexo com homens (HSH) (30%), havendo baixa prevalência de usuários de drogas injetáveis e não-injetáveis (UDI/UDNI) (1.8%). Adicionalmente, 6.5% relataram parceria sexual com indivíduos HIV-positivo. A mediana da contagem de células T CD4+ e carga viral foram 210 céls/mm<sup>3</sup> e 14731 cópias/ml, respectivamente (tabela 3). Da análise do segmento genômico *pol*

do HIV-1, o subtipo B foi o mais prevalente (60.9%), seguido de uma alta proporção de HIV-1 F (31.4%). Recombinantes BF representaram 4.7% dos isolados, havendo, também, a identificação de uma rara cepa pertencente ao subtipo H, de recombinantes AG e BC e, duas cepas HIV-1 C.

Tabela 3 – Características da população do estudo, constituída de indivíduos HIV-positivos com amostras coletadas nos períodos de 2002-2003 e 2007-2009 em Pernambuco, Nordeste – Brasil.

Variáveis	N <sup>a</sup> = 169 N <sup>b</sup> (%)
<b>Idade (anos)<sup>c</sup></b>	34 ± 11
<b>Sexo</b>	
Feminino	70/168 (41.7)
Masculino	98/168 (58.3)
<b>Gestação</b>	
Sim	09/69 (13)
Não	60/69 (87)
<b>Categoria de exposição<sup>d</sup></b>	
HSH <sup>e</sup>	47/168 (30)
Heterossexuais masculinos	51/168 (30.4)
Heterossexuais femininos	70/168 (41.7)
Parceiro de HIV-positivo	11/168 (6.5)
Profissional do sexo	01/168 (0.6)
UDI/UNDI <sup>f</sup>	03/168 (1.8)
Hemotransusão	04/168 (2.4)
<b>Carga viral (cópias/ml)<sup>h</sup></b>	14731 (515 – 120000)
<b>Contagem de células CD4+ (cél/mm<sup>3</sup>)<sup>h</sup></b>	210 (24 – 406)

<sup>a</sup> Total de amostras analisadas; <sup>b</sup> Total de amostras com informações para cada variável; <sup>c</sup> Média ± desvio-padrão; <sup>d</sup> Esta variável não é mutualmente exclusiva; <sup>e</sup> HSH: Homens que fazem sexo com homens; <sup>f</sup> UDI/UNDI: Usuários de drogas injetáveis / Usuários de drogas não injetáveis; <sup>g</sup> Mediana (intervalos interquartilicos).

## 5.2 Diferentes subtipos e formas recombinantes do HIV-1 em Pernambuco – Nordeste/Brasil

Um total de 103 (60.9%) sequências foi caracterizado como subtipo B de acordo com análise filogenética por ML (Figura 13). Primeiramente, verificamos uma posição basal de cepas haitianas na filogenia do subtipo B, salientando a inclusão de uma das nossas sequências (08PE144) entre estas cepas de referência oriundas do Caribe (incluindo Haiti). O isolado pertencia a um indivíduo jovem, do sexo masculino, HSH, cujo diagnóstico foi realizado em 2008 e apresentou resultado de infecção recente através do Enzaimunoensaio de Captura BED (BED-CEIA). Informações acerca de viagens internacionais não estavam disponíveis, mas o portador residia em um município possuidor de um dos maiores portos do Brasil (Porto de Suape). Na árvore visualiza-se uma distribuição randômica entre as sequências estudadas e as de referência, apresentando, desta forma, fraca correlação geográfica entre sequências estudadas e as de referência. Detectaram-se oito clusters filogenéticos entre as amostras estudadas, com suporte bootstrap maior que 70, entretanto, não foi possível estabelecer ligação epidemiológica entre as mesmas através dos dados epidemiológicos obtidos. Entre os 23 pacientes presentes nos clusters filogenéticos com suporte bootstrap superior a 70, 13 eram homens, dos quais cinco, HSH. Árvores filogenéticas inferidas com ou após a retirada das mutações de resistência primárias e as avaliadas pelos métodos de NJ ou ML apresentaram topologias similares (dados não mostrados).

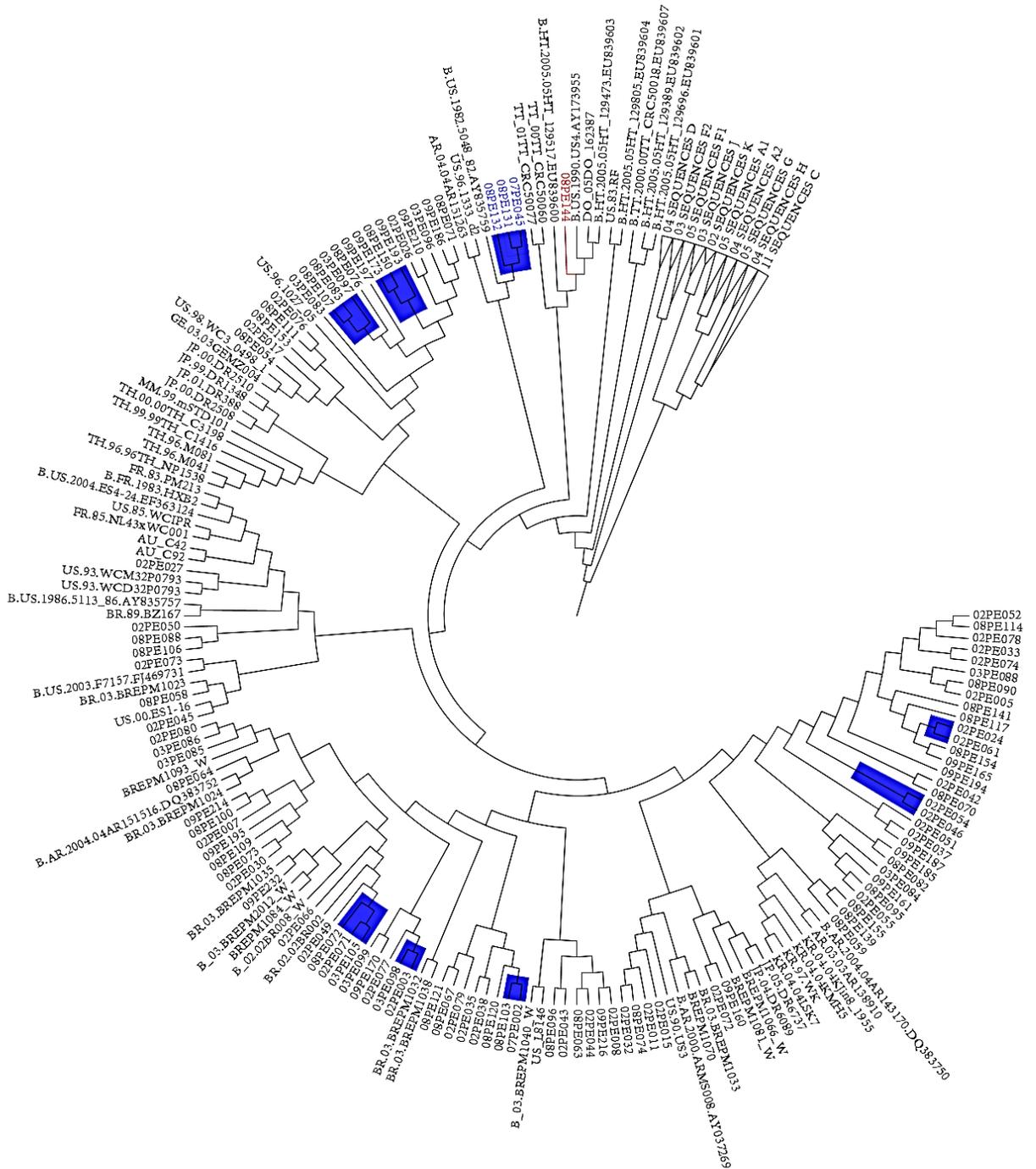
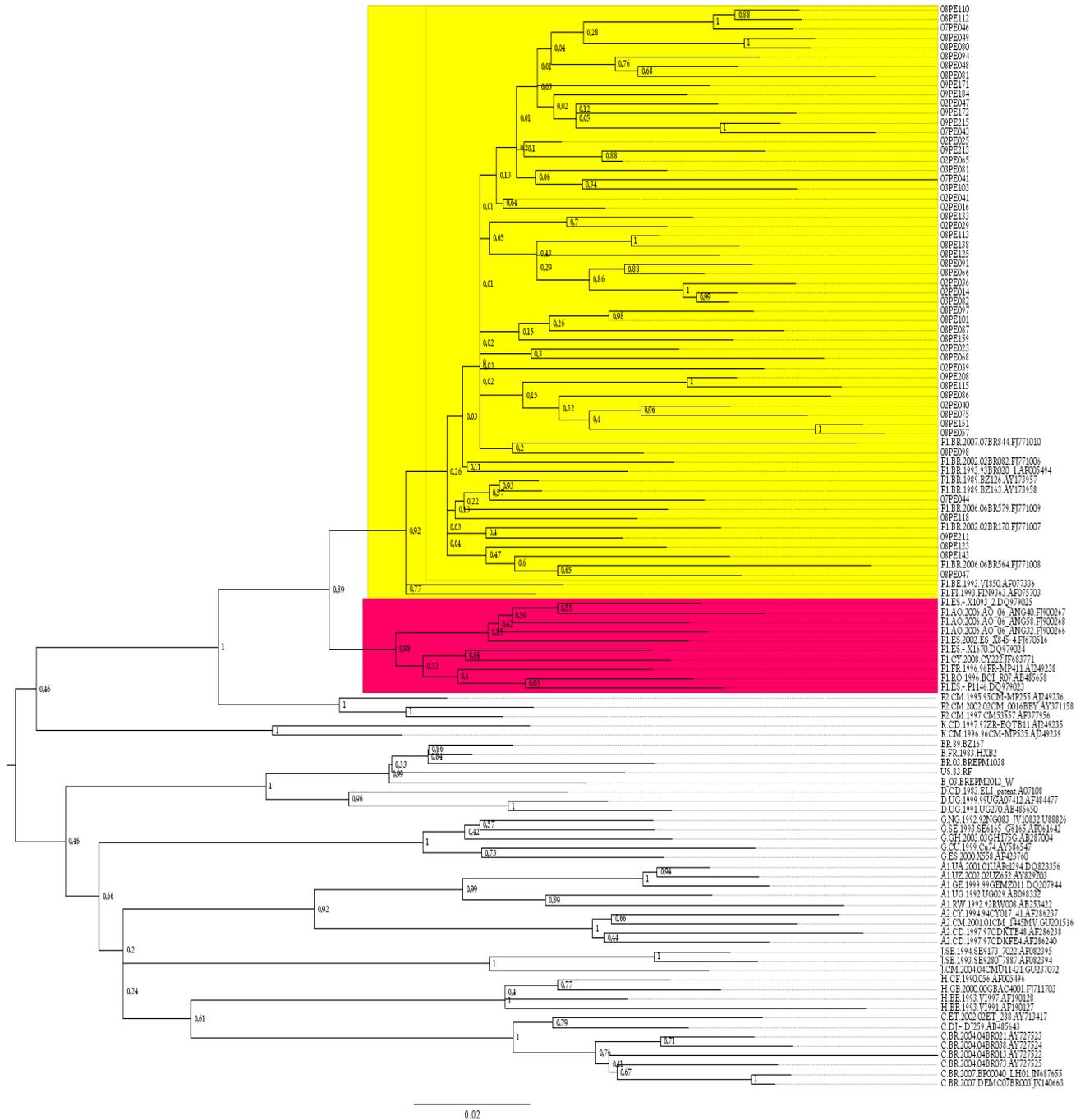


Figura 13 – Inferência filogenética do subtipo B do HIV-1 de cepas do estado de Pernambuco, Nordeste do Brasil. O alinhamento final continha 894bp, composto por seqüências de referência e 103 seqüências da pesquisa do qual foram excluídas as mutações de resistência. A estrutura da árvore foi determinada através da análise de maximum likelihood implementada no MEGA 5, com replicatas de 1000

bootstrap e demonstrada como um cladograma. Os clusters realçados em azul possuem suporte bootstrap  $\geq 70$ . Oito clusters filogenéticos das cepas estudadas são visualizadas. Cepa 08PE144, em vermelho, mostra-se clusterizando com sequências do Caribe e cluster filogenético com as identificações das sequências marcadas em azul correspondem a amostras com co-infecção HBV-HIV.

Foi identificada uma grande porcentagem de cepas do subtipo F do HIV-1 ( $n=53$ , 31.4%). As sequências avaliadas no estudo foram alinhadas com cepas F1 de referência presentes no Los Alamos database para a região genômica abordada (região *pol*). Observou-se a segregação de dois grandes clusters F1, um composto de dois sub-clusters, nos quais predominam cepas de referência da Romênia e Angola; e outro cluster com sequências de referência brasileiras, emergindo como um grande cluster independente, no qual se situam todas as sequências do estudo (Figura 14). Cepas isoladas na Bélgica (BE93.VI850) e Finlândia (FI93.FIN9363), oriundas da República Democrática do Congo (RDC) e Quênia, respectivamente, apresentaram uma relação evolutiva com as cepas sul-americanas, ocupando um lugar basal neste grande cluster. A maioria das nossas sequências HIV-1 F eram provenientes de heterossexuais masculinos (26/53, 49%) e femininos (17/53, 32%). Apenas 10 sequências eram provenientes de HSH (10/53, 19%). A árvore filogenética deste subtipo F apresentou um grande número de clusters filogenéticos ( $n=12$ ), com 29 sequências, entre as 53 avaliadas, pertencentes a um destes clusters.



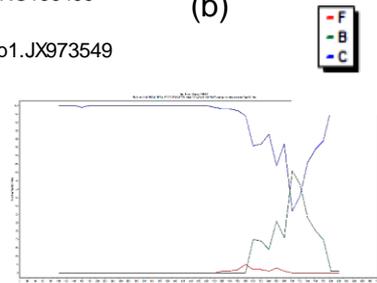
**Figura 14 – Filogenia das 53 cepas do HIV-1 subtipo F, região da polimerase. Nordeste do Brasil.** Alinhamento com comprimento de 915bp, excluindo-se as mutações de resistência. Foram utilizadas sequências de referência obtidas do Los Alamos em conjunto com as amostras da pesquisa. A topologia da árvore foi inferida utilizando a metodologia de maximum likelihood implementada no MEGA 5, com replicatas de 1000 bootstrap. A escala em barra indica o número de substituições nucleotídicas por sítio. Sub-cluster F1 da América do Sul é demonstrado em amarelo e o sub-cluster com cepas F1 de outras origens geográficas, em vermelho.

Apesar da baixa prevalência do subtipo C entre as amostras estudadas (1.2%), salienta-se a detecção de um recombinante CB na região (figura 15). Na inferência filogenética, o recombinante BC (09PE181) apresentou-se numa posição externa ao clado de recombinantes BC brasileiras, composto principalmente por cepas de referência 31\_BC, com alto suporte bootstrap. Os dados epidemiológicos do indivíduo 09PE181 evidenciavam que o mesmo era HSH, parceiro sexual de paciente HIV-positivo e seu resultado do BED-CEIA indicava infecção recente. A inferência filogenética foi realizada com subtipos C de várias regiões do mundo, incluindo locais onde o mesmo é muito prevalente, como países do continente africano, China, Índia e Sul do Brasil. Visualiza-se um clado monofilético de cepas C brasileiras, onde encontramos as nossas sequências (figura 15a). A base do clado de HIV-1 C brasileiro é composta de sequências do Quênia e Etiópia, reafirmando a ligação evolutiva desta variante brasileira com cepas do Leste Africano.

(a)



(b)



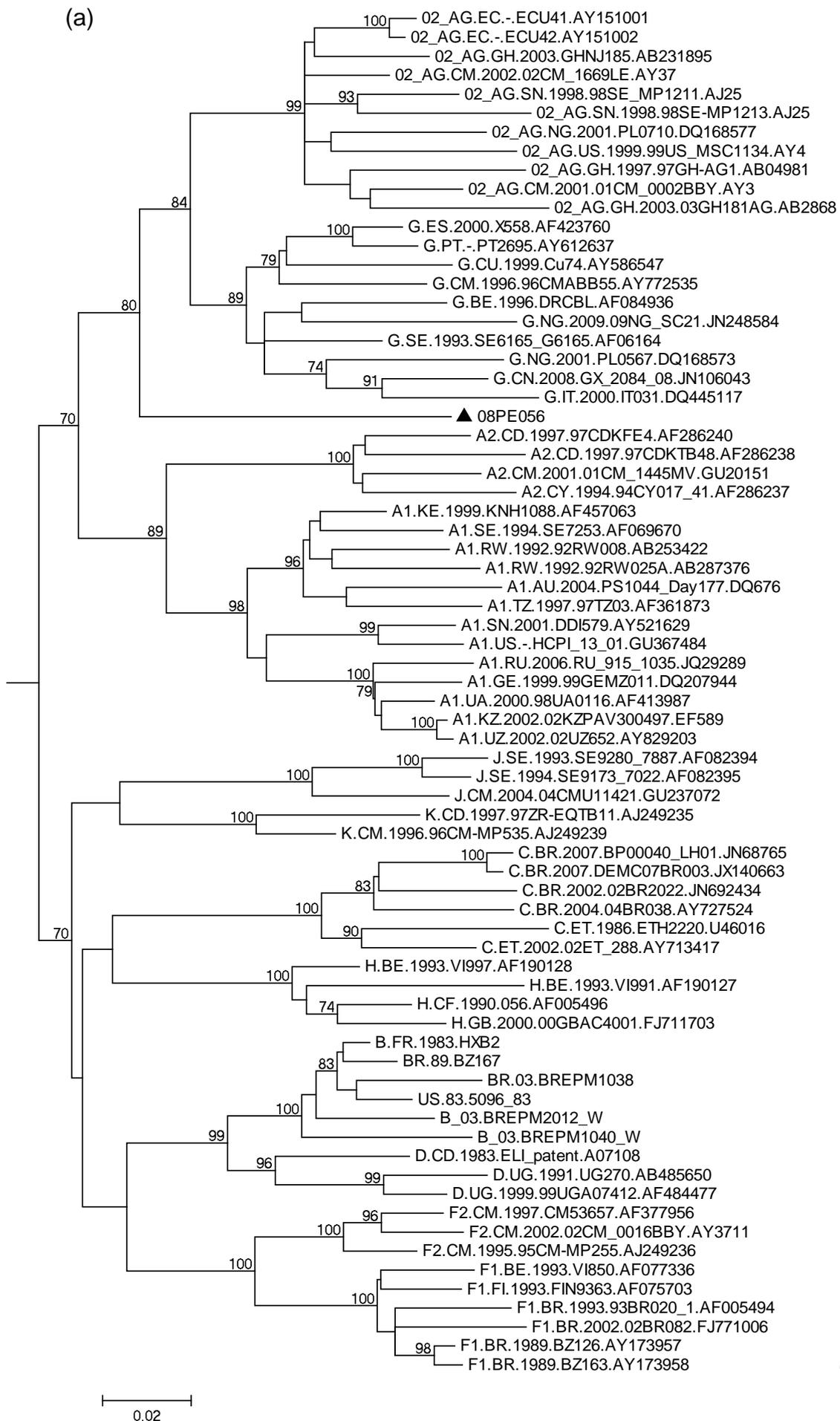
0.02

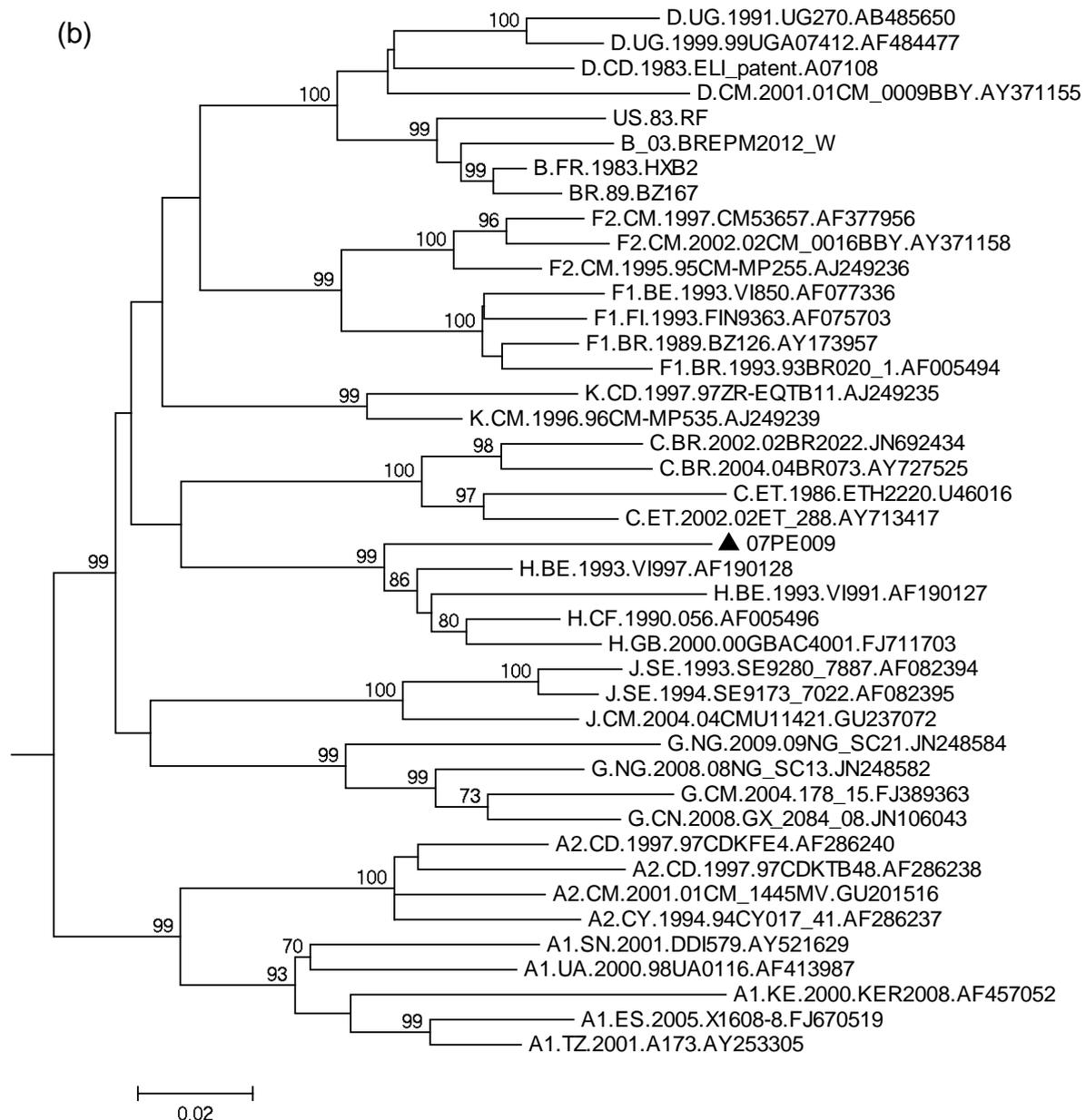
0.02

**Figura 15 – Inferência filogenética dos subtipos C identificados.** (a) Alinhamento com comprimento de 918bp, composto de sequências de referência, incluindo subtipo C de várias regiões geográficas e cepas 31\_BC, juntamente com as sequências do estudo. Relações evolutivas determinadas pelo método de maximum likelihood (MEGA 5), com replicatas de 1000 bootstrap, cujos valores acima de 70 são mostrados. A escala em barra indica o número de substituições nucleotídicas por sítio. (b) Análise bootscan realizada no SIMPLOT software, demonstrando ponto de recombinação na cepa 09PE181. Linha azul corresponde a regiões genômicas relacionadas ao subtipo C e a verde, ao subtipo B do HIV-1.

Detectamos a presença de um recombinante AG e um raro subtipo H (figura 16). A cepa 08PE056 apresentou um padrão basal e externo (outlier) ao grande clado que possui dois sub-clusters compostos de cepas G e de CRF02\_AG de referência. Várias análises de recombinação realizadas (SIMPLOT, RIP, BLAST Genotyping) não evidenciaram um consenso na determinação da estrutura recombinante desta sequência (dados não mostrados) (figura 16a). Trata-se de uma gestante com detecção de infecção tardia pelo BED-CEIA, entretanto, não se dispunha de informações quanto a viagens nacionais ou internacionais da mesma.

Observou-se uma relação evolutiva da cepa 07PE009 com cepas H de referência, com alto suporte bootstrap (99). Entretanto, a sequência apresenta-se em um ramo externo a estas sequências de referência. Trata-se de um indivíduo do sexo masculino, casado, heterossexual e residente em uma cidade no interior que faz fronteira com outro estado (estado da Paraíba). Entretanto, não temos dados a respeito da situação sorológica de sua companheira quanto à infecção pelo HIV, nem se o mesmo realizou viagens internacionais.

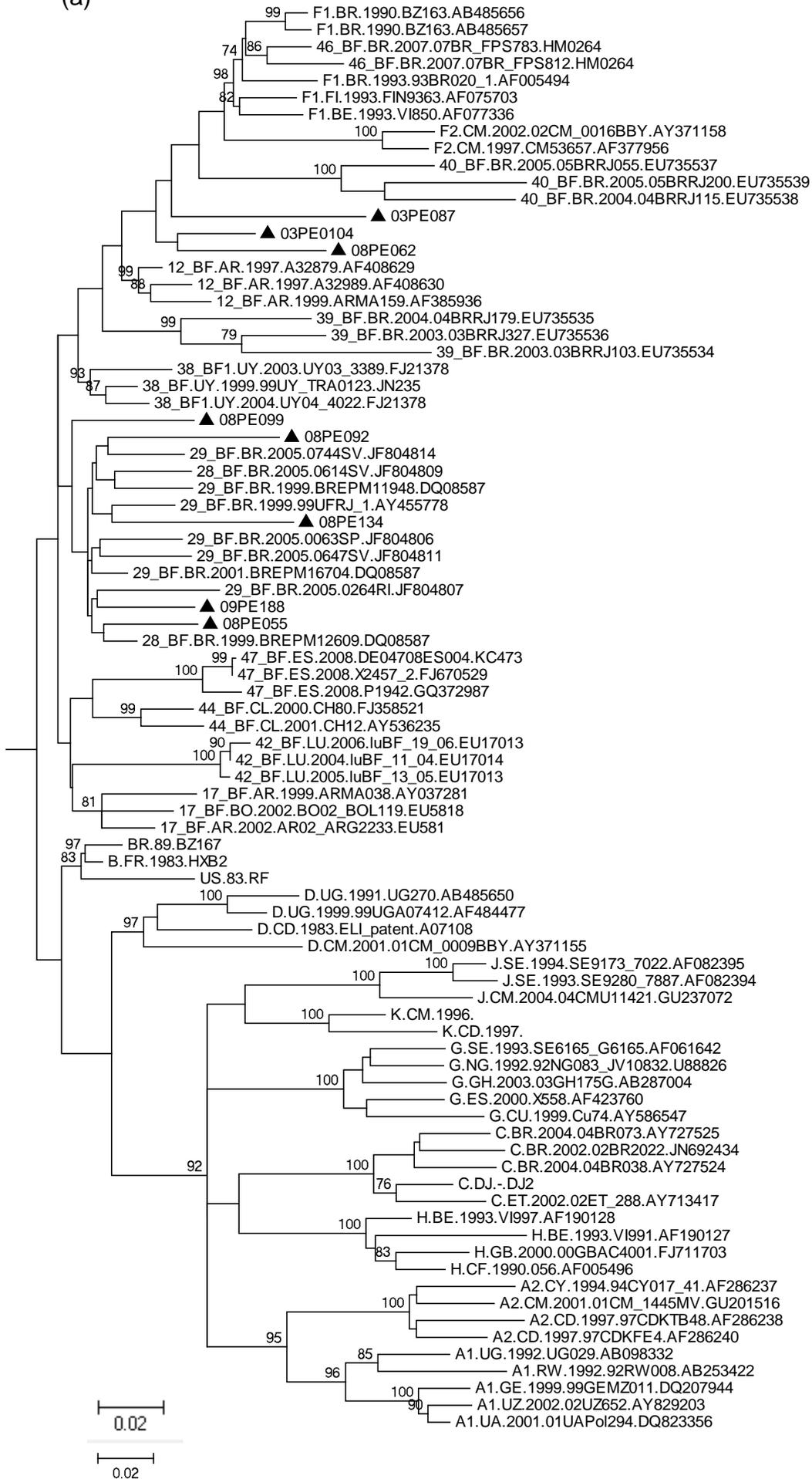


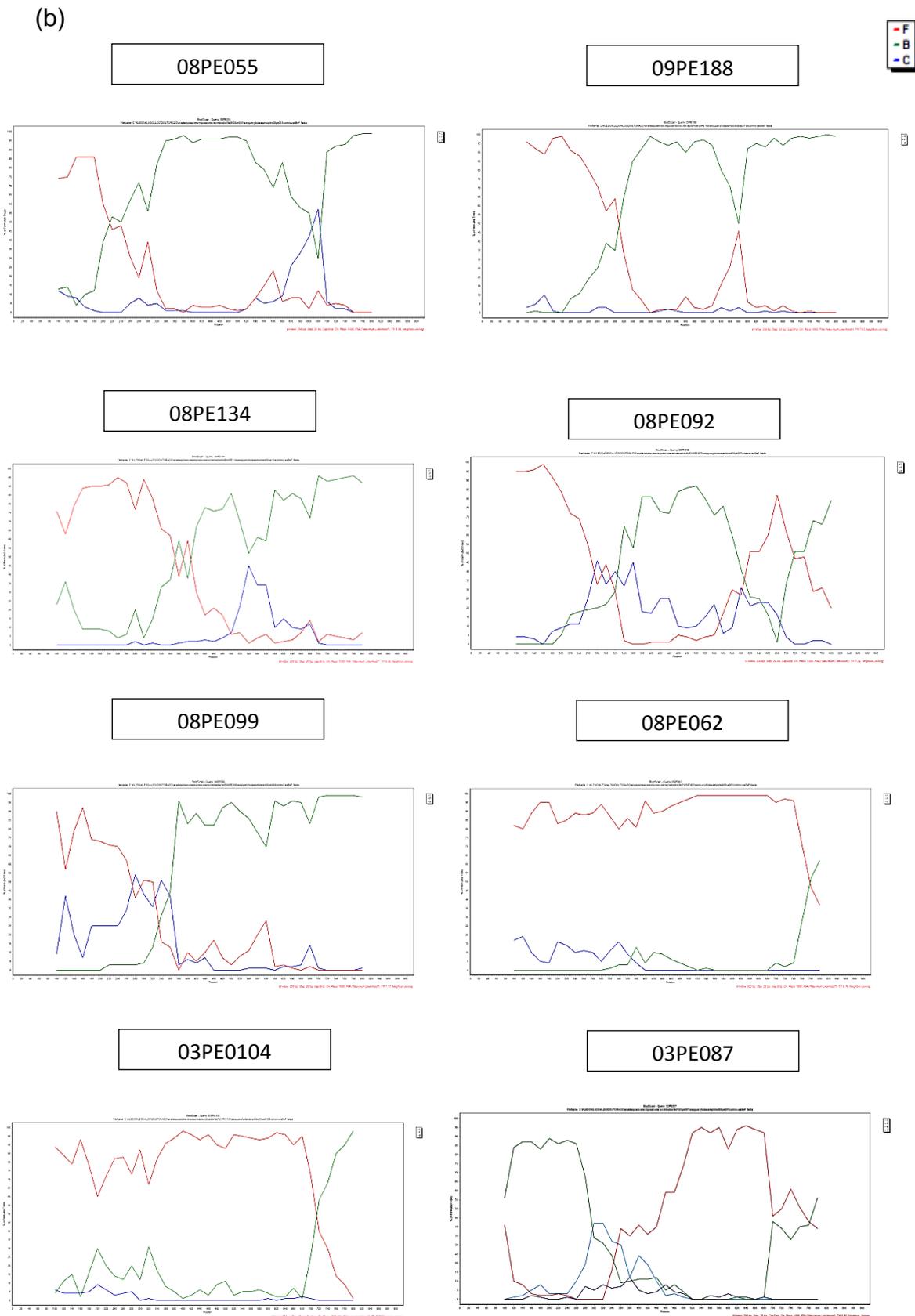


**Figura 16 – Raros subtipos do HIV-1 identificados em Pernambuco, Nordeste do Brasil.** A topologia das árvores filogenéticas foram determinadas por maximum likelihood (MEGA 5), com 1000 replicatas de bootstrap. Apenas valores  $\geq 70$  de bootstrap foram demonstrados. Os alinhamentos tinham 918bp de comprimento, englobando cepas de referência e as duas cepas da pesquisa: 08PE056 e 07PE009. (a) Identificação de uma URF AG, com padrão indeterminado de recombinação avaliado pelos vários métodos empregados. (b) Relato da circulação de uma cepa H.

Foram descritos a presença de oito recombinantes BF (4.7%), dos quais 5 eram provenientes de mulheres e 3 de homens. Nos indivíduos do sexo masculino, 2 relataram ser HSH. Observou-se uma complexa diversidade dos padrões de mosaicos dos recombinantes BF, com padrões de recombinação únicos, sendo classificados como URFs BF (figura 17). A inferência filogenética demonstrou que a disposição das cepas 08PE087, 03PE0104 e 08PE062, próximas às sequências de referência 40BF e HIV-1 F foi suportada pelo predomínio de segmento F em seus genomas. CRFs 70 e 71\_BF, recentemente identificadas em 2014, agruparam-se entre sequências F1 (dados não mostrados).

(a)





**Figura 17 – Identificação de recombinantes BF.** (a) Árvore filogenética inferida por maximum likelihood (MEGA5), com replicatas de 1000 bootstrap, constando de seqüências de referência dos diversos subtipos e CRFs BF, juntamente com as

sequências da pesquisa. O alinhamento continha 915bp. Apenas valores  $\geq 70$  de bootstrap foram demonstrados e a escala em barra indica o número de substituições nucleotídicas por sítio. (b) Análise de bootscannig realizada pelo SIMPLOT software demonstrando os diversos padrões de mosaicos entre as URFs BF analisadas.

### 5.3 Determinação da frequência relativa temporal dos subtipos B e F do HIV-1

As frequências das cepas B e F do HIV-1 foram comparadas entre os dois diferentes períodos em que houve as coletas e sequenciamento da região *pol* das amostras (período 1: 2002/2003; período 2: 2007 a 2009). A proporção de HIV-1 F sofreu um aumento estatisticamente significativo nos períodos avaliados, variando de 22.6% a 41.5% ( $p=0.01$ ) (tabela 4).

Tabela 4 – Avaliação temporal da proporção relativa do HIV-1 B e F nos períodos de 2002/2003 e 2007-2009.

	Subtipo Viral		
	B <sup>1</sup>	F <sup>1</sup>	
	N (%)	N (%)	
Período 1: 2002/2003	48 (77.4)	14 (22.6)	$p=0.01^2$
Período 2: 2007-2009	55 (58.5)	39 (41.5)	

<sup>1</sup> Proporções relativas levando em consideração apenas os casos prevalentes de HIV-1 B e F, não incluindo outros subtipos não-B nesta análise; <sup>2</sup> Teste do Qui-quadrado.

### 5.4 Aumento da diversidade intra-subtipo do gene *pol* do HIV-1 B e F

As médias das distâncias genéticas para o subtipo B para os anos de 2002-2003 e 2007-2009 foram de 0.056 (desvio-padrão DP=  $\pm 0.004$ ) e 0.072 (DP=  $\pm 0.004$ ), respectivamente. Para o subtipo F os resultados observados foram 0.045 (DP=  $\pm 0.004$ ) e 0.064 (DP=  $\pm 0.004$ ), para o mesmo intervalo de tempo. Em ambos

os casos, verificou-se um aumento desta medida nos subtipos analisados ( $p < 0.0000001$ ). A diversidade genética intra-subtipo foi calculada em 0.065 (DP=  $\pm 0.004$ ) para o HIV-1 B e 0.055 (DP=  $\pm 0.004$ ) para o HIV-1 F, refletindo uma nítida maior acumulação de mutações no subtipo B ( $p < 0.0000001$ ).

### 5.5 Pressão seletiva positiva no gene *pol* do HIV-1 B e F

Os códons identificados sob seleção positiva nos subtipos B e F foram determinados de acordo com a contagem de células T CD4+ e categoria de exposição (tabela 4) e suas posições foram numeradas de acordo com a sequência de referência HXB2. (número de acesso no Genbank: K03455).

No subtipo B, o códon com maior frequência foi o 37 da protease. Para o HIV-1 F, os mais frequentes foi o 12 (protease). Verifica-se que os códons sob pressão seletiva positiva são mais frequentes em contagem de células T CD4+  $\geq 200$  e em mulheres.

Tabela 5 – Identificação de códons sob pressão seletiva no gene *pol* dos subtipos B e F do HIV-1.

Variáveis	Subtipo	Códon	
<b>Células T CD4+<sup>c</sup></b>	< 200	B (n=32)	PR: - TR: -
		F (n=11)	PR: - TR: 173
	$\geq 200$	B (n=49)	PR: 37, 77, 93 TR: 161, 199, <u>210<sup>d</sup></u>
		F (n=29)	PR: 12, 19, 62 TR: 172, 199

<b>Categoria de exposição</b>		
HSH <sup>e</sup>	B (n=33)	PR: - TR: 199, 244
	F (n=10)	PR: - TR: -
HTS <sup>f</sup> Feminino	B (n=36)	PR: 37 TR: 209, 243
	F (n=25)	PR: 12, 63 TR: 173, 200
HTS Masculino	B (n=31)	PR: 37 TR: -
	F (n=17)	PR: - TR: -

<sup>a</sup>PR: Protease; <sup>b</sup>TR: Transcriptase reversa; <sup>c</sup>Contagem de células T CD4+ por mm<sup>3</sup>; <sup>d</sup>Códons relacionados a mutações de resistência; <sup>e</sup>HSH: Homens que fazem sexo com homens; <sup>f</sup>HTS: Heterossexuais;

## 5.6 Diferenças epidemiológicas e laboratoriais entre os subtipos B e não-B

Das 169 sequências virais avaliadas, 103 pertenciam ao subtipo B (60.9%), 53 ao subtipo F (31.4%), um ao subtipo H (0.6%), 02 ao subtipo C (1.2%) e 10 eram formas únicas recombinantes (URFs) (5.9%), com 08 BF, 01AG e 01 BC (dados não publicados).

Ao analisar as características sociodemográficas em relação ao subtipo viral, observa-se uma maior frequência do subtipo B no sexo masculino e em indivíduos com maior escolaridade (tabela 6). Associação estatística significativa também foi observada entre o subtipo B maior carga viral e menor contagem de linfócitos T CD4+. Em relação à categoria de exposição, o subtipo B foi mais frequente em HSH e na capital do estado (Recife), porém sem significância estatística. É pertinente relatar que quando a categoria heterossexual foi dividida entre heterossexuais masculinos e femininos, observou-se que aproximadamente metades das mulheres

albergavam um subtipo não-B, comparado aos 29% em heterossexuais masculinos e aos 20% em HSH.

Quando analisamos os resultados para o HIV-1 F, que corresponde a cerca de 80% dos subtipos não-B identificados (53/66), observamos que há uma maior associação estatística com uma menor carga viral ( $p=0.0049$ ), entretanto há perda desta associação com a maior mediana de células T CD4+ ( $p=0.067$ ) quando comparado ao HIV-1 B.

Foram incluídas no modelo multivariado as variáveis que demonstraram uma associação com  $p \leq 0.20$ . Segundo este modelo, o sexo masculino ( $p=0.054$ ) e a carga viral acima de 100.000 cópias/ml ( $p= 0.023$ ) foram variáveis mais frequentes no subtipo B.

Tabela 6 - Associação das características sociodemográficas e laboratoriais entre os subtipos B e não-B do HIV-1.

Variáveis	Subtipo B (n = 103)	Subtipo Não-B <sup>a</sup> (n = 66)	Univariada	
			OR (IC- 95%)	p-valor
<b>Sexo (n = 168)</b>				
Feminino	36 (35,3%)	34 (51,5%)	1,0	-
Masculino	66 (64,7%)	32 (48,5%)	1,95 (1,03 – 3,66)	0,038 <sup>†</sup>
<b>Idade (em anos) (n = 167)</b>	34,0 ± 10,6	34,6 ± 10,4	0,995 (0,966 – 1,025)	0,762
<b>Escolaridade (n = 144)</b>				
≥ 8 anos	50 (56,2%)	40 (72,7%)	1,0	-
< 8 anos	39 (43,8%)	15 (27,3%)	2,08 (1,01 – 4,30)	0,048 <sup>†</sup>
<b>Estado civil (n = 68)</b>				
Solteiro	24 (47,1%)	9 (52,9%)	1,0	-
Casado / relação estável	19 (37,3%)	7 (41,2%)	0,85 (0,28 – 2,60)	0,773
Separado / divorciado	3 (5,9%)	0 (-)	Não calculado	-
Viúvo	5 (9,8%)	1 (5,9%)	Não calculado	-
<b>Local de residência(n = 151)</b>				
Recife	21 (23,1%)	6 (10,0%)	1,0	-
RMR <sup>b</sup>	58 (63,7%)	44 (73,3%)	0,38 (0,14 – 1,01)	0,053
Interior do estado PE	12 (13,2%)	10 (16,7%)	0,34 (0,10 – 1,18)	0,090
<b>Gestação (n = 71)</b>				
Sim	4 (10,8%)	5 (14,7%)	1,0	-
Não	33 (89,2%)	29 (85,3%)	1,42 (0,35 – 5,80)	0,623*

<b>Categoria de exposição</b>				
<b>(n = 168)</b>				
HTS <sup>c</sup>	68 (66,7%)	53 (80,3%)	1,0	-
HSH <sup>d</sup>	34 (33,3%)	13 (19,7%)	2,04 (0,98 – 4,24)	0,057
<b>Determinação da infecção</b>				
<b>(n=101)</b>				
Recente	12 (22,2%)	9 (19,1%)	1,0	-
Tardia	42 (77,8%)	38 (80,9%)	0,83 (0,31 – 2,18)	0,704
<b>CD4</b> ◇	226,5 (78; 414)	341 (159; 488)	-	0,036 <sup>†</sup>
<b>Classificação do CD4</b>				
<b>(n=132)</b>				
< 200 células	32 (39,0%)	13 (26,0%)	1,0	-
≥ 200 células	50 (61,0%)	37 (74,0%)	1,82 (0,84 – 3,94)	0,128
<b>Carga viral</b> ◇	65.000 (7.618; 194.000)	18.185 (1.470; 53.973)	-	0,023 <sup>†</sup>
<b>Classificação da carga viral</b>				
<b>(n=139)</b>				
< 100.000 cópias	52 (60,5%)	41 (77,4%)	1,0	-
≥ 100.000 cópias	34 (39,5%)	12 (22,6%)	2,21 (1,05 – 4,68)	0,037 <sup>†</sup>
<b>Co-infecções</b>				
<b>HIV-HBV (n = 97)</b>				
Negativo	36 (70,0%)	34 (77,3%)	1,0	-
Positivo	17 (30,0%)	10 (22,7%)	1,61 (0,59 – 4,41)	0,310
<b>HIV-HCV (n = 96)</b>				
Negativo	52 (100%)	43 (97,7%)	1,0	-
Positivo	0 (-)	1 (2,3%)	Não calculado	-
<b>HIV-HTLV (n = 91)</b>				
Negativo	47 (100%)	44 (100%)	1,0	-
Positivo	0 (-)	0 (-)	Não calculado	-
<b>HIV-Sífilis (n = 95)</b>				
Negativo	44 (86,3%)	37 (84,1%)	1,0	-
Positivo	7 (13,7)	7 (15,9)	0,84 (0,27-2,62)	0,765

<sup>a</sup> Entre os 66 HIV não-B, 53 (80,3%) eram subtipo F; <sup>b</sup>RMR: Região Metropolitana do Recife; <sup>c</sup> HTS: Heterossexuais; <sup>d</sup> HSH: Homens que fazem sexo com homens; <sup>†</sup> Associação estatística significativa; \* Teste exato de Fischer; ◇ Mediana (P<sub>25</sub>; P<sub>75</sub>) – Teste de Kruskal-Wallis.

A prevalência da co-infecção presente ou passada para HIV-HBV foi de 27.8% (IC 95%: 19.8 – 37.7) (27/97), com 04 amostras apresentando resultado reagente isolado para o HBsAg, o que demonstra possível infecção atual pelo HBV, enquanto 19 amostras exibiram reatividade sorológica para o anti-HBc isoladamente e 04, tinham reatividade conjunta para HBsAg e anti-HBc. As quatro amostras que

apresentaram reatividade isolada para o HBsAg foram classificadas como infecção tardia pelo BED-CEIA. As prevalências para as co-infecções HIV-sífilis e HIV-HCV foram, respectivamente, 14.7% (IC 95%: 8.6 – 23.0) (14/95) e 1.04% (IC 95%: 0.05 – 5.00) (01/96). Nenhuma amostra foi reagente para HTLV. O único caso de co-infecção HIV-HCV (08PE118) pertencia ao subtipo F, o qual apresentou carga viral muito elevada para o HCV.

Entre as 101 amostras, dos anos de 2007-2009, avaliadas quanto ao status de infecção pelo BED-CEIA, 21 (20.8%) foram determinadas como infecção recente.

Entre os indivíduos portadores de HIV-1 B, a presença da co-infecção HIV-HBV estava associada a HSH, sexo masculino, maior escolaridade, maior carga viral do HIV-1. Nenhuma associação foi observada entre co-infecção HIV-HBV e subtipo não-B do HIV-1 para as variáveis analisadas (tabela 7). Diferentemente, casos de co-infecção HIV-sífilis apresentaram associação com HSH, contagem de células T CD4+ menor que 200 e sexo masculino, apenas em subtipos não-B (tabela 8).

Tabela 7 – Características dos indivíduos co-infectados HIV-HBV nos subtipos B e não-B do HIV-1.

Variáveis	Subtipo B		p-valor	Subtipo não-B		p-valor
	HBV+	HBV-		HBV+	HBV-	
<b>Categoria de exposição (n=95)<sup>b</sup></b>	(n=27) <sup>a</sup>	(n=70) <sup>a</sup>		(n=27) <sup>a</sup>	(n=70) <sup>a</sup>	
HSH <sup>c</sup>	10 (10.5)	08 (8.4)	<u>0.014</u>	01 (1.0)	06 (6.3)	0.49*
HTS <sup>d</sup>	07 (7.4)	26 (27.4)		09 (9.8)	28 (29.5)	
<b>Contagem células TCD4+ (n=96)</b>						
CD4 < 200	02 (2.1)	06 (6.2)	0.63*	01 (1.0)	12 (12.4)	0.51*
CD4 ≥ 200	08 (8.3)	21 (21.9)		06 (6.2)	40 (41.7)	
<b>Carga viral<sup>e</sup> (n=73)</b>						
< 100.000	06 (8.2)	24 (32.9)	<u>0.025</u> *	06 (8.2)	22 (30.1)	0.72*
≥ 100.000	06 (8.2)	04 (5.5)		01 (1.4)	04 (5.5)	
<b>Sexo (n=96)</b>						
Masculino	15 (15.6)	20 (20.8)	<u>0.026</u> *	03 (3.1)	17 (17.7)	0.27*
Feminino	02 (2.1)	15 (15.6)		07 (7.3)	17 (17.7)	
<b>Escolaridade (n=81)</b>						
< 8 anos	04 (4.9)	20 (24.7)	<u>0.039</u> *	04 (4.9)	19 (23.4)	0.45*
≥ 8 anos	08 (9.9)	09 (11.1)		03 (3.7)	09 (11.1)	

<sup>a</sup> Total de amostras testadas sorologicamente para co-infecção HBV-HIV; <sup>b</sup> Dados disponíveis de cada variável para a análise; \* Teste exato de Fisher; <sup>c</sup> HSH: Homens que fazem sexo com homens; <sup>d</sup> HTS: Heterossexuais; <sup>e</sup> Carva viral medida em cópias/ml.

Tabela 8 - Características dos indivíduos co-infectados HIV-sífilis nos subtipos B e não-B do HIV-1.

Variáveis	Subtipo B		p-valor	Subtipo não-B		p-valor
	Sífilis+	Sífilis-		Sífilis+	Sífilis-	
<b>Categoria de exposição (n=91)<sup>b</sup></b>	(n=14) <sup>a</sup>	(n=81) <sup>a</sup>		(n=14) <sup>a</sup>	(n=81) <sup>a</sup>	
HSH <sup>c</sup>	02 (2.2)	15 (16.5)	0.55*	04 (4.4)	03 (3.3)	<u>0.007</u> *
HTS <sup>d</sup>	05 (5.5)	28 (30.8)		03 (93.3)	31 (34.1)	
<b>Contagem células TCD4+ (n=67)</b>						
CD4 < 200	-	07 (10.4)	0.30*	03 (4.5)	04 (6.0)	<u>0.025</u> *
CD4 ≥ 200	05 (7.5)	23 (34.3)		01 (1.5)	24 (35.8)	

<b>Carga viral<sup>e</sup> (n=72)</b>						
< 100.000	06 (8.3)	24 (32.9)	0.21 *	04 (5.5)	25 (34.7)	0.51 *
≥ 100.000	-	08 (11.1)		-	05 (6.9)	
<b>Sexo (n=94)</b>						
Masculino	03 (3.2)	30 (31.9)	0.167*	06 (6.4)	14 (14.9)	<u>0.026</u> *
Feminino	04 (4.2)	13 (13.8)		01 (1.1)	23 (24.4)	
<b>Escolaridade (n=74)</b>						
< 8 anos	02 (2.7)	22 (29.7)	0.14*	03 (4.0)	20 (27.0)	0.57 *
≥ 8 anos	04 (5.4)	11 (1113.6)		01 (1.4)	11 (13.6)	

<sup>a</sup>Total de amostras testadas sorologicamente para co-infecção HBV-HIV; <sup>b</sup>Dados disponíveis de cada variável para a análise; \* Teste exato de Fisher; <sup>c</sup>HSH: Homens que fazem sexo com homens; <sup>d</sup>HTS: Heterossexuais; <sup>e</sup>Carva viral medida em cópias/ml.

## 5.7 Susceptibilidade aos antirretrovirais

Observamos uma prevalência de 2.96% (IC95%: 0.97-6.77) de SDRMs entre as sequências analisadas (05/169), duas eram de subtipos não-B (09PE172 = HIV-1 F; 09PE055 = HIV-1 BF). Nenhuma sequência isolada no período de 2002-2003 apresentou SDRM (Tabela 9). Apenas uma paciente (08PE082) demonstrou resistência a duas classes de antirretrovirais (ITRN + ITRNN). Entre os cinco indivíduos com SDRM, 04 apresentaram resistência a ITRNN e apenas um mostrou uma alta resistência isolada a IP, com as major mutations L82A e L90M. O paciente que apresentava major mutations para os IP era co-infectado (HIV-HBV). Todos foram classificados como infecção tardia pelo BED-CEIA.

Tabela 9 – Padrão de resistência antirretroviral e códons associados à resistência primária para a protease e transcriptase reversa do HIV-1.

Cepa	Sexo/rota infecção/	PI major mutations	PI minor mutations	ITRN mutations	ITRNN mutatio	Padrão de resistência antirretroviral		
						Baixo	Intermediário	Alto
08PE165	F/HTS/ PHIV+/ Sífilis	-	L10V <sup>a</sup> , A71T <sup>a</sup>	-	P225H	NFV, NVP	EFV	-
08PE121	M/HTS/ HBsAg+	L82A, L90M	L10F <sup>a</sup> , E33Fa <sup>a</sup> , K43T <sup>a</sup> , A71V <sup>a</sup> , G73S	-	-	TPV/r	FVP/r, LPV/r	ATV/r, IDV/r, NFV, SQV/r
08PE082	M/HTS	-	-	V75L, F77L, M184V	K101E, G190S	ABC, DDI, ETR	RPV	3TC, FTC, EFV, NVP
09PE172	M/HSH	-	L10V <sup>a</sup>	-	K103N	-	-	EFV, NVP
08PE055	M/HTS	-	-	-	G190A	ETR, RPV	EFV	NVP

PI: inibidores de Protease; ITRN: inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeos; ITRNN: inibidores da transcriptase reversa não-análogos de nucleosídeos; ABC: abacavir; ATV: atazanavir; DDI: didanosina; EFV: efavirenz; ETR: etravirina; FVP: fosamprenavir; FTC: emtricitabina; IDV: indinavir; LPV: lopinavir; NFV: nelfinavir; NVP: nevirapina; RPV: rilpivirina; SQV: saquinavir; 3TC: lamivudina; HTS: heterossexual; HSH: homem que faz sexo com homem; PHIV+: parceiro de HIV+.

<sup>a</sup> Mutações não contidas na lista de SDRM estabelecida pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (BENETT et al., 2009). Entretanto, de acordo com o HIVdb Program – Stanford University para avaliação da susceptibilidade antirretroviral, podem estar associadas à diminuição desta susceptibilidade quando associadas a outras mutações ou devido a outras características intrínseca correspondente a cada códon.

## 6 DISCUSSÃO

Para avaliar a epidemia molecular do HIV-1 em Pernambuco, estado situado na região Nordeste do Brasil, analisamos 169 sequências *pol* correspondentes à protease e aproximadamente dois terços iniciais da transcriptase reversa. O estudo

revelou uma enorme diversidade genética viral, com a detecção de subtipos B (60.9%), F (31.4%), C (1.2%) e recombinantes BF (4.7%), além da presença de uma rara cepa H e de recombinantes AG e BC.

A alta frequência do subtipo B (60.9%) condiz com o fato que este foi o primeiro subtipo a ser isolado em nações industrializadas ocidentais e a espalhar-se mundialmente devido a deslocamentos populacionais, sendo a variante do HIV-1 mais disseminada globalmente (GILBERT, et al., 2007; JUNQUEIRA, et al., 2011). Entretanto, a frequência dos diversos tipos virais varia em um país de dimensões continentais como o Brasil. Outras variáveis também interferem nestes índices, como o tipo de região genômica analisada e o ano de obtenção das amostras (GRÄF & PINTO, 2013).

Observamos uma menor frequência do subtipo B em Pernambuco (60.9%) do que em outros estados da região Nordeste do país, como na Bahia e Ceará, cujas frequências variaram de 77.2 – 89% e 81 – 85%, respectivamente (COUTO-FERNANDEZ, et al., 1999; GADELHA, et al., 2003; PEDROSO, et al., 2007; MONTEIRO, et al., 2009; ARRUDA, et al., 2011; SANTOS, et al., 2011). Na análise filogenética, verificamos a fraca estrutura geográfica na filogenia deste subtipo com a presença de cepas de referência do HIV-1 B oriundos de diversas regiões do mundo. Este padrão polifilético, representado pela baixa prevalência de clusters, foi relatado anteriormente em outros locais do país, como no Rio de Janeiro (EYER-SILVA & MORGADO, 2007) e na região Centro-Oeste (CARDOSO, 2009). Ainda em relação à árvore filogenética do subtipo B, observamos a disposição da cepa 08PE144 no clado basal deste subtipo localizado entre cepas do Caribe. Nos trabalhos de Gilbert et al. (2007) e Junqueira et al. (2011) destaca-se a presença de cepas de origem brasileira nos clusters basais de sequências B compostas majoritariamente por cepas caribenhas, evidenciando que existiu uma inter-relação destas cepas do Caribe não apenas com cepas norte-americanas, mas também com cepas Sul-americanas.

A alta prevalência (31.4%) do HIV-1 subtipo F em Pernambuco reflete uma particularidade epidêmica local, diferindo das taxas apresentadas em outras regiões do país e até mesmo em outros estados da região Nordeste. Nas regiões Sul e Sudeste, onde estudos de epidemiologia molecular do HIV-1 foram mais

intensivamente realizados, essa taxa, geralmente, não ultrapassa 10% e 5%, respectivamente (DE SÁ-FILHO et al., 2005; SOARES et al., 2005; EYER-SILVA & MORGADO, 2007; DE SÁ-FILHO et al., 2008; SILVA et al., 2010; SANABANI et al., 2013). Na região Norte e Centro-Oeste observou-se uma proporção menor que 10% (CARDOSO et al., 2009; MACHADO et al., 2009; CARVALHO et al., 2011; FERREIRA et al., 2011).

Estados próximos, como a Bahia e o Ceará demonstraram baixas proporções do HIV-1 F, com taxas inferiores a 3% e 8%, respectivamente (GADELHA et al., 2003; CAVALCANTI et al., 2007; MONTEIRO et al., 2009; ARRUDA et al., 2011; SANTOS et al., 2011). As sequências estudadas pertencentes ao subtipo F separaram-se em um grande clado intercaladas com sequências F brasileiras. Esta segregação monofilética corrobora com os achados de outros estudos que apontam que cepas Sul-americanas F1 apresentam-se em cluster independente de outras sequências F1 originadas de outros continentes (BANDEA et al., 1995; GUIMARÃES et al., 2009; MEHTA et al., 2011; BELLO et al., 2012). Portanto, as cepas F1 detectadas em Pernambuco possuem uma evolução similar a outras cepas F1 da América do Sul e este padrão monofilético do HIV-1 F sugere que as mesmas derivam de um único evento fundador ou de poucos vírus relacionados, com uma cadeia de transmissão local bem estabelecida. Recentemente, Pêsoa et al. (2014a) identificaram duas CRFs\_BF em Pernambuco, as CRFs70 e 71\_BF, obtidas a partir de amostras inicialmente determinadas como HIV-1 F a partir da análise da região *pol*, e, de fato, inferência filogenética realizada com nossas sequências e CRFs70 e 71\_BF demonstraram um agrupamento de algumas com nossas sequências, com bom suporte bootstrap.

Foram detectadas oito formas recombinantes BF, caracterizadas como Formas Únicas Recombinantes (URF) BF na análise de recombinação. A observação desta baixa prevalência (4.7%) dos recombinantes BF revela a heterogeneidade na sua distribuição no Brasil. Embora, alguns estudos apontem para uma disseminação do HIV-1 BF na América do Sul (CARR et al., 2001; THOMSON et al., 2004; AULICINO et al., 2007b), a frequência desses recombinantes no país varia muito de acordo com a região geográfica estudada e até mesmo em locais próximos, indicando que outros fatores além desta proximidade influenciam a dispersão dos mesmos (AULICINO et al., 2011).

No Nordeste do Brasil, verifica-se uma alta proporção destes recombinantes BF na Bahia, com taxas em torno de 20% (BRENNAN et al., 2007; MONTEIRO et al., 2009; SANTOS et al., 2011), porém, com taxas abaixo de 2.7% no Ceará (GADELHA et al., 2003; ARRUDA et al., 2011). Proporções variáveis desses recombinantes são identificados em estados fronteiriços da Região Sudeste e Centro-Oeste, sendo detectado 4.1% no Rio de Janeiro (GUIMARÃES et al., 2010), 8.4% em São Paulo (DE SÁ FILHO et al., 2005), 6% em Minas Gerais (GUIMARÃES et al., 2010), 7% em Goiás e aproximadamente 10% no Mato Grosso. A análise de recombinação determinou um padrão heterogêneo das cepas BF. Vários trabalhos ressaltam uma maior prevalência de múltiplas estruturas recombinantes não relacionadas geneticamente, resultando em um decréscimo da proporção de CRFs BF em populações Sul-americanas, como Rio de Janeiro, São Paulo e Argentina e um aumento na diversidade das URFs BF (QUARLERI et al., 2004; SOUZA et al., 2008; GUIMARÃES et al., 2010; AULICINO et al., 2011).

A detecção de recombinantes BF em amostras coletadas nos anos de 2002/2003 indica a antiga circulação destas cepas no estado de Pernambuco, e de fato, a circulação destes recombinantes foi relatada no Nordeste do Brasil em amostras obtidas entre o início e meados dos anos 90 (COUTO FERNANDEZ et al., 1999). Segundo Brennan et al. (2012), a alta prevalência de URFs comparada a CRFs no Brasil relaciona-se à co-circulação de vários subtipos na mesma região, principalmente em grupos demográficos que estejam, epidemiologicamente, propensos a um maior risco de infecção, pois estão mais expostos a uma alta probabilidade de infecções duplas que resultam em recombinação entre subtipos puros ou entre as próprias URFs. Este fato foi observado por De Oliveira et al. (2012), em São Paulo, onde detectou-se uma alta frequência (12.2%) de infecções duplas B e F1 em MSM. Porém, uma desvantagem do trabalho é observada na pequena região amplificada (segmento *pol* parcial), o que dificulta a determinação de eventos recombinantes, visto que a amplificação de genomas completos do HIV-1 tem revelado que algumas cepas classificadas como subtipos puros em pequenas regiões amplificadas eram, na verdade, recombinantes (CARR et al., 2001; SANABANI et al., 2009). Encontramos uma baixa prevalência do HIV-1 subtipo C nas amostras analisadas (n=02, 1.2%), o que corrobora com os relatos de outros trabalhos (CAVALCANTI et al., 2007; ARRUDA et al., 2011). Entretanto,

evidenciamos a primeira detecção de uma cepa recombinante CB no estado de Pernambuco, com seu segundo relato na Região Nordeste do Brasil, sendo o primeiro em Salvador – Bahia (PEDROSO et al., 2007). A baixa prevalência deste subtipo na região Nordeste contrasta com sua altíssima frequência na região Sul do país, onde se relatou proporções de até 63.9% em Santa Catarina (BRÍGIDO et al., 2007; GRÄF & PINTO, 2013).

Para o nosso conhecimento, detectamos o primeiro recombinante AG na região Nordeste – Brasil. A cepa foi isolada numa gestante em 2008, com resultado do BED-CEIA como infecção tardia. O achado de recombinantes AG foi relatado em outras regiões brasileiras: um caso de CRF02\_AG em Belém (região Norte) (MACHADO et al., 2009) e vários relatos no Rio de Janeiro (região Sudeste), incluindo transmissão horizontal autóctone (EYER-SILVA & MORGADO, 2007; DELATORRE, et al., 2012; VELASCO-DE-CASTRO et al., 2014), evidenciando múltiplas rotas de introdução e a progressivo estabelecimento de rotas de transmissão local desta variante. Análises filogenéticas apontam para a caracterização de um subtipo H na nossa região. Subtipo H foi relatado predominantemente na África Central (ex: República Democrática do Congo, Camarões e Gabão), com descrições isoladas em Angola, França, Suécia, Bélgica, Bulgária, Noruega e Rússia (JANSSENS et al., 2000; CASTELBRANCO et al., 2010; IVANOV et al., 2013).

Observou-se um significativo aumento da diversidade genética intra-subtipo em relação HIV-1 B e F entre os anos analisados, corroborando com os resultados de Bello et al. (2007a) para os mesmos subtipos avaliados. Entretanto, o subtipo B apresentou maior diversidade genética inter-subtipo no mesmo período ( $p < 0.0000001$ ). Entre os códons associados à pressão seletiva positiva, apenas o da posição 210 da TR está relacionado à resistência antirretroviral. Leal et al. (2004) ao detectarem uma variedade de códons em pressão seletiva, numa amostra de pacientes virgens de terapia antirretroviral, nenhum foi associado à presença de resistência, mesmo apresentando mutações de resistência antirretroviral. Adicionalmente, os códons sob pressão seletiva positiva foram mais frequentes em indivíduos com contagem de células CD4+ maior que 200 e mulheres heterossexuais.

Entre os dois períodos analisados (2002/2003 e 2007/2009) houve um significativo aumento da frequência do HIV-1 F e a detecção da maioria das URFs no último período. Estes achados reforçam o conceito da complexa variabilidade viral que o HIV-1 adquiriu no Brasil e no mundo, com a disseminação de subtipos não-B, CRFs e URFs (SOARES et al., 2005; NEOGI et al., 2011; LI e t al., 2012; ABECASIS et al., 2013; HAWKE et al., 2013).

Algumas limitações metodológicas são apresentadas devido ao desenho transversal do estudo e da amostragem por conveniência, o que pode não relatar a verdadeira situação epidêmica local. Além disso, a filogenia foi inferida a partir de um pequeno fragmento genômico da *pol*, e a confirmação dos raros genótipos determinados requereria um sequenciamento de uma região maior ou do genoma completo. Contudo, alguns autores relatam a vantagem do estudo da *pol* em se avaliar recombinação intersubtipo, a qual funciona como importante hotspots de recombinação (HUÉ et al., 2004; GUIMARÃES et al., 2010).

Várias hipóteses estão ligadas à expansão dos subtipos não-B no estado, como: O grande crescimento econômico de Pernambuco na última década, que pode ter influenciado emigrações populacionais, principalmente, devido à atividade do maior porto da região Nordeste (Porto de Suape) e a construção de estaleiros, refinarias e petroquímicas (<http://www.worldbank.org/pt/news/press-release/2013/06/25/wb-brazil-pernambucos-new-inclusive-growth-program-will-benefit-nine-million-residents>), e ao fato da região Metropolitana do Recife (capital do estado) ser um dos principais pólos industriais e o maior pólo de serviços do Nordeste – Brasil, destacando-se as áreas tecnológicas, médica, de ensino e pesquisa. Além disso, o estado destaca-se no turismo e como centro cultural (<http://www2.recife.pe.gov.br/o-recife/metropole-das-oportunidades/>). Outro fator que também pode estar associado à maior frequência de subtipos não-B no segundo período está no fato da diminuição da porcentagem de HSH nesta segunda amostragem, o que corrobora com dados de heterossexualização da epidemia no país (BRASIL, 2013).

O subtipo B foi associado aos seguintes fatores de risco: indivíduos do sexo masculino, maior escolaridade, maior carga viral e menor mediana de contagem de células T CD4+ comparando-se aos subtipos não-B. Apesar de não demonstrar

associação significativa, a categoria de exposição HSH foi mais frequente no HIV-1 B, o que pode explicar a associação da variável maior escolaridade com este subtipo, pois HSH possuíam maior escolaridade (em anos) do que heterossexuais ( $p < 0.0001$ ). Em contrapartida, mulheres heterossexuais foi o grupo que apresentou maior frequência de HIV-1 não-B (48.6%), comparado a heterossexuais masculinos (37.2%) e HSH (27.6%), corroborando com os achados de Geretti et al., (2009) e Hawke et al., (2013), que detectaram uma grande prevalência de subtipos não-B em heterossexuais, principalmente em mulheres. Verificou-se que a expansão dos subtipos não-B também ocorre em HSH, nos quais a frequência desta variante aumentou significativamente entre os períodos de 2002-2003 e 2007-2009 ( $p = 0.0019$ , dados não mostrados), de fato, Almeida et al., (2012) demonstraram que há uma disseminação entre subtipos não-B entre HSH, como consequência do aumento da prevalência destes subtipos (particularmente C e BC recombinantes) na região Sul do País, portanto, podemos supor que a maior expansão de HIV-1 não-B em HSH em Pernambuco pode estar relacionada à expansão do HIV-1 F nesta região, sabendo que este subtipo é responsável por cerca de 80% das cepas identificadas com não-B no local do estudo.

Em relação à determinação das co-infecções entre o HIV-1 e outras doenças transmitidas por via sexual (HBV, HCV, HTLV e sífilis), contabilizamos uma frequência de 27.8% para infecção passada ou presente entre HBV (27/97), destes, 8 casos (8.2%) correspondiam infecção presente (Presença do HBsAg). Os casos de co-infecção para sífilis e HCV foram, respectivamente, 14.7% e 1.04% e nenhum caso HIV-HTLV foi detectado. Em outros estudos também realizados na região metropolitana do Recife em pacientes HIV-positivos, foram determinados maiores prevalências das co-infecções para HBV-HIV, como a frequência de 10.3% de HBsAg e 38.7% de anti-HBc (SAMPAIO et al., 2009), e para HIV-HCV, frequências de 10.7% (SAMPAIO et al., 2009) e 3.2% (CARVALHO et al., 2009), respectivamente. Em Salvador, outra grande capital da região nordeste do Brasil, onde há um grande intercâmbio econômico e turístico com Recife, também foi relatado uma grande proporção de co-infecções HIV-HBV (22%) e HIV-HCV (13%) (MOREIRA et al., 2013). Com exceção do resultado da co-infecção HIV-HBV obtida em Salvador, todas as outras proporções foram superiores às obtidas no nosso estudo, podendo ser explicado pelo fato que os trabalhos supracitados foram

realizados com pacientes acompanhados em serviços de doenças infecciosas hospitalares, e as nossas amostras obtidas para esta abordagem da co-infecção foram provenientes de pacientes ambulatoriais de CTAs, com diagnóstico recente para o HIV. Desse modo, o diagnóstico mais rápido da infecção pelo HIV proporcionado aos indivíduos, através das unidades de tratamento, pode promover maior conscientização sobre prevenção e controle para novas ISTs.

As co-infecções para o HIV-HBV e HIV-sífilis demonstraram associação com HSH e sexo masculino, embora diferindo quanto ao subtipo viral. A co-infecção HIV-1 B e HBV ainda demonstrou associação com escolaridade e maior carga viral, o que pode estar relacionado a uma associação entre indivíduos com reatividade para algum marcador sorológico do HBV e escolaridade ( $p=0.019$ ) e à associação limítrofe entre o subtipo B e HSH (0.057). Um fator limitante para estas análises estratificadas por subtipo viral e tipo de co-infecção foi o baixo número de amostras apresentadas nos resultados, o que dificulta melhor compreensão destes dados.

A prevalência de mutações de resistência primária de acordo com o critério do SDRM foi estimada em 2.96% (IC95%: 0.97-6.77), sendo presente em 3 cepas B, uma BF e uma F, todas oriundas do período de 2007 a 2009. O nível de resistência primária aos antirretrovirais foi inferior ao obtido por outra grande capital do Nordeste do Brasil (Fortaleza), onde foi detectada uma proporção de 9.5% (ARRUDA et al., 2011), assim como aos recentes dados obtido no Rio de Janeiro, onde se observou uma alta resistência primária em indivíduos recentemente diagnosticados em CTAs (~15%) (GUIMARÃES et al., 2009). Entretanto, em ambos os trabalhos, o subtipo B era o majoritário, correspondendo a 85 e 78%, respectivamente. Portanto, como nossa amostragem tem um importante percentual de subtipo não-B (40.2%), composto principalmente pelo subtipo F (30,4%), talvez alguma característica inter-subtipo tenha associação com o desenvolvimento de resistência. De fato, alguns trabalhos relacionam o maior acúmulo de resistência antirretroviral em HIV-1 B (SOARES et al., 2007; MUNERATO et al., 2010) e uma maior susceptibilidade do HIV-1 F aos inibidores de protease (TANURI et al., 1999). Reforçando esta hipótese, um trabalho do National Network for the Surveillance of Drug Resistance In Brazil (HIV-BResNet) relatou um menor nível de resistência em capitais brasileiras com maior porcentagem de subtipos não-B, como Porto Alegre e Salvador (INOCÊNCIO et al., 2009).

Apesar da natureza do estudo, um corte transversal, podemos apontar e ressaltar, com melhor clareza, algumas particularidades epidemiológicas e laboratoriais quanto aos subtipos virais circulantes no estado de Pernambuco, região Nordeste do Brasil. Apesar de estudos mais controlados, evitando viés de seleção, sejam necessários para uma compreensão mais aprofundada sobre as principais características epidemiológicas, laboratoriais e de fisiologia viral que diferenciem o nosso subtipo B majoritário do crescente subtipo F, cuja proporção é, caracteristicamente, muito elevada em nossa região, nossos dados fornecem um importante norteamento para o aprofundamento destes conhecimentos.

Assim, concluímos que nossos resultados apontam para uma crescente diversidade da epidemia em Pernambuco / Nordeste – Brasil, destando-se a grande e singular prevalência do HIV-1 F. Esta singularidade epidêmica pode acarretar importantes particularidades e consequências à nossa epidemia, como repercussões na forma de tratamento antirretroviral, progressão à doença, desenvolvimento de vacinas e qualidade no monitoramento laboratorial. Assim, é de extrema importância a contínua investigação da expansão destes subtipos não-B, e sua melhor caracterização virológica e da interação vírus-hospedeiro.

## **7 CONCLUSÕES**

Com bases nos resultados, concluiu-se que:

- Há uma grande diversidade de subtipos e formas recombinantes do HIV-1 em Pernambuco. Apesar do HIV-1 B ser majoritário (60.9%), o subtipo F apresentou alta frequência (31.4%), além da constatação de sua expansão entre 2002 e 2009. Também foi verificada a presença do subtipo C (1.2%) e a determinação de um raro subtipo H nas Américas, além de recombinantes BF, BC e AG.
- As URFs BF identificadas apresentaram uma variedade de padrões de recombinação, revelando possíveis diferenças nos seus padrões evolutivos locais;

- Infecção pelo HIV-1 B estava associada a indivíduos do sexo masculino, maior escolaridade, maior carga viral e menor contagem de células T CD4+; entretanto, estudos mais detalhadas são requeridos para o associarem a uma maior patogênese em nossa região. Por outro lado, metade das mulheres heterossexuais albergavam HIV-1 não-B, entretanto sem significado estatístico quando comparados à HSH e heterossexuais masculinos. Desta forma, estes dados podem sugerir uma ligação entre a predominância de certos subtipos do HIV-1 em relação ao sexo ou a determinado comportamento sexual ou ainda, a vias de transmissão;
- Houve associação estatística significativa entre co-infecção HIV-1 B - HBV e HSH, maior carga viral, sexo masculino e maior escolaridade; enquanto nos casos de co-infecção HIV-sífilis, apenas as co-infecções entre a sífilis e os HIV-1 não-B demonstraram associação com HSH, menor contagem de células T CD4+ e sexo masculino; Assim, verificamos que os HSH perfazem a principal categoria de exposição sexual associada a co-infecções o que requer maior enfoque de medidas preventivas nesta população, embora haja diferença quanto o subtipo viral associado às diversas infecções sexualmente transmissíveis;
- Constatou-se baixa prevalência de SDRMs (2.96%) no presente estudo, quando comparado a outros estudos da região nordeste em pacientes virgens de terapia antirretroviral.
- Códon sob pressão seletiva positiva são mais frequentes nos anos de 2007-2009, em contagem de células T CD4+  $\geq 200$ , em infecções tardias pelo HIV-1 e em mulheres heterossexuais.

## REFERÊNCIAS

ABECASIS, A. B. et al. HIV-1 subtype distribution and its demographic determinants in newly diagnosed patients in Europe suggest highly compartmentalized epidemics. **Retrovirology**. 10:7, 2013.

ALCÂNTARA, L.C.J. et al. A Standardized Framework for Accurate, High-throughput Genotyping of Recombinant and Non-recombinant Viral Sequences. **Nucleic Acids Research**. 1-9, doi: 10.1093/nar/gkp455, 2009.

ALMEIDA, S. E. M. et al. Temporal dynamics of HIV-1 circulating subtypes in distinct exposure categories in Southern Brazil. **Virology Journal**. 9:306. Doi:10.1186/1743-422X-9-306, 2012.

ALENCAR, C. S. et al. HIV genotypes and primary drug resistance among HIV seropositive blood donors in Brazil: role of infected blood donors as sentinel populations for molecular surveillance of HIV. **J Acquir Immune Defic Syndr**. 63(3): 387-392, 2013.

ALTSCHUL, et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res**. 25: 3389-3402, 1997.

ANTA, L. et al. Resistance to the most recent protease and non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors across HIV-1 non-B subtypes. **J Antimicrob Chemother**. 68: 1994-2002, 2013.

ARAÚJO, A. F. et al. Lower Prevalence of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Brazilian Subtype B Found in Northeastern Brazil with Slower Progression to AIDS. **AIDS Res. Hum. Retroviruses**. 26(11), 1249-1254, 2010.

ARCHITECT SYSTEM. São Paulo, Brasil: Abbott Laboratórios do Brasil LTDA, 2012. Bula de kit diagnóstico.

ARRUDA, É. Et al., Short Communication: Intermediate Prevalence of HIV Type 1 Primary Antiretroviral Resistance in Ceará State, Northeast Brazil. **AIDS Res. Hum. Retroviruses**. V. 27(2), p. 153-156, 2011.

AULICINO, P. C. et al. Description of the First Full-Length HIV Type 1 Subtype F1 Strain in Argentina: Implications for the Origin and Dispersion of This Subtype in South America. **AIDS Res. Hum. Retroviruses**. 23(10): 1176-1182, 2007a.

AULICINO, P. C. et al. Extremely Rapid Spread of Human Immunodeficiency Virus Type 1 BF Recombinants in Argentina. **J. Virol**. 81(1):427-429, 2007b.

AULICINO, P. C. et al. Longitudinal analysis of HIV-1 BF1 recombinant strains in vertically infected children from Argentina reveals a decrease in CRF12\_BF *pol* gene mosaic patterns and high diversity of BF unique recombinant forms. **Infect. Genet. Evol.** 11: 349-357, 2011.

AULICINO, P. C. et al. Characterization of full-length HIV-1 CRF17\_BF genomes and comparison to the prototype CRF12\_BF strains. **Infect. Genet. Evol.** 12: 443-447, 2012.

BANDEA, C. I. et al. Epidemiologic and Evolutionary Relationships between Romanian and Brazilian HIV-1 Subtype F Strains. **Emerging Infectious Diseases**. 1(3): 91-93, 1995.

BELLO, G.; GUIMARÃES, M. L. & MORGADO, M. G. Evolutionary history of HIV-1 subtype B and F infections in Brazil. **AIDS**. V.20, p.763-768, 2006.

BELLO, G. et al. Demographic history of HIV-1 subtypes B and F in Brazil. **Infect. Genet. Evol.** 7(2): 263-270, 2007a.

BELLO, G et al. Increasing genetic distance to IV-1 subtype B and F1 consensus sequences in the Brazilian epidemic: a challenge for vaccine strategies based on central immunogens? **Infec Genet Evol.** 7(5): 594-599, 2007b.

BELLO, G. et al. Origin and evolutionary history of HIV-1 subtype c in Brazil. **AIDS**. V.22, p. 1993-2000, 2008.

BELLO, G; SOARES M. A. & SCHRAGO, C. G. The Use of Bioinformatics for Studying HIV Evolutionary and Epidemiological History in South America. **AIDS Res Treat.** doi:10.1155/2011/154945, 2011. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3226295/>.

BELLO, G. et al. Phylodynamics of HIV-1 Circulating Recombinant Forms 12\_BF and 38\_BF in Argentina and Uruguay. **Retrovirology.** 7:22, 2010.

BELLO, AFONSO & MORGADO. Phylodynamics of HIV-1 subtype F1 in Angola, Brazil and Romania. **Infect. Genet. Evol.** 12: 1079-1086, 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Boletim epidemiológico AIDS-DST – Ano II, n.01, 2013.** Disponível em [http://www.aids.gov.br/sites/default/files/anexos/publicacao/2013/55559/\\_p\\_boletim\\_2013\\_internet\\_pdf\\_p\\_\\_51315.pdf](http://www.aids.gov.br/sites/default/files/anexos/publicacao/2013/55559/_p_boletim_2013_internet_pdf_p__51315.pdf). Acesso em 28 ago 2014, 64 págs.

BENETT, D. E. Drug resistance mutations for surveillance of transmitted HIV-1 drug resistance: 2009. **PLoS ONE.** 4(3): e4724, 2009.

BRENNAN, C. A. et al. HIV-1 Strains Identified in Brazilian Blood Donors: Significant Prevalence of B/F1 Recombinants. **AIDS Res. Hum. Retroviruses**. V. 23(11), p. 1434-1441, 2007.

BRÍGIDO, L. F. et al. Molecular characteristic of HIV type 1 circulating in São Paulo, Brazil. **AIDS Res. Hum. Retroviruses**. V. 23, p. 673-682, 2005.

BRÍGIDO, L. F. et al. HIV type 1 subtype C and CR pol recombinants prevail at the cities with highest AIDS prevalence rate in Brazil. **AIDS Res. Hum. Retroviruses**. V. 23, p. 1579-1586, 2007.

BRITO, A. et al. Women Infected with HIV Type 1 Brazilian Variant, Subtype B (B'-GWGR Motif) Have Slower progression to AIDS, Compared with Patients Infected with Subtype B (B-GPGR Motif). **Clin Infect Dis**. 43: 1476-1481, 2006.

BRITO A. M., CASTILHO E. A. & SZWARCOWALD C. L. AIDS e infecção pelo HIV no Brasil: uma epidemia multifacetada. **Rev Soc Brasil Med Trop**. 34(2), 207-217, 2000.

CARDOSO, L. P. V. et al. HIV-1 *pol* phylogenetic diversity and antiretroviral resistance mutations in treatment naïve patients from Central West Brazil. **J Clin Virology**. 46: 134-139, 2009.

CARIDE, E. et al. Genotypic and phenotypic evidence of different drug-resistance mutation patterns between B and non-B subtype isolates of human immunodeficiency virus type 1 found in Brazilian patients failing HAART. **Virus Genes**. 23(2): 193-202, 2001.

CARR, J. K. et al. Diverse BF recombinants have spread widely since the introduction of HIV-1 into South America. **AIDS**. 15:F41-F47, 2001.

CARVALHO, B. C. et al. Moderate prevalence of transmitted drug resistance and interiorization of HIV type 1 subtype C in the inland North State of Tocantins, Brazil. **AIDS Res Hum Retroviruses**. 10: 1081-7, 2011.

CARVALHO, F. H. P. et al. HIV/HV coinfection at na university hospital in Recife, Brazil. **Rev. Saúde Pública.** 43(1): 133-139, 2009.

CASSEB, J. et al. HIV disease progression: Is the Brazilian variant subtype B' (GWGR motif) less pathogenic than US/European subtype B (GPGR)? **Int J Infect Dis.** 6: 64-69, 2002.

CASTELBRANCO, E. P. et al. Frequency of primary resistance to antiretroviral drugs and genetic variability of HIV-1 among infected pregnant women recently diagnosed in Luanda-Angola. **AIDS Res Hum Retroviruses.** 26(12): 1313-16, 2010

CAVALCANTI, A. M. S. et al. Antiretroviral resistance in individuals presenting therapeutic failure and subtypes of the human immunodeficiency vírus type 1 in the Northeast Region of Brazil. **Mem Isnt Oswaldo Cruz.** 102(7); 785-792, 2007.

CAVALCANTI, A. M. S. et al. Primary resistance of HIV to antiretrovirals among individuals recently diagnosed at voluntary counselling and testing centres in the metropolitan region of Recife, Pernambuco. **Mem Isnt Oswaldo Cruz.** 107(4); 450-457, 2012.

CHOISY, M. et al. Comparative study of adaptative molecular evolution in different human immunodeficiency virus groups and subtypes. **Journal of Virology.** V.78(4), p. 1962-1970, 2004.

CLEMENTI, M.; LAZZANRI, A. Human immunodeficiency virus type 1 fitness and tropism: concept, quantification, and clinical revelance. **European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases.** V. 16, p. 1532-1538, 2010.

COBAS® e411. Indianapolis, USA: Roche Diagnostics, 2010. Bula de kit diagnóstico.

COBAS®, AmpliPrep/ COBAS® TaqMan® HCV Test. New Jersey, USA: Diagnostics, 2011. Bula de kit diagnóstico.

COUTO-FERNANDEZ, J. C. et al. HIV-1 Subtyping in Salvador, Bahia, Brazil: A City With African Sociodemographic Characteristics. **J Acquir Immune Defic Syndr.** 22: 288-293, 1999.

COUTO-FERNANDEZ, J. C. et al. Phylogenetic Analysis of Brazilian HIV Type 1 Subtype D Strains: Tracing the Origin of This Subtype in Brazil. **AIDS Res. Hum. Retroviruses.** V. 22(2), p.207-211, 2006.

CUNHA, R. D. et al. Differential *In Vitro* Kinetics of Drug Resistance Mutation Acquisition in HIV-1 RT of Subtypes B and C. **Plos ONE.** 7(10): e46622. 2012 doi: 10.1371/journal.pone.0046622.

DELATORRE, E. O. & BELLO, G. Phylodynamics of HIV-1 Subtype C Epidemic in East Africa. **Plos ONE.** 7(7): e41904. 2012 doi: 10.1371/journal.pone.0041904.

DELATORRE, E. et al. Tracing the Origin and Northward Dissemination Dynamics of HIV-1 Subtype C in Brazil. **Plos ONE.** 8(9): e74072. 2013 doi: 10.1371/journal.pone.0074072.

DELGADO, E. et al. Identification of a New HIV Type 1 BF Intersubtype Circulating Recombinant Form (CRF44\_BF) in Chile. **AIDS Res. Hum. Retroviruses.** 26(7), 821-826, 2010.

DE OLIVEIRA, T. et al. Na Automated Genotyping System for Analysis of HIV-1 and other Microbial Sequences. **Bioinformatics.** 21(19): 3797-3800, 2005.

DE OLIVEIRA, T. et al. The HIV-1 Subtype C Epidemic in South America Is Linked to the United Kingdom. **Plos ONE.** 5(2): e9311. 2010 doi: 10.1371/journal.pone.009311.

DE SÁ FILHO, D. J. et al. Analysis of full-length human immunodeficiency virus type 1 genome reveals a variable spectrum of subtypes B and F recombinants in São Paulo, Brazil. **AIDS Res. Hum. Retroviruses**. V. 21(2), p. 145-151, 2005.

DE SÁ FILHO, D. J. et al. Identification of two HIV type 1 circulating recombinant form in Brazil. **AIDS Res. Hum. Retroviruses**. V. 22, p. 1-13, 2006.

DE SÁ FILHO, D. J. et al. HIV Type 1 *pol* Diversity and Antiretroviral Drug Resistance Mutations In Santos, Brazil. **AIDS Res. Hum. Retroviruses**. 24(3): 347-353, 2008.

DIAS, C. F. et al. High prevalence and association of HIV-1 non-B subtype with specific sexual transmission risk antiretroviral naïve patients in Porto Alegre, RS, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**. V. 51 (4), p. 191-196, 2009.

DILERNIA, D. A. et al. Analysis of HIV Type 1 BF Recombinant Sequences from South America Dates the Origin of CRF12\_BF to a Recombination Event in the 1970s. **AIDS Res. Hum. Retroviruses**. 27(5):569-578, 2011.

DOURADO, I. et al. HIV-1 seroprevalence in the general population of Salvador, Bahia State, Northeast Brazil. **Cad. Saúde Pública**. 23(1): 25-32, 2007.

DUMANS, A. T. et al. Prevalence of Protease and Reverse Transcriptase Drug Resistance Mutations over Time in Drug-Naïve Human Immunodeficiency Virus Type 1-Positive Individuals in Rio de Janeiro, Brazil. **Antimicrob. Agents Chemother**. 46(9): 3075-3079, 2002.

EASTERBROOK, P. J. et al. Impact of HIV-1 viral subtype on disease progression and response to antiretroviral therapy. **Journal of the International AIDS Society**. 13:4, 2010.

EYER-SILVA, W. A. & MORGADO, M. G. Autochthonous horizontal transmission of a CRF02\_AG strain revealed by a human immunodeficiency virus type 1 diversity survey in a small city in inner state of Rio de Janeiro, Southeast Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. 102(7): 809-815, 2007.

FARIA, N. R. et al. The early spread and epidemic ignition of HIV-1 in human populations. **SCIENCE**. 346: 56-61, 2014.

FERNÁNDEZ-GARCÍA, A. et al. Identification of a New HIV Type 1 Circulating BF Intersubtype Recombinant Form (CRF47\_BF) In Spain. **AIDS Res Hum Retoviruses**. 26(7): 827-832, 2010.

FERREIRA, A. S. et al. Moderate Prevalence of Transmitted Drug Resistance and High HIV-1 Genetic Diversity in Patients From Mato Grosso State, Central western Brazil. **J. Med. Virol**. 83: 1301-1307, 2011.

FERREIRA, V. et al. The Influence of HIV-1 Subtype in Response to Therapeutic Dendritic Cell Vaccine. **The Open AIDS Journal**. 6: 289-292, 2012.

FONTELLA, R.; SOARS, M. A. & SCHRAGO, C. G. On the origin of HIV-1 subtype C in south America. **AIDS**. 22: 2001-2011, 2008.

FREIMANIS, G. L.; LOUA, A. & ALLAIN, J. P. HIV-1 subtype D and F are prevalent in Guinea Conakry. **J Clin Virol**. 53(4): 350-353, 2012.

GADELHA, S. R. et al. Molecular Epidemiology of Human Immunodeficiency Virus-1 in the State of Ceará, Northeast, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. 98(4): 461-464, 2003.

GERRETI, A. M. et al. Effect of HIV-1 subtype on virologic and immunologic response to starting highly active antiretroviral therapy. **CID**. 48: 1296-1305, 2009.

GIFFORD, R. J. et al. Phylogenetic surveillance of viral genetic diversity and the evolving molecular epidemiology of Human Immunodeficiency Virus type 1. **Journal of Virology**. 81(23): 13050-13057, 2007. doi: 10.1128/JVI.00889-07.

GILBERT, M. T. P. et al. The emergence of HIV/AIDS in the Americas and beyond. **PNAS**. 104(47), 18566-18570, 2007.

GOMEZ, C. M. Mother-to-child HIV type 1 transmission in Argentina: BF recombinants have predominated in infected children since the mid-1980s. **AIDS Res Hum Retoviruses**. 18: 477-483, 2002.

GRÄF, T. & PINTO, A. R. The increasing prevalence of HIV-1 subtype C in Southern Brazil and its dispersion through the continent. **Virology**. 453: 170-178, 2013.

GUIMARÃES, M. L. et al. High Frequency of Recombinant Genomes in HIV Type 1 Samples from Brazilian Southeast and Southern Regions. **AIDS Res Hum Retoviruses**. 18(17): 1261-1269, 2002.

GUIMARÃES, M. L. et al. Identification of two new CRF\_BF in Rio de Janeiro State, Brazil. **AIDS**. V.22, p. 433-438, 2008.

GUIMARÃES, M. L. et al. Close phylogenetic relationship between Angolan and Romanian HIV-1 F1 isolates. **Retrovirology**. 6:39, 2009.

GUIMARÃES, M. L. et al. Analysis of HIV-1 BF *pr/rt* recombinant strains from Rio de Janeiro/Brazil reveals multiple unrelated mosaic structures. **Infect. Genet. Evol.** V.10, p.1094-1100, 2010.

HAALAND, JOHNSON & TANG, 2013. Recent Advances in Research of HIV Infection: Implications of Viral and Host Genetics on Treatment and Prevention. **Public Health Genomics**. 16: 31-36, 2013.

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. Oxford University Press: Nucleic Acids Symposium Series. N. 41, 95-98, 1999.

HAWKE, K. G. et al. HIV Non-B Subtype Distribution: Emerging Trends and Risk Factors for Imported and Local Infections Newly Diagnosed in South Australia. **AIDS Res Hum Retroviruses**. 29(2): 311-317, 2013.

HEMELAAR, J. Global trends in molecular epidemiology of HIV-1 during 2000-2007. **AIDS**. 25(5): 679-689, 2011.

HERSH, B. S. et al. Acquired immunodeficiency syndrome in Romania. **Lancet**. 338: 654-659, 1991.

HUÉ, S. et al. HIV-1 pol gene variations is sufficient for reconstruction of transmission in the era of antiretroviral therapy. **AIDS**. V.18, p. 719-728, 2004.

HUÉ, S. et al. Investigation of HIV-1 transmission events by phylogenetic methods: requirement for scientific rigour. **AIDS**. V. 19(4), p. 449-450, 2005a.

HUÉ, S. et al. Genetic analysis reveals the complex structure of HIV-1 transmission within defined risk groups. **PNAS**. 102(12): 4425-4429, 2005b.

HUMAN, Syphilis TPHA Liquid. Wiesbaden, Germany: HUMAN , 2010. Bula de kit diagnóstico.

INOCÊNCIO, L. A. et al. Brazilian network for HIV Drug Resistance Surveillance: a survey of individuals recently diagnosed with HIV. **Journal of the International AIDS Society**. 12:20, 2009.

IVANOV, I. A. et al. Detail Molecular Epidemiologic Characterization of HIV-1 Infection in Bulgaria Reveals Broad Diversity and Evolving Phylodynamics. **Plos ONE**. V. 8(3): e59666. doi: 10.1371/journal.pone.0059666. 2013.

JANSSENS, W. et al. HIV-1 subtype H near-full length genome reference strain and analysis of subtype-H-containing inter-subtype recombinants. **AIDS**. 14:1533-1543, 2000.

JONES, L. R. et al. In-depth analysis of the origins of HIV type 1 subtype C in South America. **AIDS Res. Hum. Retroviruses**. V. 25(10), p.951-959, 2009.

JUNQUEIRA, D. M. et al. Reviewing the History of HIV-1 Spread of Subtype B in the Americas. **Plos ONE**. 6(11): e27489. 2011 doi: 10.1371/journal.pone.0027489.

KAHLE, E. et al. HIV-1 subtype C is not associated with higher risk of heterosexual HIV-1 transmission: a multinational study among HIV-1 serodiscordant couples. **AIDS**. 28(2): 235-243, 2014.

KAYE, M. Phylogenetic investigation of transmission pathways of drug-resistant HIV-1 utilizing pol sequences derived from resistance genotyping. **J Acquir Immune Defic Syndr**. V.49(1), p.9-16, 2008.

KRAUCHENCO, S. et al. Effectiveness of commercial inhibitors against subtype F HIV-1 protease. **J Enzyme Inhib Med Chem**. 24(3): 638-645, 2009.

LACERDA, H. R. et al. Comparison of the epidemiology, profile of mutations, and clinical response to antiretrovirals among subtypes B and F of the human immunodeficiency virus type 1. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. 102(6): 693-699, 2007.

LAUKKANEN, T. et al. Virtually Full-Length Subtype F and F/D Recombinant HIV-2 from Africa and South America. **Virology**. 269: 95-104, 2000.

LEAL, É. S.; HOLMES, E. C. & ZANOTTO, P. M. A. Distinct patterns of natural selection in the reverse transcriptase gene of HIV-1 in the presence and absence of antiretroviral therapy. **Virology**. V. 325, p. 181-191, 2004.

LEAL, É. et al. Evolutionary Dynamics of HIV-1 BF and CB Recombinants and Its Parental Counterparts in South America. **Retrovirology: Research and Treatment**. 1: 1-14, 2008.

LEAL, É.; VILLANOVA, F. E. Diversity of HIV-1 subtype B: Implications to the origin of BF recombinants. **Plos ONE**. V. 5(7): e11833. 2010 doi: 10.1371/journal.pone.0011833.

LEMEY, P. et al. Molecular footprint of drug-selective pressure in a Human Immunodeficiency Virus transmission chain. **Journal of Virology**. V. 79(18), p.11981-11989, 2005.

LEUNG, R. K. K. et al. An unusual cluster of HIV-1 B/F recombinants in an Asian population. **International Journal of Infectious Disease**. 14S:e294-e298, 2010.

LI, L. et al. Recombination Form and Epidemiology of HIV-1 Unique Recombinant Strain Identified in Yunnan, China. **Plos ONE**. V.7(10): e46777. doi: 10.1371/journal.pone.0046777. 2012.

LOLE, K. S., et al. Full-length Human Immunodeficiency Virus Type 1 Genomes from Subtype C-Infected Seroconverters in India, With Evidence of Intersubtype Recombination. **J. Virol**. 73(1): 152-160, 1999.

LOS ALAMOS. HIV Sequence Database. **HIV-1 Gene Map**. Disponível em: <http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/MAP/landmark.html>. Acesso em 07 set 2014.

LOUWAGIE, J. et al. Genetic analysis of HIV-1 isolates from Brazil reveals presence of two distinct genetic subtypes. **AIDS Res Hum Retroviruses**. 10(5): 561-567, 1994.

MACHADO, L. F. A., et al. Molecular Epidemiology of HIV Type 1 in Northern Brazil: Identification of Subtypes C and D and the Introduction of CRF02\_AG in the Amazon Region of Brazil. **AIDS Res. Hum. Retroviruses**. V. 25(10), p.961-966, 2009.

MAHY, M. et al. Measuring the impact of the global response to the AIDS epidemic: Challenges and futures directions. **J Acquir Immune Defic Syndr.** V.52 Suppl 2, S152-159, 2009.

MASCIOTRA, S. et al. Evidence of a high frequency of HIV-1 subtype F infections in a heterosexual population in Buenos Aires, Argentina. **AIDS Res. Hum. Retroviruses.** 16(10): 1007-1014, 2000.

MBISA, J. L. et al. Phylodynamic and Phylogeographic Patterns of the HIV Type 1 Subtype F1 Parenteral Epidemic in Romania. **AIDS Res. Hum. Retroviruses.** V. 28(9): 961-966, 2012.

MEDEIROS, L. B. et al. Primary resistance of human immunodeficiency virus type 1 in a reference center in Recife, Pernambuco, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 101(8): 845-849, 2006.

MEHTA, S. R. et al. Using phylogeography to characterize the origins of the HIV-1 subtype F epidemic in Romania. **Infect Genet Evol.** V.11:975-979, 2011.

MONTANO, S. M. et al. Prevalences, Genotypes, and Risk Factors for HIV Transmission in South America. **J Acquir Immune Defic Syndr.** 40(1):57-64, 2005.

MONTEIRO, J. P. et al. Genetic Variability of Human Immunodeficiency Virus-1 in Bahia State, Northeast, Brazil: High Diversity of HIV Genotypes. **J. Med. Virol.** 81: 391-399, 2009.

MOREIRA, M. et al., Characteristics of co-infections by HCV and HBV among Brazilian patients infected by HIV-1 and/HTLV-1. **Braz J Infect Dis.** 17(6): 661-666, 2013.

MORGADO, M. G. V3 Region Polymorphism in HIV-1 from Brazil: Prevalence of Subtype B Strains Divergent from North American/European Prototype and Detection of subtype F. **AIDS Res Hum Retroviruses.** 10(5): 569-575, 1994.

MUNERATO, P. et al. HIVType 1 antiretroviral resistance mutations in subtype B, C, and F in the City of São Paulo, Brazil. **AIDS Res Hum Retroviruses**. 26(3): 265-273, 2010.

MURILLO, W. et al. A single Early Introduction of HIV-1 Subtype B into Central America Accounts for Most Current Cases. **J Virol**. 87(13): 7463-7470, 2013.

NEOGI, U. et al. Global HIV-1 molecular epidemiology with especial reference to genetic analysis of HIV-1 subtypes circulating in North India: Functional and pathogenic implications of genetic variation. **Indian Journal of Experimental Biology**. 47:424-431, 2009.

PARASKEVIS, D. et al. Molecular characterization of HIV-1 infection in Northwest Spain (2009-2013): Investigation of the subtype F outbreak. **Infect Geneti Evol**. 30: 96-101, 2015.

PASSAES, C. B. et al. Lack of primary mutations associated with integrase inhibitors among HIV-1 subtype B, C, and F circulating in Brazil. **J Acquir Immune Defic Syndr**. 51(1): 7-12, 2009.

PEDROSO, C. et al. High Prevalence of Primary Antiretroviral Resistance Among HIV-1 Adults and Children in Bahia, a Northeast State of Brazil. **J Acquir Immune Defic Syndr**. 45(2): 249-250, 2007.

PESSÔA, R. et al. (a). Deep Sequencing of HIV-1 near Full-Length Proviral Genomes Identifies High Rates of BF1 Recombinants Including Two Novel Circulating Recombinant Forms (CRF) 70\_BF1 and a Disseminating 71\_BF1 among Blood Donors in Pernambuco, Brazil. **PLoS ONE**. 9(11): e112674. doi:10.1371/journal.pone.0112674. 2014a.

PESSÔA, R. et al (b). Identification of a Novel HIV-1 Circulating Recombinant Form (CRF72\_BF1) in Deep Sequencing Data from Blood Donors in Southeastern Brazil. **Genome Announc**. 2(3): e00386-14 doi.10.1128/genomeA00386-14.

PIMENTEL, V. F. et al. Temporal trends and molecular epidemiology of HIV type 1 infections in Rio de Janeiro, Brazil. **AIDS Res. Hum. Retroviruses**. 29(12):1553-1561, 2013.

PINTO, M. E. et al. A molecular study on the evolution of a subtype B variant frequently found in Brazil. **Genetics and Molecular Research**. 7(4), 1031-1044, 2008.

QUARLERI, J. F. et al. HIV type 1 BF recombinant strains exhibit different pol gene mosaic patterns: descriptive analysis from 284 patients under treatment failure. **AIDS Res Hum Retroviruses**. 20(10), 1100-7, 2004.

RISTIC, N. et al. analysis of the origin and evolutionary history of HIV-1 CRF28\_BF and CRF29\_BF reveals a decreasing prevalence in the AIDS epidemic of Brazil. **PLoS ONE**. 6(3): e17485. doi: 10.1371/journal.pone.0017485.

ROBERTSON, D. L. et al. HIV-1 nomenclature proposal. **Science**. 288: 55-56, 2000.

RUCHANSKY, D. et al. Identification of a new HIV Type 1 circulating recombinant form (CRF38\_BF1) in Uruguay. **AIDS Res Hum Retroviruses**. 25(3): 351-356, 2009.

SÁ FILHO, D. et al. Characterization of the Full-Length Human Immunodeficiency Virus-1 Genome from Recently Infected Subjects in Brazil. **AIDS Res Hum Retroviruses**. 23(9): 1087-1094, 2007.

SABINO, E.C. et al. Identification of human immunodeficiency virus type 1 envelope genes recombinant between subtypes B and F in two epidemiologically linked individuals from Brazil. **J Virol**. 68: 6340-6346, 1994.

SALADINI, F. et al. Near Full-Length sequence Analysis of HIV Type 1 BF Recombinants from Italy. **AIDS Res Hum Retroviruses**. 28(3): 299-303, 2012.

SAMPAIO, A. S. et al. Prevalencia de la co-infección con hepatitis B y C em pacientes HIV positivos y factores de riesgo asociados. **Atualizaciones EN SIDA**. 17(63): 12-17, 2009.

SANABANI, S. S. et al. Near full-length genome analysis of low prevalent human immunodeficiency virus type 1 subclade F1 in São Paulo, Brazil. **Virology Journal**. 2009. Disponível em: <http://www.virologyj.com/content/6/1/78>. Acesso em 13 out 2010.

SANABANI, S. S. et al. Characterization and frequency of a newly identified HIV-1 BF1 intersubtype circulating recombinant form in São Paulo, Brazil. **Virology Journal**. V.7 (74). Doi: 10.1186/1743-422X-7-74. 2010.

SANTORO, M. M. et al. Comparative Analysis of Drug REsistance Among B and the Most Prevalent Non-B HIV Type 1 Subtypes (C, F, and CRF02\_AG) in Italy. **AIDS Res. Hum. Retroviruses**. 28(10):1285-1293, 2012.

SANTORO-LOPES, G. et al. HIV Disease Progression and V3 Serotypes in Brazil: Is B Different from B-Br? **AIDS Res. Hum. Retroviruses**. 16(10): 953-958, 2000.

SANTOS, A. F. et al. Characterization of a new circulating recombinant form comprising HIV-1 subtypes C and B in southern Brazil. **AIDS**. V. 20, p. 2011-2019, 2006.

SANTOS, A. F. et al. Epidemiologic and evolutionary trends of HIV-1 CRF31\_BC related strains in Southern Brazil. **J acquir. Immune Defic. Syndr**. V.45, p. 328-333, 2007.

SANTOS, A. F & SOARES, M. A. HIV Genetic Diversity and Drug Resistance. **Viruses**. 2: 503-531, 2010.

SANTOS, E. A. et al. Diversidade genética do vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1) em mulheres infectadas de uma cidade do nordeste do Brasil. **Rev Bras Ginecol Obstet.** 31(12): 609-614, 2009.

SANTOS, L. A. et al. Detection of Distinct Human Immunodeficiency Virus Type 1 Circulating Recombinant Forms in Northeast Brazil. **J Med Virol.** 83: 2066-2072, 2011.

SIEPEL, A.C. et al. A computer program designed to screen rapidly for HIV type 1 intersubtype recombinant sequences. **AIDS Res Hum Retroviruses.** 11(11): 1413-1416, 1995.

SIERRA, M. et al. The analysis of near full-length genome sequences of human immunodeficiency virus type 1 BF intersubtype recombinant viruses from Chile, Venezuela and Spain reveals their relationship to diverse lineages of recombinant viruses related to CRF\_12BF. **Infect Genet Evol.** 5: 209-217, 2005.

SILJIC, M. et al. Molecular typing of the local HIV-1 epidemic in Serbia. **Infect Genet Evol.** 19: 378-385, 2013.

SILVA, M. M. G. et al. HIV subtype, epidemiological and mutational correlations in patients from Paraná, Brazil. **Braz J Infect Dis.** 14(5): 495-501, 2010.

SILVEIRA, J. et al. Heterosexual transmission of human immunodeficiency virus type 1 subtype C in southern Brazil. **J Clin Virol.** 54:36-41, 2012.

SNOECK, J. et al. Mapping of positive selection sites on the HIV-1 genome in the context of RNA and protein structural constraints. **Retrovirology.** 8:87, 2011.

SOARES, C. M. P. et al. Prevalence of transmitted HIV-1 antiretroviral resistance among patients initiating antiretroviral therapy in Brazil: a surveillance study using dried blood spots. **Journal of the International AIDS Society.** 17:19042, 2014.

SOARES, E. A. et al. Epidemiologic and molecular characterization of human immunodeficiency virus type 1 in southern Brazil. **J Acquir Immune Defic Syndr.** V.17, p. 1063-1069, 2003.

SOARES, E. A. J. M. et al. HIV-1 subtype C dissemination in Southern Brazil. **AIDS.** 19(suppl4):S81-S86, 2005.

SOARES, E. A. J. M. et al. Differential Drug Resistance Acquisition in HIV-1 of Subtypes B and C. **Plos ONE.** 2(8): e730. 2007 doi: 10.1371/journal.pone.0000730.

SOARES DE OLIVEIRA, A. C. et al. Frequency of subtype B and F1 dual infection in HIV-1 positive, Brazilian men who have sex with men. **Virology Journal.** 9:223, 2012.

SOUZA, A. C. M. F. et al. Molecular characterization of HIV type 1 BF pol recombinants from São Paulo, Brazil. **AIDS Res. Hum. Retroviruses.** V. 24 (12), p. 1521-1525, 2008.

STRUCHINER, C. J.; PINTO, M. E. A diversidade do HIV-1: uma ferramenta para o estudo da pandemia. **Cad. Saúde Pública.** V. 22(3), p. 473-484, 2006.

TAMURA, K. et al. MEGA 5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Mol. Biol. Evol.** 28(10): 2731-2739, 2011.

TANURI, A. et al. Genetic Variation and Susceptibilities to Protease Inhibitors among Subtype B and F Isolates in Brazil. **Antimicrob. Agents Chemother.** 43(2): 253-258, 1999.

TAYLOR, B. S. et al. the Challenge of HIV-1 subtype diversity. **N Engl J Med.** 358, p. 1590-1602, 2008.

THOMPSON, J. D. et al. The CLUSTAL X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**. V.25(24), 4876-4882, 1997.

THOMSON, M. M. et al. Diversity of mosaic structures and common ancestry of human immunodeficiency virus type 1 BF intersubtype recombinant viruses from Argentina revealed by analysis of near full-length genome sequences. **Journal of General Virology**. V. 83, p. 107-119, 2002.

THOMSON, M. M. et al. Analysis of Near Full-Length Genome Sequences of HIV Type 1 BF Intersubtype Recombinant Viruses from Brazil Reveals Their Independent Origins and Their Lack of Relationship to CRF12\_BF. **AIDS Res Hum Retroviruses**. 20(10): 1126-1133, 2004.

TRIQUES, K. et al. High Diversity of HIV-1 Subtype F Strains in Central Africa. **Virology**. 259: 99-109, 1999.

TRIQUES, K. et al. Near-full-length genome sequencing of divergent African HIV type 1 subtype F viruses leads to the identification of a new HIV type 1 subtype designated K. **AIDS Res Hum Retroviruses**. 16(2): 139-151, 2000.

VALLARI, A. et al. Confirmation of Putative HIV-1 Group P in Cameroon. **Journal of Virology**. V. 85 (3), 1403-1407, 2011.

VELASCO-DE-CASTRO, C. A., et al. HIV-1 Diversity and Drug Resistance Mutations among People Seeking HIV Diagnosis in Voluntary Counseling and Testing Sites in Rio de Janeiro, Brazil. **Plos ONE**. 9(1): e87622. 2014 doi: 10.1371/journal.pone.0087622.

UNAIDS 2013, Global report: UNAIDS Report on the global AIDS epidemic 2013.

VÉRAS, N. M. C. et al. High-resolution phylogenetics and phylogeography of human immunodeficiency virus type 1 subtype C epidemic in South America. **J Gen Virol**. 92: 1698-1709, 2011.

VERMUND & LEIGH-BROWN. The HIV Epidemic: High-Income Countries. **Cold Spring Harb Perspect Med.** 2:a007195, 2012.

VICENTE, A. C. et al. The HIV epidemic in the Amazon Basin is driven by prototypic and recombinant HIV-1 subtypes B and F. **J Acquir Immune Defic Syndr.** V.23, p. 327-331, 2000.

WIGG, M. D. Vírus da Imunodeficiência Humana. In: SANTOS, N. S. O.; ROMANOS, M. T. V.; WIGG, M. D. Introdução à virologia humana. Ed. Guanabara Koogan, 2002, capítulo 14, p.183-197.

YOSHIDA, I. et al. Change of Positive Selection Pressure of HIV-1 Envelope Gene Inferred by Early and Recent Samples. **PLoS ONE.** 6(4): e18630. Doi: 10.1371/journal.pone.0018630.

ZHANG, M. et al. jpHMM at GOBICS: a web server to detect genomic recombinations in HIV-1. **Nucleic Acids Research.** 34: 463-465, 2006.

**APÊNDICE A****FORMULÁRIO DA PESQUISA PARA  
OBTENÇÃO DOS DADOS****Variáveis sociodemográficas**

1) Código da amostra no local de origem (CTA ou hospital):  
\_\_\_\_\_

2) Código da amostra na pesquisa:  
\_\_\_\_\_

3) Data de obtenção da amostra para sequenciamento:  
\_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

1- ( ) Não informado.

4) Data de diagnóstico da infecção pelo HIV-1: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

1- ( ) Não informado.

5) Idade: \_\_\_\_\_

1- ( ) Não informado.

6) Sexo: ( ) 1- Feminino  
( ) 2- Masculino

( ) 3- Não informado.

7) Gestação:

( ) 1- Sim.

( ) 2- Não.

( ) 3- Não se aplica.

8) Escolaridade:

( ) 1- Analfabeto.

( ) 2- < 8 anos.

( ) 3- >= 8 anos.

( ) 4- Não informado.

9) Local de residência:

( ) 1- Recife.

( ) 2- Olinda.

( ) 3- Paulista.

( ) 4- Jaboatão dos Guararapes.

( ) 5- Cabo de Santo Agostinho.

( ) 6- Outra cidade da RMR:

Qual? \_\_\_\_\_

( ) 7- Outra cidade fora da RMR:

Qual? \_\_\_\_\_.

( ) 8- Não informado.

10) Local de origem das amostras:

( ) 1- CTA Recife.

( ) 2- CTA Olinda.

( ) 3- CTA Paulista.

( ) 4- CTA Jaboatão.

( ) 5- CTA Cabo.

( ) 6- Hospital das Clínicas.

( ) 7- Não informado.

11) Categoria de exposição:

( ) 1- HSH / masculino.

( ) 2- HTS / masculino.

( ) 3- HTS / feminino.

( ) 4- Parceiro de HIV+.

- 5- Profissional do sexo.
- 6- UDI.
- 7- UDNI.
- 8- Transfusão de sangue.
- 9- Não informado.

12) Inserção no mercado de trabalho:

- 1- Empregado.
- 2- Autônomo (informal).
- 3- Desempregado.
- 4- Estudante.
- 5- Dona de casa.
- 6- Aposentado.
- 7- Não informado.

13) Estado Civil:

- 1- Solteiro.
- 2- Casado / Relação estável.
- 3- Separado / divorciado.
- 4- Viúvo.
- 5- Não informado.

**Variáveis laboratoriais:**

14) Determinação da infecção recente pelo HIV-1:

- 1- Infecção recente
- 2- Infecção tardia.

3- Não realizado / não disponível.

Motivo: \_\_\_\_\_

15) Contagem de células T CD4+:

1- Não informado.

16) Data da realização da contagem de células T CD4+: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

1- Não informado.

17) Carga viral: \_\_\_\_\_

1- Não informado.

18) Data da realização da carga viral: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

1- Não informado.

19) Co-infecção HBV-HIV:

- 1- Sem co-infecção.
- 2- Co-infectado (Anti-HBc total reagente)
- 3- Não realizado / não disponível.

Motivo: \_\_\_\_\_

Outros marcadores reagentes na sorologia para HBV: \_\_\_\_\_

20) Presença de HBV-DNA:

- 1- HBV-DNA negativo.
- 2- HBV DNA positivo.
- 3- Não realizado/não disponível.

Motivo: \_\_\_\_\_

4- Não se aplica.

21)Carga viral HBV-DNA:

1- Não realizado/não disponível.

Motivo: \_\_\_\_\_

2- Não se aplica.

22)Co-infecção HCV-HIV:

1- Sem co-infecção.

2- Co-infecção.

3- Não realizado / não disponível.

Motivo: \_\_\_\_\_

23)Presença de HCV-RNA:

1- HCV-RNA negativo.

2- HCV-RNA positivo.

3- Não realizado/não disponível.

Motivo: \_\_\_\_\_

4- Não se aplica.

24)Carga viral HCV-RNA:

1- Não realizado/não disponível.

Motivo: \_\_\_\_\_

2- Não se aplica.

25)Co-infecção HTLV-HIV:

1- Sem co-infecção.

2- Co-infecção

3- Não realizado / não disponível.

Motivo: \_\_\_\_\_

26)Co-infecção sífilis-HIV:

1- Sem co-infecção.

2- Co-infecção

3- Não realizado / não disponível.

Motivo: \_\_\_\_\_

27)Título do VDRL:

1- 1/2

2- 1/4

3- 1/8

4- 1/16

5- 1/32

6- 1/64

7- 1/128

8- 1/256

9- Não realizado / não disponível.

Motivo: \_\_\_\_\_

10- Não se aplica.

#### **Variáveis de características virais:**

28) Subtipo Viral:

1- Subtipo A.

2- Subtipo B.

3- Subtipo C.

- 4- Subtipo D.
  - 5- Subtipo F.
  - 6- Subtipo G.
  - 7- Subtipo H.
  - 8- Subtipo J.
  - 9- Subtipo K.
  - 10-Não se aplica.
- 3- Negra.
  - 4- Amarela.
  - 5- Indígena.
  - 6- Não informado.

29) Formas recombinantes intersubtipos:

- 1- BF. Qual? \_\_\_\_\_
- 2- BC. Qual? \_\_\_\_\_
- 3- Outras: \_\_\_\_\_
- 4- Não se aplica.

30) Presença de mutações de resistência transmitida:

- 1- Sem mutações
- 2- NRTI.  
Quais? \_\_\_\_\_
- 3- NNRTI.  
Quais? \_\_\_\_\_
- 4- IP.  
Quais? \_\_\_\_\_
- 5- Não se aplica.

31) Clusters de transmissão:

- 1- Cluster.
- 2- Não-cluster.

32) Cor:

- 1- Branca.
- 2- Parda.

**APÊNDICE B - SEQUÊNCIAS DE REFERÊNCIA UTILIZADAS NAS ANÁLISES DO SIMPLOT**

A1.SN.2001.DDI579.AY521629  
A1.TZ.2001.A173.AY253305  
A2.CD.1997.97CDKTB48.AF286238  
A2.CM.2001.01CM 1445MV.GU201516  
B.BR.1990.BZ167.AB485642  
B.FR.1983.HXB2  
BR.02.02BR002  
BR.89.BZ167  
C.BR.2002.02BR2022.JN692434  
C.ET.2002.02ET 288.AY713417  
D.CM.2001.01CM 0009BBY.AY371155  
D.UG.1999.99UGA07412.AF484477  
F1.BR.1989.BZ126.AY173957  
F1.BR.1990.BZ163.AB485656  
F1.BR.1993.93BR020 1.AF005494  
F1.FI.1993.FIN9363.AF075703  
F2.CM.1995.95CM-MP255.AJ249236  
F2.CM.1997.CM53657.AF377956  
G.CM.2004.178 15.FJ389363  
G.ES.2005.P962.EU786670  
H.BE.1993.VI991.AF190127  
H.CF.1990.056.AF005496  
J.SE.1993.SE9280 7887.AF082394  
J.SE.1994.SE9173 7022.AF082395  
K.CD.1997.97ZR-EQTB11.AJ249235  
K.CM.1996.96CM-MP535.AJ249239

## APÊNDICE C - ARTIGO 1: Submissão à revista PLoS ONE

PLOS ONE

### Molecular Characterization of HIV-1 from 2002 to 2009 Shows an Increase in Viral Variability and the Detection of Rare Subtypes and Recombinants --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Article Type:	Research Article
Full Title:	Molecular Characterization of HIV-1 from 2002 to 2009 Shows an Increase in Viral Variability and the Detection of Rare Subtypes and Recombinants
Short Title:	HIV-1 molecular epidemiology - Northeast-Brazil
Corresponding Author:	Kleodoaldo Lima Universidade Federal de Pernambuco RECIFE, PERNAMBUCO BRAZIL
Keywords:	HIV-1 Subtype F1 Brazil Molecular evolution Molecular epidemiology
Abstract:	A wide variety of HIV-1 subtypes and circulating recombinant forms (CRFs) are found in Brazil, demonstrating the high variability in the Brazilian HIV-1 epidemic. The majority of HIC-1 molecular epidemiological studies in Brazil were conducted in the southern and south-eastern regions, where the epidemic has been studied in more depth, although several recent studies in the north-eastern region have addressed this issue. The objective of this study was the molecular characterisation of HIV-1 in Pernambuco, in north-eastern Brazil, via sequencing of the pol region. Sixty-four samples were collected from 2002-2003, and another 105 were collected from 2007-2009. The protease (PR) and partial reverse transcriptase (RT) regions of the HIV-1 polymerase (pol) gene were sequenced, and subtyping, recombination, and phylogenetic analyses were performed. Subtype B (60.9%) was found to be predominant, followed by HIV-1 F (31.4%); several distinct BF recombinants and one recombinant BC type, as well as an AG subtype and an H subtype were also identified. The intra-subtype genetic diversity was estimated to be 0.065 (SD = ± 0.004) for HIV-1 B and 0.055 (SD = ± 0.004) for HIV-1 F, reflecting greater accumulation of mutations in subtype B ( $p < 0.01$ ). More codons were found to be under positive selection pressure in samples collected from 2007 to 2009, from individuals with a T cell count $\geq 200$ , from patients with a long-term infection, and from women. Thus, HIV-1 shows high genetic diversity in the state of Pernambuco. Moreover, steady accumulation of mutations over time was detected, and it correlated with several variables.
Order of Authors:	Kleodoaldo Lima Elcio Souza Leal Ana Maria Salustiano Cavalcanti Daniela medeiros Salustiano Luzidalva Medeiros Sirleide Pereira Silva Heloisa Ramos Lacerda
Opposed Reviewers:	
Additional Information:	
Question	Response
Financial Disclosure	All serological assays were financed by CAPES - BR (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior).

## **Molecular Characterisation of HIV-1 from 2002 to 2009 Shows an Increase in Viral Variability and the Detection of Rare Subtypes and Recombinants in Northeast - Brazil**

Kledoaldo Lima<sup>1</sup>; Élcio de Souza Leal<sup>2</sup>; Ana Maria Salustiano Cavalcanti<sup>3</sup>; Daniela Medeiros Salustiano<sup>3</sup>; Luzidalva Barbosa de Medeiros<sup>4</sup>; Sirleide Pereira da Silva<sup>3</sup>; Heloísa Ramos Lacerda<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Postgraduate at Tropical Medicine, Federal University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil; <sup>2</sup> Institute of Biotechnology, Federal University of Pará, Belém, PA, Brazil; <sup>3</sup> Sector of Virology, Central Public Health Laboratory of Pernambuco, Recife, PE, Brazil; <sup>4</sup> Department of Clinical Medicine, Federal University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil.

### **Abstract**

A wide variety of HIV-1 subtypes and circulating recombinant forms (CRFs) are found in Brazil, demonstrating the high variability in the Brazilian HIV-1 epidemic. The majority of HIV-1 molecular epidemiological studies in Brazil were conducted in the southern and south-eastern regions, where the epidemic has been studied in more depth, although several recent studies in the north-eastern region have addressed this issue. The objective of this study was the molecular characterisation of HIV-1 in Pernambuco, in north-eastern Brazil, via sequencing of the *pol* region. Sixty-four samples were collected from 2002–2003, and another 105 were collected from 2007–2009. The protease (PR) and partial reverse transcriptase (RT) regions of the HIV-1 polymerase (*pol*) gene were sequenced, and subtyping, recombination, and phylogenetic analyses were performed. Subtype B (60.9%) was found to be predominant, followed by HIV-1 F (31.4%); several distinct BF recombinants and one recombinant BC type, as well as an AG subtype and an H subtype were also identified. The intra-subtype genetic diversity was estimated to be 0.065 (SD = ± 0.004) for HIV-1 B and 0.055 (SD = ± 0.004) for HIV-1 F, reflecting greater

accumulation of mutations in subtype B ( $p < 0.01$ ). More codons were found to be under positive selection pressure in samples collected from 2007 to 2009, from individuals with a T cell count  $\geq 200$ , from patients with a long-term infection, and from women. Thus, HIV-1 shows high genetic diversity in the state of Pernambuco. Moreover, steady accumulation of mutations over time was detected, and it correlated with several variables.

## Introduction

HIV-1 show high genetic diversity in Brazil: subtype B is the most prevalent, followed by the F and C subtypes; the latter is predominant in the southern region [1,2]. Multiple circulating recombinant forms (CRFs) have been identified in Brazil, such as CRF31\_BC in the south [3], CRF28\_BF and CRF29\_BF in Santos, São Paulo state [4], CRF39\_BF and CRF40\_BF in Rio de Janeiro [5], CRF\_46BF in São Paulo [6], CRF70\_BF and CRF71\_BF in Pernambuco [7], and CRF72\_BF in Minas Gerais [8]. In addition, multiple subtypes and minority recombinants have been identified, such as subtypes A [9] and D [1, 10-13], and recombinants FD [13, 14] and FC [13]. There has been one report of autochthonous horizontal transmission of CRF02\_AG in Rio de Janeiro [15], and this strain has also been identified in the northern region [11]. The unique recombinant form (URF) BF was identified early [16], and its dissemination in various regions of Brazil has subsequently been reported [17-20]. In addition, CRF45\_cpx was recently detected in São Paulo [21].

The HIV-1 epidemic has remained stable in Latin America since 2000 and has stabilised in Brazil since 2004; 2/3 of the people living with HIV in South and Central America are in Brazil ([www.unaids.org/en/dataanalysis/knowyourepidemic/epidemiologypublications/](http://www.unaids.org/en/dataanalysis/knowyourepidemic/epidemiologypublications/)). In Brazil, 656,701 AIDS cases have been reported, 13.5% (88,830) of these were reported in the north-eastern region. The city of Recife has the second highest incidence of AIDS cases among the capital cities in the region and the state of Pernambuco has the highest incidence. In addition, the epidemic is concentrated in higher-risk populations, such as drug users (DU), men who have sex with men (MSM) and sex workers (SW) [22].

HIV-1 also shows high molecular diversity in north-eastern Brazil, with the presence of subtypes B, F, C, and D [12, 23-25]. In addition, a high percentage of BF recombinants have been reported in the state of Bahia [12, 26], and subtypes F, CRF70, and 71\_BF are common in the state of Pernambuco [7, 20].

Circulation of multiple subtypes in one place may facilitate the creation and dispersal of recombinant types [4, 27]. Recombination between subtypes B and F has been identified since the introduction of the latter to South America [28, 29]. These BF recombinants have played an important role in the HIV-1 epidemic in South America, where they dispersed rapidly after their appearance [27, 30].

Since 2002, the incidence of AIDS cases has shown a marked increase in the north and north-eastern regions of Brazil, some of the country's poorest areas [ftp://ftp.ibge.gov.br/Contas\\_Regionalis/2010/pdf/tab02.pdf](ftp://ftp.ibge.gov.br/Contas_Regionalis/2010/pdf/tab02.pdf) [22]. The current study aimed to characterise the molecular epidemiology of HIV-1 in the state of Pernambuco in north-eastern Brazil, by describing the types and frequencies of different viral variants in patients of a referral hospital for infectious disease and at some Voluntary Counselling and Testing Centres (VCTs).

## **Materials and Methods**

### **Study population**

Samples were obtained from patients treated at the Hospital of the Federal University of Pernambuco, between 2002 and 2003, and from individuals who sought treatment at the five largest Voluntary Counselling and Testing Centres (VCTs) in the metropolitan region of Recife between 2007 and 2009; all samples were collected in Pernambuco State, north-eastern Brazil. An additional 64 sequences collected from 2002 to 2003 [23] and 105 sequences from a study by Cavalcanti et al. [20] were included; these sequences were collected from patients from several cities in the metropolitan region of Recife (capital of Pernambuco State) or inner-city regions. Only samples from treatment-naive individuals were included. Convenience sampling

was used, and samples were collected from different groups: heterosexuals, Men who have sex with men (MSM), sex workers SW, pregnant women, injection drug users (IDU), individuals with HIV-positive partners, and blood transfusion recipients. All data were analysed anonymously and were obtained from the databases of the above studies [20, 23]. Additional sociodemographic and behavioural data were collected from the medical records maintained by the institutions where individuals were diagnosed.

CD4+ T lymphocyte counts and viral load quantifications that were not included in the research database were obtained from the records of the Central Public Health Laboratory of Pernambuco (LACEN-PE); the results collected closest to the date of HIV-1 diagnosis were used. CD4+ cell counts were measured by flow cytometry (FACSCalibur, Becton Dickinson, USA) and viral load measurements were obtained using a nucleic acid sequence-based amplification assay (NASBA, Organon Teknika, Netherlands) and a branched chain DNA (bDNA) assay (VERSANT HIV-1 RNA 3.0 assay, Bayer, Germany).

The state of Pernambuco is located in north-eastern Brazil. It borders the Atlantic Ocean and has a population of 9.2 million people in an area of 98148 km<sup>2</sup> (<http://www.ibge.gov.br/estadosat/perfil.php?sigla=pe>). This study was approved by the Ethics Committee of the Health Sciences Center of the Federal University of Pernambuco (CCS-UFPE), number 114 722.

## **Sequencing of the HIV-1 polymerase (*pol*) gene**

Initially, viral RNA was extracted from plasma by using the QIAamp® RNA Mini Kit (Qiagen, Germany). Sequencing of the entire protease (PR) and part of the reverse transcriptase (RT) of the *pol* gene was performed using a ViroSeq™ HIV-1 Genotyping System (Abbott Laboratories, USA) [23] and a TRUGENE® HIV-1 Genotyping Assay (Siemens Diagnostics, USA) [20] and an ABI PRISM 3100 automatic DNA sequencer (Applied Biosystems, USA). Data were analysed using an OpenGene® Sequencing System (Siemens Diagnostics, USA). All procedures followed the manufacturer's instructions. Fragments of 918 base pairs (bp) were obtained encompassing the PR (positions 2262–2549) and part of the RT (positions

2661–3290), relative to reference strain HXB2 (GenBank accession number: K03455).

## Phylogenetic analysis

HIV-1 *pol* sequences were analysed using the REGA Automated Tool for HIV-1 & 2 subtyping (Version 2.0) (<http://www.bioafrica.net/rega-genotype/html/subtypinghiv.html>) for preliminary determination of viral subtype. Additional analysis of each sequence was also conducted using the BLAST ([http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/BASIC\\_BLAST/basic\\_blast.html](http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/BASIC_BLAST/basic_blast.html)), and additional similar sequences were obtained from the Los Alamos HIV sequence database (<http://www.hiv.lanl.gov/content/index>) for further evaluation.

Multiple alignments were performed using the CLUSTAL X software [31], followed by manual editing using the BioEdit software [32]. Sites with gaps or ambiguities were excluded and the reading frame of the *pol* gene was conserved. Several alignments were constructed for the various phylogenetic analyses, encompassing query sequences, similar sequences taken from BLAST and reference sequences obtained from the Los Alamos HIV database.

The nucleotide substitution models for each alignment were selected using the likelihood ratio test (LRT) with the Bayesian Information Criterion (BIC), implemented in MEGA, version 5 [33]. The general time reversible model with gamma distribution and proportion of invariable sites (GTR+G+I) was chosen for the alignments. Phylogenetic inferences were made using the maximum likelihood criteria, and the neighbour-joining (NJ) and maximum-likelihood methods (ML) were used. The statistical support of the trees was evaluated using bootstrap analysis with 1000 replicates. All of the above analyses were performed using MEGA version 5. FigTree version 1.4.0 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>) was used to visualise the trees.

## Screening for HIV-1 inter-subtype recombination

Initially, NJ trees were inferred with query sequences and reference sequences corresponding to the nine group M subtypes of HIV-1, yielding optimum bootstrap support. If any query sequence grouped outside a cluster of reference subtypes, with less than 70% bootstrap support it was considered conflicting and was taken for further analysis of recombination. The neighbour-joining trees were constructed using the Kamura-2-parameters evolutionary model, with 1000 replicates, to calculate bootstrap support. Maximum likelihood trees were inferred using all query sequences and reference strains were used to verify the topology of clades. ML trees were constructed using the nucleotide substitution model GTR + I + G, as described. All analyses were performed using MEGA 5.

Further characterisation of the recombinant types was performed using Recombinant Identification Program (RIP), BLAST genotyping, and SIMPLOT.

A) RIP 3.0 (<http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/RIP/RIP.html>) identifies HIV-1 inter-subtype recombination by calculating the similarity between alignments by using reference strains in each sliding window. We used a window size of 200 bp and a confidence level (confidence threshold) of 90%, removing all gaps.

B) BLAST Genotyping (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genotyping/formpage.cgi>) uses a methodology that helps to identify the genotype of viral sequences. For this, each query sequence is compared, by BLAST, with reference sequences of a particular virus. The Human Immunodeficiency Virus 1 (HIV-1) 2009 RefSeq database was selected for this analysis.

Both methodologies (RIP and BLAST genotyping) aided in orientation and selection of references sequences for SIMPLOT.

C) Bootscanning analyses were performed using the SIMPLOT software version 3.5.1 [34]. The following parameters were used: F84 nucleotide substitution

model with 1000 bootstrap replicates, a sliding window of 200 bp, moving at steps of 20 bp, a confidence level of 90%; the proportion of transition/transversion rates was determined empirically for each alignment evaluated. Sequences with bootstrap support of at least 70% for more than one HIV-1 subtype were considered to be recombinants. Sequences with large segments that showed less than 70% bootstrap support, or those with ambiguities between subtypes in the same genomic region, were considered unresolved and were removed from the study. A Hidden Markov Model (jpHMM) [35] jumping profile was used to confirm the recombination patterns and mosaic structures of query sequences, according to the HXB2 reference HIV-1 sequence.

## **Analysis of genetic diversity and positive selective pressure in HIV-1 *pol* from subtypes B and F**

Genetic diversity analysis was used to compare the distance between sequences collected at different times. We determined the genetic distances between the sequences belonging to subtypes B and F collected from 2002–2003 and 2007–2009 using MEGA 5, using the Maximum Likelihood Composite model and the bootstrap method to estimate variance with 1000 replicates, adopting a rate of change between the sites ( $\Gamma$ ) according to the evolutionary model chosen for each alignment. The intra-subtype genetic diversity among the samples collected in each time period was inferred by estimating the nucleotide diversity ( $\pi$ ), implemented in MEGA 5. For this analysis, the sequences were grouped into different alignments, according to the viral subtype and the collection period, and the intra-subtype diversity was calculated using the command "Within subpopulations compute diversity" under the Composite Maximum Likelihood model.

Changes in the positive selective pressure at codons of the HIV-1 subtypes B and F corresponding to the time, status of infection, CD4 cell counts, and exposure category were detected. MEGA 5 was used to estimate the codon selection for each codon of the various alignments by using the Maximum Likelihood method and adopting the evolutionary model chosen for each alignment.

## Statistical analysis

The chi-square test was used to compare proportions of subtypes B and F in each period (period 1: 2002–2003 and period 2: 2007–2009). Statistical significance was set at 5% ( $p < 0.05$ ). Age is shown as mean  $\pm$  standard deviation (SD). CD4+ cell counts and viral loads are shown as medians and interquartile intervals. Data were analysed using the Stata V.13 software (Stata Corp., USA).

## Results

### Characteristics of the study population

The average age of the patients was 34 years and the majority were male (58.3%). Of the women, 13% were pregnant during the study period. The main exposure category were heterosexual (30.4% were male heterosexual patients and 41.7% female heterosexual patients) and MSM (30%), with a low prevalence among injection or non-injection drug users (IDU/NIDU) (1.8%) (Table 1). Additionally, 6.5% of individuals reported sexual relationships with HIV-positive partners. The median CD4+ cell count and viral load were 210 cells/mm<sup>3</sup> and 14,731 copies/ml, respectively.

### Molecular genotyping

A maximum likelihood tree constructed with our samples and references sequences is shown in Fig. 1. In the HIV-1 *pol* region in Pernambuco, subtype B is predominant ( $n = 103$ , 60.9%). However, the study revealed a high frequency of subtype F ( $n = 53$ , 31.4%) and the presence of HIV-1 C ( $n = 03$ , 1.8%); subtype H and recombinant AG were rare. In addition to the seven recombinants identified in Fig. 1 (black circles), further analysis with REGA, RIP, and SIMPLOT showed that the 03PE087 strain was a recombinant BF; thus, 8 recombinant were identified (4.8%).

HIV-1 F query sequences formed a single monophyletic group with good bootstrap support, indicating a possible local transmission network; the cluster of HIV-1 B sequences did not have good bootstrap support, showing a more dispersed pattern. Of the samples of subtype F from Pernambuco, 49% (26/53) were from heterosexual males, 32% (17/53) were from heterosexual females and 19% (10/53) were from MSM, although the epidemiological analysis indicated no statistical association between exposure category and subtype F in Pernambuco ( $p = 0.061$ ). Using only the frequencies of subtypes B and F, which comprised more than 90% of the circulating HIV-1 strains in the region, a statistically significant increase in the frequency of subtype F was observed between 2002/2003 and 2007/2009 ( $p = 0.01$ ) (Table 2).

We found a low prevalence of subtype C among our samples (3/169, 1.8%). The strain 09PE181, isolated in 2009, showed a BC recombinant structure (Supplementary material 1). Epidemiological data revealed that 09PE181 was a recent infection (according to the BED-CEIA), isolated from a MSM with a HIV-positive sexual partner.

The presence of a recombinant AG (08PE056) was detected. Various recombination analyses (SIMPLLOT, RIP, BLAST Genotyping) showed no consensus in determining the structure of the recombinant (data not shown). The sample was from a pregnant woman with a long-term infection; no information on the infection was available. Finally, one sample (07PE009) from a heterosexual man living in a rural area of Pernambuco was identified as subtype H.

Because a great diversity of BF CRFs exists in Brazil, we studied the BF isolates identified in the present study in more detail, to determine the mosaic structure of the *pol* region. Several recombination patterns, classified as BF URFs, were identified among BF viruses (Fig. 2). Interestingly, some BF URFs (08PE055, 08PE099, 08PE134, and 09PE188) had structures similar to those of CRFS 28 and 29 BF.

## Increased intra-subtype diversity of HIV-1 *pol* in subtypes B and F

Mean genetic distances for the B subtype for the years 2002–2003 and 2007–2009 were 0.056 (SD =  $\pm$  0.004) and 0.072 (SD =  $\pm$  0.004), respectively. The mean genetic distances for the F subtype were 0.045 (SD =  $\pm$  0.004) and 0.064 (SD =  $\pm$  0.004) for the same time interval. In both subtypes, diversity increased between the two periods ( $P < 0.0000001$ ). The intra-subtype genetic diversity was estimated to be 0.065 (SD =  $\pm$ 0.004) for HIV-1 B and 0.055 (SD =  $\pm$ 0.004) for HIV-1 F, reflecting a greater accumulation of mutations in subtype B ( $p < 0.0000001$ ).

## Positive selective pressure on HIV-1 B and F *pol*

The codons identified to be under positive selection in subtypes B and F were determined according to time, infection status, T cell count, and category of exposure (Table 3), and their positions are numbered according to the HXB2 reference sequence (GenBank accession number: K03455).

In subtype B, codon 37 (protease) showed the highest frequency of being under positive selection; for HIV-1 F, the codons most frequently under positive selection were 12 (protease) and 173 (reverse transcriptase). Codons under positive selection pressure were more common in samples collected from 2007–2009, individuals with a T cell count  $\geq$  200, patients with a long-term infection and women.

## Discussion

To evaluate the molecular characteristics of HIV-1 in Pernambuco, a state in north-eastern Brazil, 169 sequences corresponding to protease and approximately two-thirds of the initial RT gene were analysed. Using bioinformatics tools for subtyping and phylogenetic analysis, the present study revealed high viral genetic

diversity; subtypes B (60.9%), F (31.4%), C (1.2%) and BF recombinants (4.7%) were detected, along with one rare subtype, H, and AG and BC recombinants.

The high frequency of subtype B (60.9%) is consistent with the fact that it was the first subtype to be isolated in Western industrialised nations and to spread worldwide due to population displacement; it is the most widespread HIV-1 variant globally [36, 37]. However, Pernambuco showed a lower frequency of subtype B (60.9%) than did other states in north-eastern Brazil, such as Bahia and Ceará, where the frequency ranges from 77% to 89% and from 81% to 85%, respectively [12, 26, 38, 39, 40, 41].

Recently, Alencar et al. [42] showed a high proportion of subtype F in Pernambuco (24%) by analysing the *pol* region, consistent with our data. However, Pêsoa et al. [7] evaluated the complete genome of the F-subtype sequences derived from that study and showed that among the 24 samples previously determined to be HIV-1 F by using the *pol* region, 23 were BF recombinants, of which 4 were CRF70\_BF1 and 11 were CRF71\_BF1, novel recombinant types. Thus, this finding reinforces the phylogenetic inference evidenced by the grouping of one 70\_BF1 and three 71\_BF1 sequences with our F-type query sequences F (data not shown).

Eight BF recombinants were characterised as URFs because they showed different mosaic structures. There is heterogeneity in the distribution of BF recombinants in Brazil. Although some studies point to a spread of HIV-1 BF in South America [27, 43, 44] THOMSON et al., 2004, the frequency of these recombinants in the country varies greatly with geographical area and even in proximate locations, indicating that factors other than proximity influence their dispersion [45]. In north-eastern Brazil, a high proportion of these recombinants was reported in Bahia, with rates of approximately 20% [12, 26, 46], and rates below 2.7% were reported in Ceará [39, 41]. The BF URFs detected in samples collected in 2002/2003 indicate that these strains have been circulating in the state of Pernambuco for some time; the movement of these recombinants was reported in north-eastern Brazil in samples collected in the early to mid-90s [38]. However, the small genomic region amplified (partial *pol* segment) makes determination of recombinant events difficult.

A low prevalence of HIV-1 subtype C ( $n = 03$ , 1.8%) was found, concordant with other reports [24, 41]. One CB recombinant was detected for the first time in the state of Pernambuco; to the best of our knowledge, this is the second report in north-eastern Brazil, and the first was reported in Salvador, Bahia [40]. The low prevalence of this subtype in the north-eastern region contrasts with its high frequency in southern Brazil; prevalence rates up to 63.9% have been reported in Santa Catarina [47, 48]. Despite the lower frequency in other Brazilian regions, several authors have shown the expansion of this subtype in other regions in recent years [41, 49, 50, 51].

To the best of our knowledge, this is the first time that the AG recombinant has been detected in north-eastern Brazil. The strain was isolated from a pregnant woman with a long-term infection in 2008. AG recombinants have been reported in other Brazilian regions: CRF02\_AG has been reported in Belém (northern region) [11] and several studies have noted its presence in Rio de Janeiro (south-eastern region); these studies include reports of horizontal transmission [15, 52, 53], showing multiple routes of transmissions and the gradual spread of this variant. Phylogenetic analyses indicated the presence of subtype H, which is rare in South America. Subtype H has been reported predominantly in Central Africa (Democratic Republic of Congo, Cameroon and Gabon), with other isolates from Angola, France, Sweden, Belgium, Bulgaria, Norway and Russia [54, 55, 56].

The intra-subtype genetic diversity of HIV-1 B and F increased significantly between the two periods studied, concordant with the results of Bello et al. [57] for the same subtypes. Subtype B showed higher inter-subtype genetic diversity in the same period ( $p < 0.0000001$ ). Among codons found to be under positive selective pressure, only position TR 210 is connected to antiretroviral resistance. Leal et al. [58] detected a variety of codons under selective pressure in a sample of therapy-naïve individuals, but none was associated with drug resistance, although the samples showed drug-resistance mutations. Furthermore, codons under positive selection pressure were more frequent in samples collected in 2007–2009, in individuals with T cell counts  $> 200/\text{mm}^3$ , with long-term infections, and heterosexual women.

For the two periods analysed (2002–2003 and 2007–2009), the viral diversity increased. There was a significant increase in the frequency of HIV-1 F in the second

period. These findings support the hypothesis that the viral variability of HIV-1 is increasing in Brazil and in the world, with the spread of non-B subtypes, CRFs, and URFs [59-63]. The cross-sectional design and the convenience sampling used present some limitations for determining the characteristics of the epidemic in detail. Moreover, phylogenetic analyses were conducted using a small genomic *pol* fragment, and confirmation of certain rare genotypes requires sequencing a larger region or the complete genome. However, some authors report advantages of using the *pol* region to evaluate inter-subtype recombination, because it functions as an important recombination hotspot [19, 64]. Several hypotheses have been presented concerning the expansion of HIV-1 non-B subtypes in Pernambuco, such as the great economic growth in the last decade (2001–2010), which may have influenced population emigration, mainly due to the activity of the largest port in north-eastern Brazil (Port of Suape) and the construction of refineries and petrochemical plants (<http://www.worldbank.org/pt/news/press-release/2013/06/25/wb-brazil-pernambucos-new-inclusive-growth-program-will-benefit-nine-million-residents>). In addition, the metropolitan region of Recife (the state capital) is one of the main industrial centres and the largest services centre of north-eastern Brazil, particularly for technology, medicine, universities, and research. In addition, the state is a hub for tourism and culture (<http://www2.recife.pe.gov.br/o-recife/metropole-das-opportunidades/>). Another factor that may also contribute to the increased incidence of HIV-1 non-B subtypes observed in the second period is the decreasing percentage of MSM in this period, which is concordant with data indicating the heterosexualization of the HIV epidemic in Brazil [22]. The particular characteristics of the epidemic in this region may have repercussions for antiretroviral treatment, progression to disease, vaccine development and quality of laboratory monitoring. It is, therefore, critical to continue research into the expansion, virological characterization, and virus-host interactions of these non-B subtypes.

## References

1. Santos AF, et al. Characterization of a new circulating recombinant form comprising HIV-1 subtypes C and B in southern Brazil. *AIDS*. 2006;20: 2011-2019.

2. Souza ACMF, et al. Molecular characterization of HIV type 1 BF pol recombinants from São Paulo, Brazil. *AIDS Res Hum Retrov.* 2008;24: 1521-1525.
3. Dias CF, et al. High prevalence and association of HIV-1 non-B subtype with specific sexual transmission risk antiretroviral naïve patients in Porto Alegre, RS, Brazil. *Rev I Med Trop.* 2009;51: 191-196.
4. Sa Filho DJ, et al. Identification of two HIV type 1 circulating recombinant form in Brazil. *AIDS Res Hum Retrov.* 2006;22: 1-13.
5. Guimaraes ML, et al. Identification of two new CRF\_BF in Rio de Janeiro State, Brazil. *AIDS.* 2008;22: 433-438.
6. Sanabani SS, et al. Characterization and frequency of a newly identified HIV-1 BF1 intersubtype circulating recombinant form in São Paulo, Brazil. *Virology.* 2010;7. doi: 10.1186/1743-422X-7-74.
7. Pessoa R, et al. Deep sequencing of HIV-1 near full-length proviral genomes identifies high rates of BF1 recombinants including two novel circulating recombinant forms (CRF) 70\_BF1 and a disseminating 71\_BF1 among blood donors in Pernambuco, Brazil. *PLoS ONE.* 2014;9: e112674. doi:10.1371/journal.pone.0112674.
8. Pessoa R, et al. Identification of a novel HIV-1 circulating recombinant form (CRF72\_BF1) in deep sequencing data from blood donors in southeastern Brazil. *Genome Announc.* 2014;2: e00386-14. doi: 10.1128/genomeA.00386-14.
9. Castro CAV, et al. Prevalence, estimated HIV-1 incidence and viral diversity among people seeking voluntary counseling and testing services in Rio de Janeiro, Brazil. *BMC Infect Dis.* 2010;10: 224. doi:10.1186/1471-2334-10-224.
10. Couto-Fernandez JC, et al. Phylogenetic analysis of Brazilian HIV type 1 subtype D strains: Tracing the origin of this subtype in Brazil. *AIDS Res Hum Retrov.* 2006;22: 207-211.
11. Machado LFA, et al. Molecular epidemiology of HIV type 1 in northern Brazil: Identification of subtypes C and D and the introduction of CRF02\_AG in the Amazon Region of Brazil. *AIDS Res Hum Retrov.* 2009;25: 961-966.
12. Monteiro JP, et al. Genetic variability of human immunodeficiency virus-1 in Bahia State, Northeast, Brazil: High diversity of HIV genotypes. *J Med Virol.* 2009;81: 391-399.
13. Ferreira AS, Cardoso LPV, Stefani MMA. Moderate prevalence of transmitted drug resistance and high HIV-1 genetic diversity in patients from Mato Grosso State, Central Western Brazil. *J Med Virol.* 2011;83: 1301-1307.
14. Guimaraes ML, et al. High frequency of recombinant genomes in HIV type 1 samples from Brazilian southeastern and southern Regions. *AIDS Res Hum Retrov.* 2002;18: 1261-1269.
15. Eyer-Silva WA and Morgado MG. Autochthonous horizontal transmission of a CRF02\_AG strain revealed by a Human Immunodeficiency virus type 1 diversity

survey in a small city in inner state of Rio de Janeiro, Southeast Brazil. Mem I Oswaldo Cruz. 2007;102: 809-8

16. Sabino EC, et al. Identification of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Envelope Genes Recombinant between Subtypes B and F in Two Epidemiologically Linked Individuals from Brazil. J Virol. 1994; 68: 6340-6346.

17. Vicente AC, et al. The HIV epidemic in the Amazon Basin is driven by prototypic and recombinant HIV-1 subtypes B and F. J Acquir Immune Defic Syndr. 2000;23: 327-331.

18. VÉRAS NMC, et al. HIV type 1 genetic variability in Central Brazil. AIDS Res Hum Retrov. 2007 V. 23(12): 1481-1489.

19. Guimaraes ML, et al. Analysis of HIV-1 BF *pr/rt* recombinant strains from Rio de Janeiro/Brazil reveals multiple unrelated mosaic structures. Infec Genet Evol. 2010;10: 1094-1100.

20. Cavalcanti AMS, et al. Primary resistance of HIV to antiretrovirals among recently diagnosed at voluntary counselling and testing centres in the metropolitan region of Recife, Pernambuco. Mem I Oswaldo Cruz. 2012;107: 450-457.

21. Pessoa R, et al. Enhanced detection of viral diversity using partial and near full-length genomes of human immunodeficiency virus Type 1 provirus deep sequencing data from recently infected donors at four blood centers in Brazil. Transfusion. 2014; doi: 10.1111/trf.12936.

22. Brasil. Ministério da Saúde. Boletim epidemiológico AIDS-DST – Ano I, n.01, 2012. Available at :<http://www.aids.gov.br/publicacao/2012/boletim-epidemiologico-aids-e-dst-2012>. Accessed Nov 22 2013, 64 pages.

23. Medeiros LB, et al. Primary resistance of human immunodeficiency virus type 1 in a reference Center in Recife, Pernambuco, Brazil. Mem I Oswaldo Cruz. 2006;101: 845-849.

24. Cavalcanti AMS, et al. Antiretroviral resistance in individuals presenting therapeutic failure and subtypes of the human immunodeficiency virus type 1 in the Northeast Region of Brazil. Mem I Oswaldo Cruz. 2007;102: 785-792.

25. Ferreira V, et al. The influence of HIV-1 subtype in the response to therapeutic dendritic cell vaccine. Open AIDS J. 2012;6: 289-292.

26. Santos LA, et al. Detection of distinct human immunodeficiency virus type 1 circulating recombinant forms in Northeast Brazil. J Med Virol. 2011;83: 2066-2072.

27. Carr JK, et al. Diverse Recombinants have spread widely since the introduction of HIV-1 into South America. AIDS. 2001;15: F41-F47.

28. Ramos A, et al. Dual and Recombinant Infections: An integral part of the HIV-1 epidemic in Brazil. Emerg Infect Dis. 1999;5: 65-74.

29. Bello G, et al. Phylodynamics of HIV-1 Circulating Recombinant Forms 12\_BF and 38\_BF in Argentina and Uruguay. Retrovirology. 2010;7: 22.

30. Aulicino PC, et al. Extremely rapid spread of human immunodeficiency virus type 1 BF recombinants in Argentina. *J Virol.* 2006;81: 427-429.
31. Thompson JD, et al. The CLUSTAL X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 1997;25: 4876-4882.
32. Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. Oxford University Press: *Nucleic Acids Symposium Series.* 1998;41: 95-98.
33. Tamura K, et al. MEGA 5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol Biol Evol.* 2011;28: 2731-2739.
34. Lole KS, et al. Full-length Human Immunodeficiency Virus Type 1 Genomes from subtype C-infected seroconverters in India, with evidence of intersubtype recombination. *J Virol.* 1999;73: 152-160.
35. Zhang M, et al. jpHMM at GOBICS: a web server to detect genomic recombinations in HIV-1. *Nucleic Acids Res.* 2006;34: 463-465.
36. Gilbert MTP, et al. The emergence of HIV/AIDS in the Americas and beyond. *PNAS.* <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0705329104>
37. Junqueira DM, et al. Reviewing the History of HIV-1: Spread of subtype B in the Americas. *PLoS ONE.* 2011;6: e27489. doi:10.1371/journal.pone.0027489.
38. Couto-Fernandez JC, et al. HIV-1 Subtyping in Salvador, Bahia, Brazil: A city with African sociodemographic characteristics. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 1999;22: 288-293.
39. Gadelha SR, et al. Molecular epidemiology of human immunodeficiency virus-1 in the State of Ceará, Northeast, Brazil. *Mem I Oswaldo Cruz.* 2003;98: 461-464.
40. Pedrosa C, et al. High prevalence of primary antiretroviral resistance among HIV-1-infected adults and children in Bahia, a Northeast State of Brazil. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2007;45: 251-252.
41. Arruda É, et al. Intermediate Prevalence of HIV Type 1 Primary antiretroviral resistance in Ceará State, Northeast Brazil. *AIDS Res Hum Retrov.* 2011;27: 153-156.
42. Alencar CS, et al. HIV genotypes and primary drug resistance among HIV seropositive blood donors in Brazil: role of infected blood donors as sentinel populations for molecular surveillance of HIV. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2013; 63: 387-392.
43. Thomson MM, et al. Analysis of Near-Length Genome Sequences of HIV Type 1 BF Intersubtype Recombinant Viruses from Brazil Reveals Their Independent Origins and Their Lack of Relationship to CRF12\_BF. *AIDS Res Hum Retrov.* 2004; 20: 1126-1133.

44. Aulicino PC, et al. Description of the first full-length HIV type 1 subtype F1 strain in Argentina: Implications for the origin and dispersion of this subtype in South America. *AIDS Res Hum Retrov.* 2007;23: 1176-1182.
45. Aulicino PC, et al. Longitudinal analysis of HIV-1 BF1 recombinant strains in vertically infected children from Argentina reveals a decrease in CRF12\_BF *pol* gene mosaic patterns and high diversity of BF unique recombinant forms. *Infect Genet Evol.* 2011;11: 349-357.
46. Brennan CA, et al. HIV-1 Strains identified in Brazilian blood donors: significant prevalence of B/F1 recombinants. *AIDS Res Hum Retrov.* 2007;23: 1434-1441.
47. Brigido LFM, et al. HIV type 1 subtype C and CB Pol recombinants prevail at the cities with the highest AIDS prevalence rate in Brazil. *AIDS Res Hum Retrov.* 2007;23: 1579-1585.
48. Graf T and Pinto AR. The increasing prevalence of HIV-1 subtype C in Southern Brazil and its dispersion through the continent. *Virology.* 2013;435: 170-178.
49. Brigido LFM. Southern Brazil HIV Type 1 C Expansion into the State of São Paulo, Brazil. *AIDS Res Hum Retrov.* 2011;27: 339-344.
50. Alcalde R, et al. Clinical, epidemiological and molecular features of the HIV-1 subtype C and recombinant forms that are circulating in the city of São Paulo, Brazil. *Virol J.* 2012;9: 156.
51. Carvalho BC, et al. Moderate prevalence of transmitted drug resistance and interiorization of HIV type 1 subtype C in the inland North State of Tocantins, Brazil. *AIDS Res Hum Retrov.* 2011;10: 1081-1087.
52. Delatorre EO, et al. Evidence of multiple introductions and autochthonous transmission of the HIV type 1 CRF02\_AG clade in Brazil. *AIDS Res Hum Retrov.* 2012;28: 1369-1372.
53. Velasco-de-Castro CA, et al. HIV-1 diversity and drug resistance mutations among people seeking HIV diagnosis in voluntary counselling and testing sites in Rio de Janeiro, Brazil. *PLoS ONE.* 2014;9:e87622. doi:10.1371/journal.pone.0087622.
54. Janssens W, et al. HIV-1 subtype H near-full length genome reference strain and analysis of subtype-H-containing inter-subtype recombinants. *AIDS.* 2000;14: 1533-1543.
55. Castelbranco EP, et al. Frequency of primary resistance to antiretroviral drugs and genetic variability of HIV-1 among infected pregnant women recently diagnosed in Luanda-Angola. *AIDS Res Hum Retrov.* 2010;26: 1313-1316.
56. Ivanov IA, et al. Detail molecular epidemiologic characterization of HIV-1 infection in Bulgaria reveals broad diversity and evolving phylodynamics. *PLoS ONE.* 2013;8: e59666. doi: 10.1371/journal.pone.0059666.
57. Bello G, et al. Increasing genetic distance to HIV-1 subtype B and F1 consensus sequences in the Brazilian epidemic: a challenge for vaccine strategies based on central immunogens? *Infect Genet Evol.* 2007;7: 594-599.

58. Leal ÉS, Holmes EC, Zanotto PMA. Distinct patterns of natural selection in the reverse transcriptase gene of HIV-1 in the presence and absence of antiretroviral therapy. *Virology*. 2004;325: 181-191.
59. Soares EAJM, et al. HIV-1 subtype C dissemination in Southern Brazil. *AIDS*. 2005;19: S81-S86.
60. Neogi U, et al. Global HIV-1 molecular epidemiology with especial reference to genetic analysis of HIV-1 subtypes circulating in North India: Functional and pathogenic implications of genetic variation. *Indian J Exp Biol*. 2009;47:424-431.
61. Li L, et al. Recombination form and epidemiology of HIV-1 unique recombinant strain identified in Yunnan, China. *PLoS ONE*. 2012;7: e46777. doi: 10.1371/journal.pone.0046777.
62. Abecasis AB, et al. HIV-1 subtype distribution and its demographic determinants in newly diagnosed patients in Europe suggest highly compartmentalized epidemics. *Retrovirology*. 2013;10: 7.
63. Hawke KG, et al. HIV Non-B subtype distribution: Emerging trends and risk factors for imported and local infections newly diagnosed in South Australia. *AIDS Res Hum Retrov*. 2013;29: 311-317.
64. Hue S, et al. HIV-1 pol gene variation is sufficient for reconstruction of transmission in the era of antiretroviral therapy. *AIDS*. 2004;18: 719-728.

Table 1 - Epidemiological, behavioral and molecular characteristics of HIV-positive individuals, Northeast - Brazil.

<b>Characteristics</b>	<b>N<sup>a</sup> = 169</b> <b>N<sup>b</sup> (%)</b>
<b>Age (years)<sup>c</sup></b>	34 ± 11
<b>Gender</b>	
Female	70/168 (41.7)
Male	98/168 (58.3)
<b>Pregnancy</b>	
Yes	09/69 (13)
No	60/69 (87)
<b>Exposure category<sup>d</sup></b>	
MSM <sup>e</sup>	47/168 (30)
Heterosexual male	51/168 (30.4)
Heterosexual female	70/168 (41.7)
HIV-positive partner	11/168 (6.5)
Sex workers	01/168 (0.6)
IDU/NIDU <sup>f</sup>	03/168 (1.8)
Blood transfusion	04/168 (2.4)

<sup>a</sup>Total of samples analyzed; <sup>b</sup>Total samples containing information for each variable; <sup>c</sup>Mean ± standard deviation; <sup>d</sup>Variable is not mutually exclusive; <sup>e</sup>MSM: Men who have sex with men; <sup>f</sup>IDU / NIDU: Injecting drug users / non-injecting drugs users.

Table 2 - Frequencies of HIV-1 B and F at 2002-2003 and 2007-2009 in Pernambuco, Northeast – Brazil.

	HIV-1 subtype		
	B <sup>1</sup>	F <sup>1</sup>	
	N (%)	N (%)	
2002-2003	48 (77.4)	14 (22.6)	p=0.01 <sup>2</sup>
2007-2009	55 (58.5)	39 (41.5)	

<sup>1</sup>We taking into consideration only the prevalent cases of HIV-1 B and F, not including other non-B subtypes in the analysis; <sup>2</sup> Chi-square test.

Table 3 - Codons under selective pressure in the HIV-1 B and F *pol* gene.

<b>Variables</b>	<b>Subtypes</b>	<b>Codons<sup>a</sup></b>
<b>T Cell Counts<sup>d</sup></b>		
< 200	B (n=32)	PR: - RT: -
	F (n=11)	PR: - RT: 173
≥ 200	B (n=49)	PR: 37, 77, 93 RT: 161, 199, <u>210<sup>e</sup></u>
	F (n=29)	PR: 12, 19, 62 RT: 172, 199
<b>Exposure category</b>		
MSM <sup>f</sup>	B (n=33)	PR: - RT: 199, 244
	F (n=10)	PR: - RT: -
HTS <sup>g</sup> Female	B (n=36)	PR: 37 RT: 209, 243
	F (n=25)	PR: 12, 63 RT: 173, 200
HTS Male	B (n=31)	PR: 37 RT: -
	F (n=17)	PR: - RT: -

<sup>a</sup>Sequences with 918bp (308 codons) <sup>b</sup>PR: Protease; <sup>c</sup>RT: Reverse Transcriptase; <sup>d</sup>T Cells count / mm<sup>3</sup>; <sup>e</sup>Drug resistance codons; <sup>f</sup>MSM: Men who have sex with men; <sup>g</sup>HTS: Heterosexuals.

**Figure 1 - Phylogenetic inference of HIV-1 in Pernambuco, Northeast - Brazil.** The final alignment contained 891bp comprising 169 query sequences and references sequences which resistance mutations were excluded. The tree structure was determined by maximum likelihood analysis implemented in the MEGA 5 with 1000 bootstrap replicates. Tree nodes with a bootstrap  $\geq 70$  are demonstrated. For illustration our query sequences: red circles= HIV-1 B, green circles= HIV-1 F; black circles= Recombinants BF; blue circles= HIV-1 C; purple circle= HIV-1 H; yellow circle= Recombinant AG.

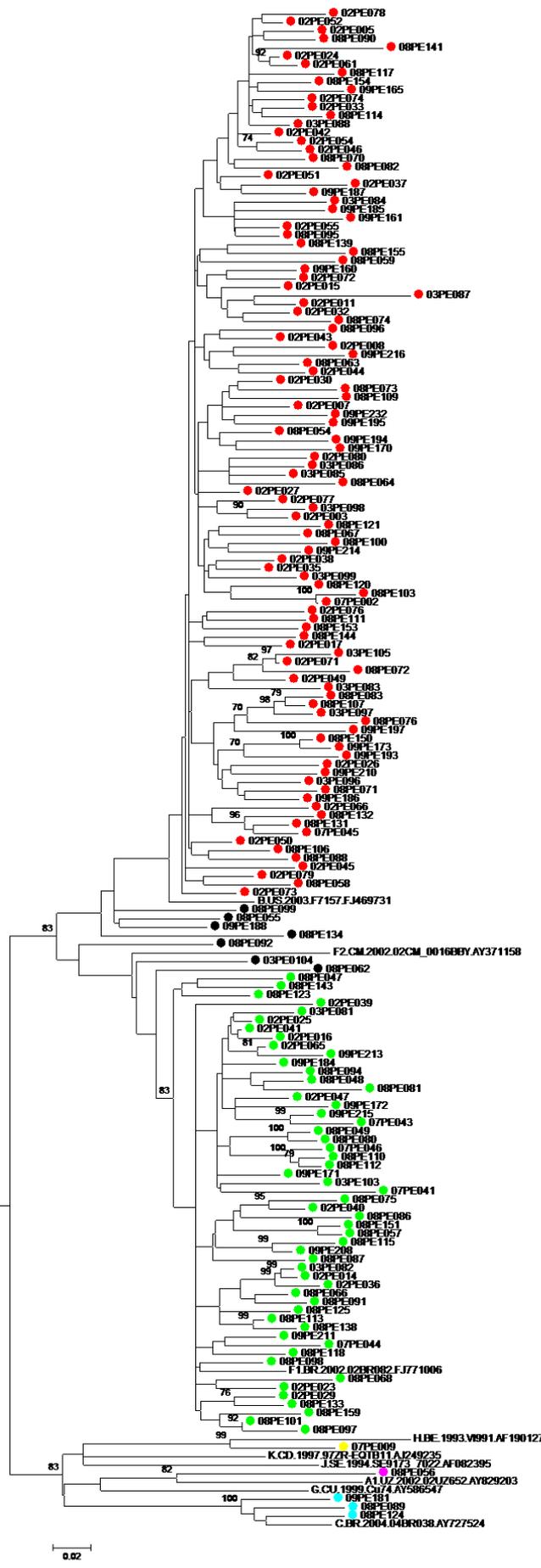
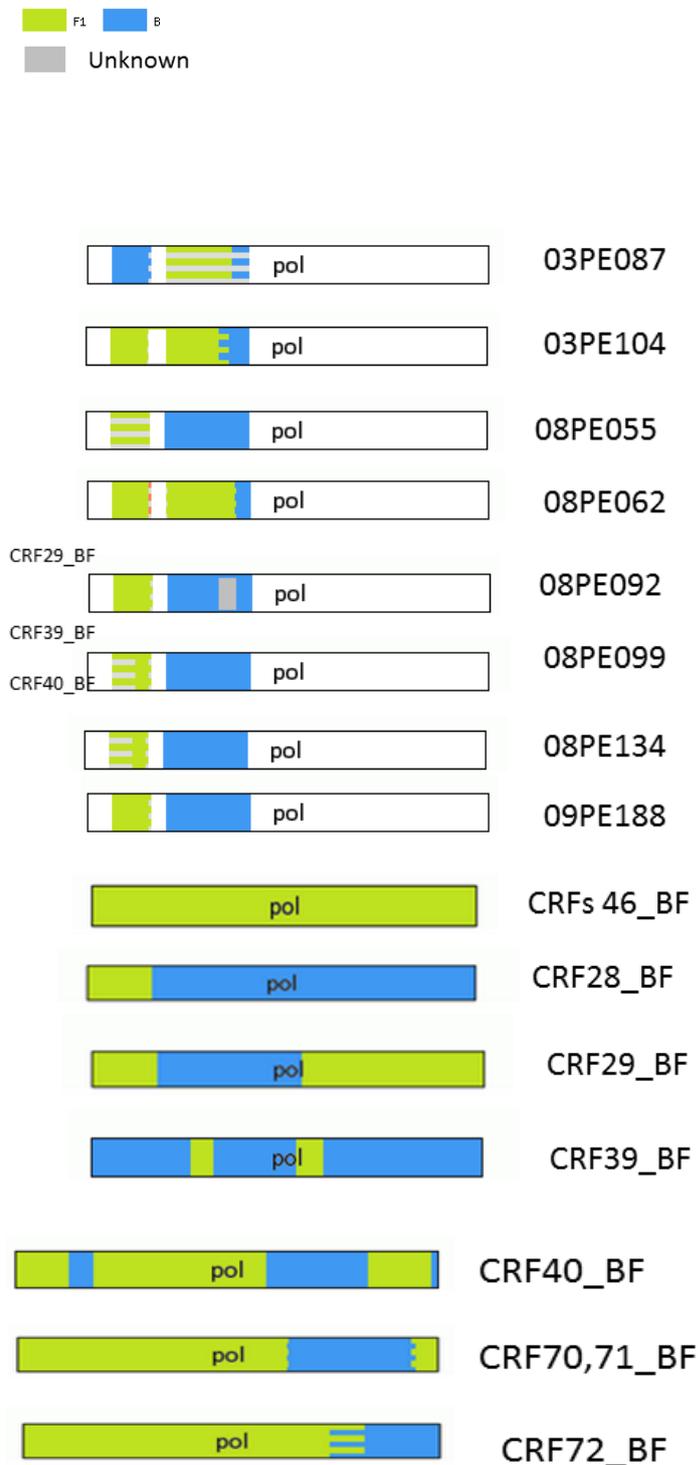
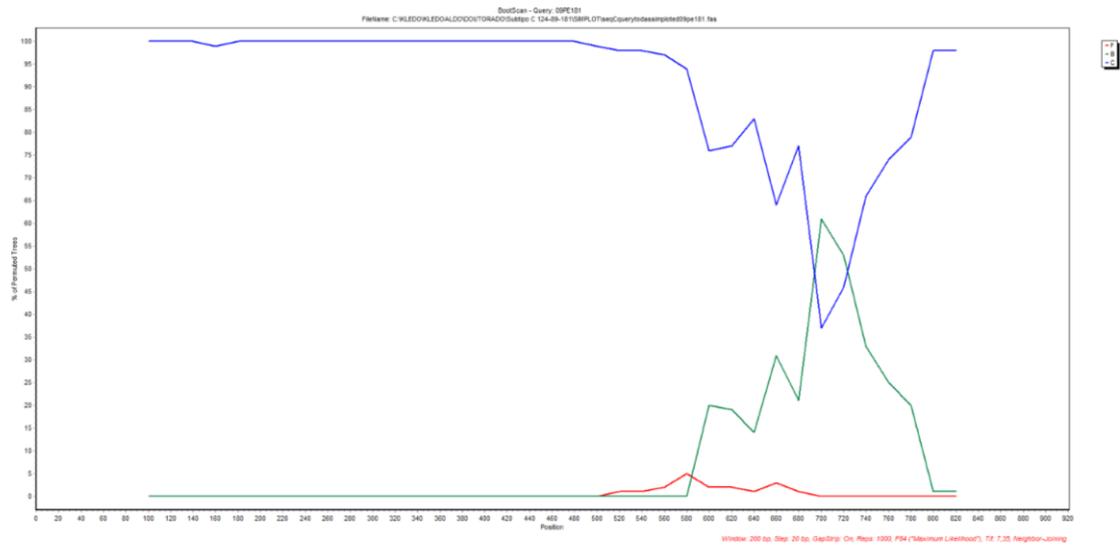


Figure 2 – **Mosaic structures of query sequences recombinants BF and all CRFs BF identified in Brazil for comparisons criteria.** Fragments of 918 bp (base pairs) were obtained encompassing the protease and part of reverse transcriptase, corresponding to positions 2262 – 2549 from protease and 2661 – 3290 from reverse transcriptase relative to a reference strain HXB2 (accession number in Genbank: K03455). Mosaic structures were defined by jpHMM methodology.



## Supplementary material 1

Figure - **Bootscanning analysis of HIV-1 *pol* sequence BC recombinant (09PE181) determined at SIMPLOT software.** Fragment corresponding to positions 2262 – 2549 from protease and 2661 – 3290 from reverse transcriptase relative to a reference strain HXB2 (accession number in Genbank: K03455). HIV-1 C: blue lines; HIV-1 B : green lines.



## APÊNCIDE D - ARTIGO 2: Submissão à revista Journal of Clinical Virology

Elsevier Editorial System(tm) for Journal of Clinical Virology  
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: EPIDEMIOLOGICAL, CLINICAL, AND ANTIRETROVIRAL SUSCEPTIBILITY CHARACTERISATION OF HIV-1 SUBTYPES B AND NON-B IN PERNAMBUCO, NORTHEAST BRAZIL

Article Type: Full Length Article (2500 words)

Keywords: HIV-1  
Subtypes non-B  
Subtype F  
Brazil  
epidemiology  
antiretroviral resistance

Corresponding Author: Dr. kledoaldo Oliveira Lima,

Corresponding Author's Institution:

First Author: kledoaldo Oliveira Lima

Order of Authors: kledoaldo Oliveira Lima; Élcio S Leal, Dr; Ana Maria S Cavalcanti, Dr; Daniela M Salustiano, Msc; Luzidalva B Medeiros, Dr; Sirleide P Silva, Sr; Heloísa R Lacerda, Dr

**Epidemiological, Clinical, and Antiretroviral Susceptibility Characterisation of B and Non-B Human Immunodeficiency Virus Subtypes in Pernambuco, Northeast Brazil**

**Kledoaldo Lima<sup>a</sup>, Élcio de Souza Leal<sup>b</sup>, Ana Maria Salustiano Cavalcanti<sup>c</sup>, Daniela Medeiros Salustiano<sup>c</sup>, Luzidalva Barbosa de Medeiros<sup>d</sup>, Sirleide Pereira da Silva<sup>c</sup>, and Heloísa Ramos Lacerda<sup>a</sup>**

<sup>a</sup> Postgraduate at Department of Tropical Medicine, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

<sup>b</sup> Institute of Biotechnology, Federal University of Pará, Belém, Pernambuco, Brazil

<sup>c</sup> Sector of Virology, Central Public Health Laboratory of Pernambuco, Recife, Pernambuco Brazil

<sup>d</sup> Department of Clinical Medicine, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco Brazil

**Author email addresses:** [kledoaldo@gmail.com](mailto:kledoaldo@gmail.com)

**Corresponding author.** Kledoaldo Oliveira de Lima

**Abbreviations**

BED-CEIA, BED capture enzyme immunoassay

CI, confidence interval

HBV, hepatitis B virus

HCV, hepatitis C virus

HTLV, human T lymphotropic virus

M, major group

MSM, men who have sex with men

N, non-major and non-outlier groups

O, outlier group

P, pending the identification of further human cases group

PR, protease

RT, reverse transcriptase

VCT, voluntary counselling and testing centre

## ABSTRACT

HIV-1 diversity causes important differences in the biological properties of the viral variants and their interactions with a host, such as cell tropism, responses to antiretroviral therapy, acquisition of drug-resistance, and disease progression. Moreover, there are only a few published studies that have linked phylogenetic and epidemiological data for the F subtype of HIV-1. The aims of this study were to evaluate the interrelationship of phylogenetic data with epidemiological and laboratory data for HIV-1 isolates circulating in Pernambuco, in the Northeast Region of Brazil. A total of 169 HIV-1 *pol* sequences were evaluated, of which 64 were obtained from 2002-2003, and 105 were obtained from 2007-2009. Socio-demographic, clinical, and behavioural data were obtained from medical records. Laboratory testing enabled the determination of recent HIV-1 infections and possible co-infections with HBV, HCV, HTLV, or syphilis. Surveillance drug-resistance mutation analysis and antiretroviral susceptibility profiling were performed using data from the HIV Drug-Resistance Database of Stanford University and the WHO, respectively. The results showed that HIV-1 subtype B was statistically associated with male gender, higher education, higher viral loads, and lower T cell counts, while HIV-1 subtype F was associated with lower viral loads and higher T cell counts in recent HIV-1 infections. The frequencies of HIV co-infection with HBV, HCV, and syphilis were 27.8% (95% CI: 19.8–37.7), 1.04% (95% CI: 0.05–5.00) and 14.7% (95% CI: 8.6–23.0), respectively. The presence of drug-resistant mutations was 2.96%. HIV-HBV co-infection was statistically associated with men who have sex with men (MSM), higher education, higher viral loads, and subtype B in males. HIV-syphilis co-infection was associated with MSM status, lower T cell counts, and non-B

subtypes in males. These data showed the importance of detailed characterisations of the HIV-1 epidemic to improve the understanding of the pathogenesis of the disease, the associations with other infectious agents or population strata, and increased efforts to improve therapeutic approaches, diagnostics, and infection prevention measures.

**Keywords**

HIV-1; Subtype non-B; Brazil; Drug resistance; Co-infection,

## INTRODUCTION

HIV-1 is classified into 4 major groups: the major group (M), the non-major and non-outlier groups (N), the outlier group (O), and group P [1], which shows high genetic variability [2]. Group M is the predominant group throughout the world, is responsible for the majority of global pandemic, and is represented by 9 subtypes (A–D, F–H, J, and K) and a small number of sub-subtypes (A1–A4, F1, and F2) [1, 3].

The genetic variability of HIV-1 is related to several factors: the lack of fidelity of the reverse transcriptase (RT) that causes a high mutation rate, a high replication rate *in vivo*, and the potential for genetic recombination in cells co-infected with different viral strains [4–6]. Another factor that influences genome variability is the process of diversity bottlenecking that occurs during transmission to a new host, in which the virus progeny produced early in infection are derived from the expansion of only a few viral particles that are successfully transmitted. Various factors interfere with viral transmission, such as selective pressure from the host's innate immunity, the number of viral particles representing a particular genetic variant, and the target cell density. In addition, the process of natural selection favours the replication of viruses with a higher fitness or tropism for some immune system cells, which occurs as a result of viral tropism for the CCR5 and CXCR4 co-receptors [7–8]. The increase in human population-migration rates also favours the continual expansion of viral diversity [9].

The high diversity of HIV-1 causes important differences in the biological properties of the viral variants and their interactions with hosts [10]. For example,

differences between variants occur in terms of evolutionary adaptation [11], mutation rates, cell tropism [10], responses to antiretroviral therapy [12], acquisition of drug-resistance [13–15], levels of baseline T cell counts before antiretroviral therapy [14], disease progression [16], response to vaccines [17], and transmission rates between individuals in different population-exposure categories [18–20].

A combination of phylogenetic analysis of HIV-1 with demographics, route of infection, and clinical and laboratory data provides a better understanding of a local epidemic and measures for developing control and prevention strategies [21]. Until recently, the use of the HIV *pol* region sequence was not favoured for phylogenetic analysis due to its unusually high level of genetic conservation; however, Hué et al. [4] reported several advantages of studying this gene fragment in HIV-1 transmission events. These advantages include the ability for routine sequencing in genotyping assays to identify resistance mutations, viral subtypes, and the level of intrinsic genetic variability required to reconstruct phylogenetic transmission events. Furthermore, recombination events have a tendency to be more frequent in the *gag/pol* regions [22].

Most studies linking phylogenetic and epidemiological data contain little information related to F subtype viruses, whose prevalence, when analysing *pol* gene sequences, is considered high (~22-37%) in Pernambuco, Northeast Brazil [23–25]. Thus, we evaluated the interrelationship of phylogenetic data with epidemiological and laboratory data pertaining to HIV-1 subtypes that are currently circulating in Pernambuco, Northeast Brazil.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Study population**

We examined 169 HIV-1 *pol* sequences obtained from 2 previous studies [24–25]. Sixty-four sequences were obtained from samples collected from patients treated at the Hospital of the Federal University of Pernambuco (Recife, Pernambuco, Northeast Brazil) beginning in 2002-2003 [24], and 105 sequences were obtained from individuals who reported to any of the 5 largest voluntary counselling and testing centres (VCTs) of Recife, Pernambuco, Northeast Brazil during 2007-2009 [25]. The patients enrolled in our previous studies were diagnosed with HIV-1 infection according to the recommendations of Brazil's Ministry of Health, and all were antiretroviral-drug naive. Most sociodemographic and laboratory information was obtained from the databases of the above-mentioned institutions. Additional data were collected from medical records. The T cell counts and HIV-1 viral load quantifications not included in these databases were obtained from the records of the Central Public Health Laboratory of Pernambuco and represented results that were obtained closest to the date of HIV-1 diagnosis. The sociodemographic, behavioural, and laboratory information included age; gender; pregnancy; education level; place of residence; exposure category; employment; marital status; and HIV-1-infection status as determined by BED capture enzyme immunoassays (BED-CEIAs); T cell counts, and viral load quantifications. In addition, serological assays were performed to detect co-infection with hepatitis B virus (HBV), hepatitis C virus (HCV), human T lymphotropic virus (HTLV), and syphilis in the samples collected during 2007-2009. Data from the BED-CEIA experiments were available only for samples obtained from 2007-2009. This study was approved by the

Ethics Committee on Health Sciences Center of the Federal University of Pernambuco (CCS-UFPE) under number 114,722.

### **Laboratory diagnosis of co-infections**

Laboratory diagnosis of HBV, HCV, HTLV, and syphilis was performed with 97/105 (92.4%) of the samples obtained between 2007-2009. Samples collected between 2002-2003 were not available for such testing. Blood samples were collected in EDTA tubes and after centrifugation, plasma aliquots were separated and stored at  $-70^{\circ}\text{C}$ . Diagnoses of present and/or past HBV infection was performed by serological assays detecting HBsAg and total anti-HBc (Architect System, Abbott Diagnostic Division, Ireland). Serological screening for anti-HCV antibodies was performed to detect HCV infection using the Architect System (Abbott Diagnostic Division, Ireland), and HCV-RNA quantification was performed on antibody-positive samples using a Cobas AmpliPrep instrument and the Cobas TaqMan HCV assay (Roche Diagnostic, Germany). To determine the presence of syphilitic infection, serological diagnosis was performed with a treponemal assay on the Architect System. Positive samples were retested with a non-treponemal assay (Venereal Disease Research Laboratory, Wiener Lab, Argentina). In cases where conflicting results were observed, the samples were reanalysed with an independent treponemal assay (the TPHA Syphilis Assay; HUMAN Diagnostic, Germany), as established by Brazil's Ministry of Health (<http://www.aids.gov.br/pagina/regulamentacao-de-tests>; <http://www.cdc.gov/Mmwr/preview/mmwrhtml/mm5732a2.htm>). The laboratory diagnosis of HTLV infection was performed using the Architect System. All assays were performed following the manufacturer's instructions.

### **Sequencing of the HIV-1 polymerase gene (*pol*)**

Viral RNA was extracted from plasma samples using the QIAamp® RNA Mini Kit (Qiagen, Germany), after which the entire HIV-1 protease (*PR*) gene and part of the reverse transcriptase (*RT*) from the *pol* gene were sequenced using 2 methodologies: the ViroSeq™ HIV-1 Genotyping System (Abbott Laboratories, US) [24] and TRUGENE® HIV-1 Genotyping Assay (Siemens Diagnostics, US) [25]. The *PR* and *RT* sequences were analysed using factory-installed software on the DNA ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems, US) and OpenGene® Sequencing System (Siemens Diagnostics, US), respectively. All technical procedures were performed according to the manufacturers' recommended instructions. A 918-base pair fragment was obtained comprising the entire *PR* and *RT* sequences, and corresponding to positions 2262–2549 from *PR* and 2661–3290 from *RT* of the reference strain HXB2 (GenBank Accession Number K03455).

Alignments of sequences were performed using Clustal X software [26], followed by manual editing with BioEdit software [27].

### **Antiretroviral resistance analysis**

Surveillance Drug-Resistance Mutations (SDRMs) were identified using the HIV Drug-Resistance Database of Stanford University (<http://cpr.stanford.edu/cpr.cgi>) and the standard SDRMs list established by the World Health Organization (WHO) [28]. The patterns of susceptibility to various antiretroviral drugs were analysed using the HIVdb Program of Stanford University (<http://sierra2.stanford.edu/sierra/servlet/JSierra>).

## **Statistical analysis**

The Pearson chi-squared test and Fisher's exact test were used for the analysis of categorical variables, with the viral subtype set as a dependent variable. The Kruskal–Wallis test was applied for the comparison of medians with continuous variables. Stepwise logistic regression was performed to select the most significant variables. Variables with a moderate association ( $p \leq 0.2$ ) with the dependent variable were included in the model, whereas a threshold of  $p \leq 0.05$  was applied for the stepwise elimination of variables considered as risk factors. The chi-squared or Fisher's exact test was used to determine the presence of HIV-1 co-infections with HBV or syphilis between subtypes B and non-B in stratified analyses. Data were analysed using STATA V.13 software (Stata Corp., USA).

## **RESULTS**

### **Epidemiological and laboratory differences between HIV-1 subtypes B and non-B**

We evaluated 169 viral sequences, of which 103 query sequences (60.9%) belonged to subtype B, 53 belonged to subtype F (31.4%), 2 belonged to subtype C (1.2%), and 1 to belonged subtype H (0.6%). Ten query sequences (5.9%) were unique recombinant forms, with 8 BF, 1 AG, and 1 BC recombinant observed (unpublished data).

While analysing patients' sociodemographic characteristics in relation to viral subtypes, we observed the occurrence of a higher frequency of subtype B in males and individuals with higher education (Table 1). Statistically significant associations were also observed between the B subtype and higher viral loads and lower T cell

counts. With respect to the exposure category, the B subtype was more common in men who have sex with men (MSM) and in the city of Recife, Pernambuco, Brazil, but the latter factor was without statistical significance. When the variable “heterosexual” was partitioned between male and female heterosexuals, it was observed that approximately 50% of the women harboured a non-B subtype, compared to 29% of heterosexual males and 20% of MSM.

For HIV-1 subtype F, which represented approximately 80% of non-B subtypes identified (53/66), there was a statistically significant association with a lower viral load ( $p = 0.0049$ ), but no association with the median T cell count ( $p = 0.067$ ), in contrast to the results observed with HIV-1 B. In a multivariate model including variables showing an association with  $p \leq 0.20$ , the variables of “male” ( $p = 0.054$ ) and “viral load above 100,000 copies/ml” ( $p = 0.023$ ) were more common in patients infected with subtype B.

The prevalence of present or past HIV-HBV co-infection was 27.8% (27/97), with 4 samples showing isolated positive results for HBsAg, 19 samples showing serological reactivity for anti-HBc alone, and 4 samples having reactivity against both HBsAg and anti-HBc. The 4 samples with isolated reactivity for HBsAg were classified as representing long-term infection by BED-CEIA testing. The prevalence of HIV-syphilis and HIV-HCV co-infections were, respectively, 14.7% (14/95) and 1.04% (01/96). No sample was positive for HTLV infection. The unique case of co-infection by HIV-HCV belonged to subtype F, which showed a high HCV viral load.

Among the 101 samples collected between 2007-2009 that were evaluated for infection statuses by BED-CEIA testing, 21 (20.8%) were determined to represent recent infections.

The presence of HIV-HBV co-infection was associated with MSM status, male gender, higher education, and higher viral loads of HIV-1. No association was observed between co-infection with HIV-HBV and HIV-1 subtype non-B (Table 2). Co-infections with HIV-syphilis were associated with MSM status, T cell counts less than 200, and males only for the HIV-1 non-B subtypes (Table 3).

### **Profiles of resistance to against antiretroviral drugs**

We observed a 2.96% prevalence of SDRMs in 5/169 sequences analysed (95% confidence interval [CI]: 0.97–6.77%), 2 of which were from non-B subtypes (09PE172 = HIV-1 F; 09PE055 = HIV-1 BF), as shown in Table 3. No sequence isolated during the period 2002-2003 showed SDRM. Only 1 patient (08PE082) showed resistance to 2 classes of antiretroviral drugs (NRTIs + NNRTI). Among the 5 individuals with SDRMs, 4 showed resistance to NNRTIs and only 1 showed a high resistance limited to IPs, with mutations L82A and L90M. The patient who had major mutations in the protease was co-infected with HBV. All patients with SDRMs were classified as having evidence of long-term infection by BED-CEIA testing.

## **DISCUSSION**

Data from 169 HIV-1 *pol* sequences were evaluated with respect to epidemiology, laboratory findings, the presence of co-infections, and antiretroviral drug susceptibility. The local epidemic in Pernambuco is characterised by heterogeneity of HIV-1 subtypes, but with a predominating B subtype (60.9%). Non-B subtypes (n = 66) consisted mostly of HIV-1 F (n = 53, 80.3%), but also included subtypes C (n = 2), H (n = 1), and the recombinant forms BF (n = 8), AG (n = 1) and BC (n = 1).

Subtype B was associated with the following risk factors: males, higher education level, higher viral loads, and lower median T cell counts, compared to the characteristics associated with non-B subtypes. Although without significant association, HIV-1 B was more frequent in MSM, which may explain the association of higher education level with this subtype, considering that MSM had higher education (in years) than did heterosexuals ( $p < 0.0001$ ). The heterosexual women group showed the highest rate of non-B HIV-1 infection (48.6%), followed by heterosexual men (37.2%) and MSM (27.6%), confirming the findings of Geretti et al. [12] and Hawke et al. [29], which showed a high prevalence of non-B subtypes in heterosexuals, especially in women. We found that the expansion of non-B subtypes into the MSM population also occurred, as the frequency of this subtype significantly increased between the 2002-2003 and 2007-2009 time periods ( $p = 0.0019$ , data not shown). Almeida et al. [20] also showed an increase in non-B subtypes among MSM (particularly C and BC recombinants) in the southern region of Brazil. The expansion of non-B HIV-1 in MSM in Pernambuco, Northeast Brazil may be related to the expansion of HIV-1 F in this region, as this subtype was responsible for ~80% of the non-B strains identified at the study site.

Individuals with recent HIV-1 non-B subtype infections had a high T cell count baseline. Unfortunately, due to the disadvantage of the cross-sectional design of the study, we could not analyse or confirm this association with a possible protection from disease. Although some authors suggest an association of the viral subtype with clinical progression [30–31], none of these studies included HIV-1 F, the major non-B HIV-1 subtype in our study population.

Regarding co-infections between HIV-1 and other sexually transmitted diseases (HBV, HCV, HTLV, and syphilis), we found a rate of 27.8% (95% CI: 19.8–

37.7) for past or present co-infection with HBV (27/97), and 8 cases (8.2%) showed current infection (presence of HBsAg). The percentages of co-infection with HCV or syphilis were, respectively, 14.7% (95% CI: 8.6–23.0) or 1.04% (95% CI: 0.05–5.00), and no instances of HIV-HTLV were detected. In other studies of HIV-positive patients in the metropolitan area of Recife, a high prevalence was found for co-infections with HIV-HBV, with frequencies of 10.3% and 38.7% of HBsAg anti-HBc positivity, respectively [32]. With respect to HIV-HCV co-infection, these frequencies have been reported as 10.7% [32] and 3.2% [33], respectively. Salvador, another large city in Northeast Brazil, has also been reported to have a large proportion of HIV-HBV co-infections (22%) and HIV-HCV co-infections (13%) [34]. With the exception of HIV-HBV co-infection in Salvador, all other incidences of co-infection were greater in those studies than in our study. This finding may be explained by the fact that the above studies were performed with patients followed up in infectious disease-service centres at hospitals, whereas our study samples came from outpatients of VCTs who were newly diagnosed as HIV-1 positive individuals. Thus, a faster diagnosis of HIV infection provided to patients through the treatment units may serve to promote increased awareness of prevention and control measures for new STIs.

The HIV-1 co-infections with HBV and syphilis were associated with MSM status and males, but differed in the HIV-1 subtypes involved. Co-infection with HIV-1 B and HBV was related to the number of years of education attained and higher viral loads. This finding may be related to an association between individuals with some reactivity to HBV serological markers and with extended education ( $p = 0.019$ ), and a borderline association between subtype B and MSM (0.057). Limiting factors for these analyses are that they were stratified by viral subtype, and the type of co-

infection was studied using a low number of available samples for analysis, which hindered a better understanding of these data.

The prevalence of primary SDRMs was estimated to be 2.96% (95% CI: 0.97–6.77) and was observed in 3 B, 1 BF, and 1 F strain. The level of primary resistance to antiretroviral drugs was lower than that seen in another large city in Northeast Brazil (Fortaleza) (9.5%), as well as in Rio de Janeiro, where a high (~15%) drug-resistance rate was detected in newly diagnosed individuals at VCTs. However, in both of these latter studies, subtype B represented 85 and 78% of the isolates, respectively. In contrast, our samples showed a significant percentage (40.2%) of non-subtype B isolates, which was mainly composed of the F subtype at the *pol* gene (30.4%). In fact, some studies have reported the greatest accumulation of antiretroviral resistance in HIV-1 B isolates [14–15] and an increased susceptibility of HIV-1 F to protease inhibitors [5]. Reinforcing this hypothesis, a study by the National Network for the Surveillance of Drug Resistance in Brazil (HIV-BResNet) reported a lower level of resistance in Brazilian cities with the highest percentages of non-B subtypes, such as Porto Alegre and Salvador [35].

Although this study was cross-sectional in nature, we have identified epidemiological and laboratory peculiarities relating to circulating viral subtypes in the state of Pernambuco, Northeast Brazil. Additional controlled studies that are free of selection bias are necessary for a deeper understanding of the main epidemiological, laboratory, and viral physiology characteristics that differentiate major subtype B viruses from the increasingly prevalent subtype F viruses. The proportion of subtype F viruses is high in the Pernambuco region of Brazil, and our data therefore may provide important clues for improving diagnostic and infection prevention strategies.

## REFERENCES

1. A. Vallari, V. Holzmayer, B. Harris, J. Yamaguchi, C. Ngansop, F. Makamche, D. Mbanya, L. Kaptué, N. Ndembi, L. Gürtler, S. Devare, C.A. Brennan, Confirmation of putative HIV-1 group P in Cameroon, *J. Virol.* 85 (2011) 1403–1407.
2. B.S. Taylor, M.E. Sobieszczyk, F.E. McCutchan, S.M. Hammer, The challenge of HIV-1 subtype diversity, *N. Engl. J. Med.* 358 (2008) 1590–1602.
3. A.F. Santos, T.M. Sousa, E.A. Soares, S. Sanabani, A.M. Martinez, E. Sprinz, J. Silveira, E.C. Sabino, A. Tanuri, M.A. Soares, Characterization of a new circulating recombinant form comprising HIV-1 subtypes C and B in southern Brazil, *AIDS* 20 (2006) 2011–2019.
4. S. Hué, J.P. Clewley, P.A. Cane, D. Pillay, HIV-1 pol gene variations is sufficient for reconstruction of transmission in the era of antiretroviral therapy, *AIDS* 18 (2004) 719–728.
5. A. Tanuri, A.C. Vicente, K. Otsuki, C.A. Ramos, O.C. Ferreira Jr, M. Schechter, L.M. Janini, D. Pieniazek, M.A. Rayfield, Genetic variation and susceptibilities to protease inhibitors among subtype B and F isolates in Brazil, *Antimicrob. Agents Chemother.* 43 (1999) 253–258.
6. M.M. Thomson, E. Delgado, I. Herrero, M.L. Villahermosa, E. Vázquez-de Parga, M.T. Cuevas, R. Carmona, L. Medrano, L. Pérez-Álvarez, L. Cuevas, R. Nájera,

- Diversity of mosaic structures and common ancestry of human immunodeficiency Virus type 1 BF intersubtype recombinant viruses from Argentina revealed by analysis of near full-length genome sequences, *J. Gen. Virol.* 83 (2002) 107–119.
7. M. Clementi, A. Lazzarin, Human immunodeficiency virus type 1 fitness and tropism: concept, quantification, and clinical relevance, *Clin. Microbiol. Infect.* 16 (2010) 1532–1538.
  8. M.E. Pinto, C.J. Struchiner, HIV-1 diversity: a tool for studying the pandemic, *Cad. Saúde Pública.* 22 (2006) 473–484.
  9. R.J. Gifford, T. de Oliveira, A. Rambaut, O.G. Pybus, D. Dunn, A.M. Vandamme, P. Kellam, D. Pillay; UK Collaborative Group on HIV Drug Resistance, Phylogenetic surveillance of viral genetic diversity and the evolving molecular epidemiology of human immunodeficiency virus type 1, *J. Virol.* 81 (2007) 13050–13056.
  10. E. LEAL, F.E. Villanova, Diversity of HIV-1 subtype B: Implications to the origin of BF recombinants, *PloS One* 5 (2010) e11833.
  11. E. Leal, W.P. Silva, M.C. Sucupira, L.M. Janini, R.S. Diaz, Molecular and structural characterization of HIV-1 subtype B Brazilian isolates with GWGR tetramer at tip of the V3-loop, *Virology* 381 (2008) 222–229.

12. A.M. Geretti, L. Harrison, H. Green, C. Sabin, T. Hill, E. Fearnhill, D. Pillay, D. Dunn; UK Collaborative Group on HIV Drug Resistance, Effect of HIV-1 subtype on virologic and immunologic response to starting highly active antiretroviral therapy, *Clin. Infect. Dis.* 48 (2009) 1296–1305.
13. R. Rodrigues, L.C. Scherer, C.M. Oliveira, H.M. Franco, R.D. Sperhake, J.L. Ferreira, S.M. Castro, I.M. Stella, L.F. Brigido, Low prevalence of primary antiretroviral resistance mutations and predominance of HIV-1 clade C at polymerase gene in newly diagnosed individuals from south Brazil, *Virus Res.* 116 (2006) 201–207.
14. E.A. Soares, A.F. Santos, T.M. Sousa, E. Sprinz, A.M. Martinez, J. Silveira, A. Tanuri, M.A. Soares, Differential drug resistance acquisition in HIV-1 of subtypes B and C, *Plos One* 2 (2007) e730.
15. P. Munerato, M.C. Sucupira, M.P. Oliveros, L.M. Janini, D.F. de Souza, A.A. Pereira, L.A. Inocencio, R.S. Diaz, HIV type 1 antiretroviral resistance mutations in subtype B, C, and F in the City of São Paulo, Brazil, *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 26 (2010) 265–273.
16. A. de Brito, S.C. Komninakis, P. Novoa, R.M. de Oliveira, L.A. Fonseca, A.J. Duarte, J. Casseb, Women infected with HIV type 1 Brazilian variant, subtype B (B'-GWGR motif) have slower progression to AIDS, compared with patients infected with subtype B (B-GPGR motif), *Clin. Infect. Dis.* 43 (2006) 1476–1481.

17. V. Ferreira, P. Moura, S. Crovella, R. Sobhie Diaz, A. Castelo Filho, R. Ximenes, L.C. Arraes, The Influence of HIV-1 Subtype in Response to Therapeutic Dendritic Cell Vaccine, *Open AIDS J.* 6 (2012) 289–292.
18. C.F. Dias, C.C. Nunes, I.O. Freitas, I.M.R. de Oliveira, S. Gilli, R. Rodrigues, L.F. Brigido, High prevalence and association of HIV-1 non-B subtype with specific sexual transmission risk among antiretroviral naïve patients in Porto Alegre, RS, Brazil, *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.* 51 (2009) 191-196.
19. T. Gräf, C.P. Passaes, L.G. Ferreira, E.C. Grisard, M.G. Morgado, G. Bello, A.R. Pinto, HIV-1 genetic diversity and drug resistance among treatment naïve patients from Southern Brazil: an association of HIV-1 subtypes with exposure categories, *J. Clin. Virol.* 51 (2011) 186–191.
20. S.E. Almeida, R.M. de Medeiros, D.M. Junqueira, T. Gräf, C.P. Passaes, G. Bello, M.G. Morgado, M. L. Guimarães, Temporal dynamics of HIV-1 circulating subtypes in distinct exposure categories in southern Brazil, *Virol. J.* 9 (2012) 306.
21. K. Chalmet, D. Staelens, S. Blot, S. Dinakis, J. Pelgrom, J. Plum, D. Vogelaers, L. Vandekerckhove, C. Verhofstede, Epidemiology study of phylogenetic transmission clusters in a local HIV-1 epidemic reveals distinct differences between subtype B and non-B infections, *BMC Infect. Dis.* 10 (2010) 262.
22. D.J. Sa Filho, S. Sanabani, R.S. Diaz, P. Munerato, A. Brunstein, E. Fusuma, E.C. Sabino, L.M. Janini, Analysis of full-length human immunodeficiency virus

- type 1 genome reveals a variable spectrum of subtypes B and F recombinants in São Paulo, Brazil, *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 21 (2005) 145–151.
23. A.M. Cavalcanti, H.R. Lacerda, A.M. Brito, S. Pereira, D. Medeiros, S. Oliveira, Antiretroviral resistance in individuals presenting therapeutic failure and subtypes of the human immunodeficiency virus type 1 in the Northeast Region of Brazil, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 102 (2007) 785–792.
24. L.B. de Medeiros, H.R. Lacerda, A.M. Cavalcanti, Mde F. de Albuquerque. Primary resistance of human immunodeficiency virus type 1 in a reference Center in Recife, Pernambuco, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 101 (2006) 845–849.
25. A.M. Cavalcanti, A.M. Brito, D.M. Salustiano, K.O. Lima, S.P. Silva, R.S. Diaz, H.R. Lacerda, Primary resistance of HIV to antiretrovirals among recently diagnosed at voluntary counselling and testing centres in the metropolitan region of Recife, Pernambuco, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 107 (2012) 450–457.
26. J.D. Thompson, T.J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin, D.G. Higgins, The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools, *Nucleic Acids Res*. 25 (1997) 4876–4882.

27. T.A. HALL, BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 41 (1999) 95-98.
28. D.E. Bennett, R.J. Camacho, D. Otelea, D.R. Kuritzkes, H. Fleury, M. Kiuchi, W. Heneine, R. Kantor, M.R. Jordan, J.M. Schapiro, A.M. Vandamme, P. Sandstrom, C.A. Boucher, D. van de Vijver, S.Y. Rhee, T.F. Liu, D. Pillay, R.W. Shafer, Drug resistance mutations for surveillance of transmitted HIV-1 drug resistance, 2009 update. *PLoS One* 4 (2009) e4724.
29. K.G. Hawke, R.G. Waddell, D.L. Gordon, R.M. Ratcliff, P.R. Ward, J.M. Kaldor, HIV non-B subtype distribution: emerging trends and risk factors for imported and local infections newly diagnosed in South Australia, *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 29 (2013) 311–317.
30. P.J. Easterbrook, M. Smith, J. Mullen, S. O'Shea, I. Chrystie, A. de Ruiter, I.D. Tatt, A.M. Geretti, M. Zuckerman, Impact of HIV-1 viral subtype on disease progression and response to antiretroviral therapy, *J. Int. AIDS Soc.* 13 (2010) 4.
31. X. Li, Y. Xue, L. Zhou, Y. Lin, X. Yu, X. Wang, X. Zhen, W. Zhang, Z. Ning, Q. Yue, J. Fu, F. Shen, J. Gai, Y. Xu, J. Mao, X. Gao, X. Shen, L. Kang, G. Vanham, H. Cheng, Y. Wang, M. Zhuang, X. Zhuang, Q. Pan, P. Zhong, Evidence that HIV-1 CRF01\_AE is associated with low CD4+T cell count and CXCR4 co-receptor usage in recently infected young men who have sex with men (MSM) in Shanghai, China, *PLoS One* 9 (2014) e89462.

32. A.S. Sampaio, L.C. Arraes de Alencar, P.M.M. Freire de Moura, J. de Barros Correia, S. de Barros Barreto, A. Castelo, Prevalencia de la co-infección con hepatitis B y C em pacientes HIV positivos y factores de riesgo asociados, *Actualizaciones EN SIDA* 17 (2009) 12–17.
33. F.H. Carvalho, M.R. Coêlho, A. Vilella Tde, J.L. Silva, H.R. Melo, HIV/HCV coinfection at an university hospital in Recife, Brazil, 43 (2009) 133–139.
34. M. Moreira, A. Ramos, E.M. Netto, C. Brites, Characteristics of co-infections by HCV and HBV among Brazilian patients infected by HIV-1 and/HTLV-1, *Braz. J. Infect Dis.* 17 (2013) 661–666.
35. L.A. Inocencio, A.A. Pereira, M.C. Sucupira, J.C. Fernandez, C.P. Jorge, D.F. Souza, H.T. Fink, R.S. Diaz, I.M. Becker, T.A. Suffert, M.B. Arruda, O. Macedo, M.B. Simão, A. Tanuri, Brazilian network for HIV drug resistance surveillance: a survey of individuals recently diagnosed with HIV, *J Int. AIDS Soc.* 12 (2009) 20.

Table 1 - Demographic and laboratory characteristics between subtypes B and non-B HIV-1

Variables	Subtype B (n = 103)	Subtype Non-B <sup>a</sup> (n = 66)	Univariate analysis	
			OR (CI - 95%)	p-value
<b>Gender (n = 168)</b>				
Female	36 (35,3%)	34 (51,5%)	1,0	-
Male	66 (64,7%)	32 (48,5%)	1,95 (1,03 – 3,66)	0,038 <sup>†</sup>
<b>Age (years) (n = 167)</b>	34,0 ± 10,6	34,6 ± 10,4	0,995 (0,966 – 1,025)	0,762
<b>Education (n = 144)</b>				
≥ 8 years	50 (56,2%)	40 (72,7%)	1,0	-
< 8 years	39 (43,8%)	15 (27,3%)	2,08 (1,01 – 4,30)	0,048 <sup>†</sup>
<b>Marital status (n = 68)</b>				
Single	24 (47,1%)	9 (52,9%)	1,0	-
Married	19 (37,3%)	7 (41,2%)	0,85 (0,28 – 2,60)	0,773
Divorced	3 (5,9%)	0 (-)	Não calculado	-
Windowed	5 (9,8%)	1 (5,9%)	Não calculado	-
<b>Place of residence (n = 151)</b>				
Recife	21 (23,1%)	6 (10,0%)	1,0	-
RMR	58 (63,7%)	44 (73,3%)	0,38 (0,14 – 1,01)	0,053
countryside	12 (13,2%)	10 (16,7%)	0,34 (0,10 – 1,18)	0,090
<b>Pregnancy (n = 71)</b>				
Yes	4 (10,8%)	5 (14,7%)	1,0	-
No	33 (89,2%)	29 (85,3%)	1,42 (0,35 – 5,80)	0,623 <sup>*</sup>
<b>Exposure category (n = 168)</b>				
HTS	68 (66,7%)	53 (80,3%)	1,0	-
HSH	34 (33,3%)	13 (19,7%)	2,04 (0,98 – 4,24)	0,057
<b>Infections status (n=101)</b>				
Recent	12 (22,2%)	9 (19,1%)	1,0	-
Long-term	42 (77,8%)	38 (80,9%)	0,83 (0,31 – 2,18)	0,704
<b>CD4<math>\diamond</math></b>	226,5 (78; 414)	341 (159; 488)	-	0,036 <sup>†</sup>
<b>CD4 levels (n=132)</b>				
< 200 cells	32 (39,0%)	13 (26,0%)	1,0	-
≥ 200 cells	50 (61,0%)	37 (74,0%)	1,82 (0,84 – 3,94)	0,128
<b>Viral load<math>\diamond</math></b>	65.000 (7.618; 194.000)	18.185 (1.470; 53.973)	-	0,023 <sup>†</sup>
<b>Viral load levels (n=139)</b>				
< 100.000 copies/ml	52 (60,5%)	41 (77,4%)	1,0	-
≥ 100.000 copies/ml	34 (39,5%)	12 (22,6%)	2,21 (1,05 – 4,68)	0,037 <sup>†</sup>
<b>Co-infections</b>				
<b>HIV-HBV (n = 97)</b>				
Negative	36 (70,0%)	34 (77,3%)	1,0	-
Positive	17 (30,0%)	10 (22,7%)	1,61 (0,59 – 4,41)	0,310

<b>HIV-HCV (n = 96)</b>				
Negative	52 (100%)	43 (97,7%)	1,0	-
Positive	0 (-)	1 (2,3%)	Not calculated	-
<b>HIV-HTLV (n = 91)</b>				
Negative	47 (100%)	44 (100%)	1,0	-
Positive	0 (-)	0 (-)	Not calculated	-
<b>HIV-Syphilis (n = 95)</b>				
Negative	44 (86,3%)	37 (84,1%)	1,0	-
Positive	7 (13,7)	7 (15,9)	0,84 (0,27-2,62)	0,765

<sup>a</sup> Among the 66 HIV-1 subtypes non-B, 53 (80,3%) were subtype F; <sup>b</sup>RMR: Metropolitan Region of Recife; <sup>c</sup> HTS: Heterosexuais; <sup>d</sup> MSM: Mens who have sex with men; <sup>†</sup> Statistically significant association; \* Fischer's exact test;  $\diamond$  Median (P<sub>25</sub>; P<sub>75</sub>) – Kruskal-Wallis test.

Tabela 2 – Characteristics of co-infection HIV-HBV individuals with HIV-1 subtypes B and non-B.

Variables	Subtype B		p-value	Subtype non-B		p-value
	HBV+	HBV-		HBV+	HBV-	
<b>Exposure category (n=95)<sup>b</sup></b>	(n=27) <sup>a</sup>	(n=70) <sup>a</sup>		(n=27) <sup>a</sup>	(n=70) <sup>a</sup>	
MSM <sup>c</sup>	10 (10.5)	08 (8.4)	<u>0.014</u>	01 (1.0)	06 (6.3)	0.49*
HTS <sup>d</sup>	07 (7.4)	26 (27.4)		09 (9.8)	28 (29.5)	
<b>T cells count (n=96)</b>						
CD4 < 200	02 (2.1)	06 (6.2)	0.63*	01 (1.0)	12 (12.4)	0.51*
CD4 ≥ 200	08 (8.3)	21 (21.9)		06 (6.2)	40 (41.7)	
<b>Viral load<sup>e</sup> (n=73)</b>						
< 100.000	06 (8.2)	24 (32.9)	<u>0.025</u> *	06 (8.2)	22 (30.1)	0.72 *
≥ 100.000	06 (8.2)	04 (5.5)		01 (1.4)	04 (5.5)	
<b>Gender (n=96)</b>						
Male	15 (15.6)	20 (20.8)	<u>0.026</u> *	03 (3.1)	17 (17.7)	0.27 *
Female	02 (2.1)	15 (15.6)		07 (7.3)	17 (17.7)	
<b>Education (n=81)</b>						
< 8 years	04 (4.9)	20 (24.7)	<u>0.039</u> *	04 (4.9)	19 (23.4)	0.45 *
≥ 8 years	08 (9.9)	09 (11.1)		03 (3.7)	09 (11.1)	

<sup>a</sup> Total of samples tested serologically for co-infection HBV-HIV; <sup>b</sup> Available data for each variable in the analysis; \* Fisher's exact test; <sup>c</sup> MSM: Men who have sex with men; <sup>d</sup> HTS: Heterosexuals; <sup>e</sup> Viral load (copies/ml).

Tabela 3 - Characteristics of co-infection HIV-syphilis at individuals with HIV-1 subtypes B and non-B.

Variables	Subtype B		p-value	Subtype non-B		p-value
	Syphilis+	Syphilis-		Syphilis+	Syphilis-	
<b>Exposure category (n=91)<sup>b</sup></b>	(n=14) <sup>a</sup>	(n=81) <sup>a</sup>		(n=14) <sup>a</sup>	(n=81) <sup>a</sup>	
MSM <sup>c</sup>	02 (2.2)	15 (16.5)	0.55*	04 (4.4)	03 (3.3)	<u>0.007*</u>
HTS <sup>d</sup>	05 (5.5)	28 (30.8)		03 (93.3)	31 (34.1)	
<b>T cells count (n=67)</b>						
CD4 < 200	-	07 (10.4)	0.30*	03 (4.5)	04 (6.0)	<u>0.025*</u>
CD4 ≥ 200	05 (7.5)	23 (34.3)		01 (1.5)	24 (35.8)	
<b>Viral load<sup>e</sup> (n=72)</b>						
< 100.000	06 (8.3)	24 (32.9)	0.21 *	04 (5.5)	25 (34.7)	0.51 *
≥ 100.000	-	08 (11.1)		-	05 (6.9)	
<b>Gender (n=94)</b>						
Male	03 (3.2)	30 (31.9)	0.167*	06 (6.4)	14 (14.9)	<u>0.026*</u>
Female	04 (4.2)	13 (13.8)		01 (1.1)	23 (24.4)	
<b>Education (n=74)</b>						
< 8 years	02 (2.7)	22 (29.7)	0.14*	03 (4.0)	20 (27.0)	0.57 *
≥ 8 years	04 (5.4)	11 (1113.6)		01 (1.4)	11 (13.6)	

<sup>a</sup> Total of samples tested serologically for co-infection HBV-HIV; <sup>b</sup> Available data for each variable in the analysis; \* Fisher's exact test; <sup>c</sup> MSM: Men who have sex with men; <sup>d</sup> HTS: Heterosexuals; <sup>e</sup> Viral load (copies/ml).

Table 4 – Drug resistance mutations and antiretroviral resistance profile at patients from Pernambuco, Northeast – Brazil

Sequence	Gender/Exposure category/	PI major mutations	PI minor mutations	ITRN mutations	ITRNN mutatioes	Drug-resistance profile		
						Low	Intermediate	High
08PE165	F/HTS/PHIV+/ Syphilis	-	L10V <sup>a</sup> , A71T <sup>b</sup>	-	P225H	NFV, NVP	EFV	-
08PE121	M/HTS/ HBsAg+	L82A, L90M	L10F <sup>a</sup> , E33F <sup>a</sup> , K43T <sup>a</sup> , A71V <sup>a</sup> , G73S	-	-	TPV/r	FVP/r, LPV/r	ATV/r, IDV/r, NFV, SQV/r
08PE082	M/HTS	-	-	V75L, F77L, M184V	K101E, G190S	ABC, DDI, ETR	RPV	3TC, FTC, EFV, NVP
09PE172	M/MSM	-	L10V <sup>a</sup>	-	K103N	-	-	EFV, NVP
08PE055	M/HTS	-	-	-	G190A	ETR, RPV	EFV	NVP

PI: Protease inhibitors; NRTIs: Nucleoside reverse transcriptase inhibitors; NNRTI: non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors; ABC: abacavir; ATV: atazanavir; DDI: didanosine; EFV: efavirenz; ETR: etravirine; FVP: fosamprenavir; FTC: emtricitabine; IDV: indinavir; PVL: lopinavir; NFV: nelfinavir; NVP: nevirapine; RPV: rilpivirine; SQV: saquinavir; 3TC: lamivudine; HTS: heterosexual; MSM: men who have sex with men; PHIV +: HIV + partner.

<sup>a</sup> Mutations not contained in the SDRM list established by the World Health Organization (WHO) (BENETT et al., 2009). However, according to the HIVdb Program - Stanford University for the evaluation of antiretroviral susceptibility, they may be associated with decreased susceptibility that when combined with other mutations or due to other intrinsic characteristics to each corresponding codon.

## ANEXO A – CARTA DE ANUÊNCIA DO LACEN/PE



SECRETARIA DE SAÚDE DO ESTADO DE PERNAMBUCO – SES  
SECRETARIA EXECUTIVA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE  
DIRETORIA GERAL DE LABORATÓRIOS PÚBLICOS-LACEN/PE  
NÚCLEO DE ESTUDO E PESQUISA DO LACEN - NEPEL



## CARTA DE ANUÊNCIA

Nº. 03/2012

Declaro para os devidos fins, receber o estudante **KLEDOALDO OLIVEIRA DE LIMA** do Programa de Pós Graduação em **MEDICINA TROPICAL** da **UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO-UFPE**. O qual, está devidamente matriculado no curso de doutorado do Programa supracitado, sob a orientação da Profª. Drª. Heloísa Ramos Lacerda de melo, e com a co-orientação o Prof. Dr. Élcio de Souza Leal.

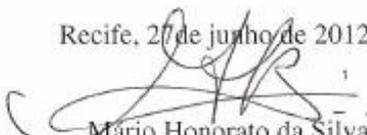
O projeto de tese de doutorado apresentado pelo aluno Kledoaldo Oliveira de Lima é intitulado de **CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS E FILOGENÉTICAS DOS SUBTIPOS B e F do HIV-1 NA REGIÃO METROPOLITANA DO RECIFE-PERNAMBUCO**.

Ciente dos objetivos, métodos, procedimentos, condições éticas que serão usadas nessa pesquisa e levando em consideração ao parecer emitido pela Drª. Ana Maria Salustiano Cavalcanti, associado ao **Termo de Responsabilidade** do Programa de Pós Graduação em Medicina Tropical do Centro de Ciências da Saúde-CCS-UFPE, assinado pelas orientadora e coordenadora do Programa de Pós Graduação em Medicina Tropical, respectivamente, a Profª. Drª. Heloísa Ramos Lacerda de Melo é a Profª. Drª. Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho, combinando com as duas **Declarações** de autorização emitidas pelas Drª. Ana Maria Salustiano Cavalcanti e Drª. Luzidalva Barbosa de Medeiros, para que o aluno Kledoaldo Oliveira de Lima possa fazer uso de alguns dados de suas teses de doutorado, com o objetivo de auxiliar na composição do trabalho de pesquisa ora solicitado.

Diante do exposto e não havendo outra consideração para o momento, somos de **PARECER FAVORÁVEL** que seja pelo LACEN-PE oferecida todas as condições necessárias para o desenvolvimento da pesquisa, desde que, seja assegurado o que se segue nos itens abaixo.

- A garantia de solicitar, se necessário, esclarecimentos antes, durante e depois do desenvolvimento da pesquisa e
- No caso do não cumprimento dos itens acima, a liberdade de retirar minha **ANUÊNCIA** a qualquer momento da pesquisa sem penalidade alguma.

Recife, 27 de junho de 2012.

  
Mário Honorato da Silva  
Coordenador do NEPEL

*Mário Honorato da Silva  
Coordenador do Núcleo de Estudos e Pesquisa  
do LACEN - Matr. 268164-1*

Rua João Fernandes Vieira, S/N- Boa Vista  
CEP:50.050.020- Fones:3181-6406/6407 Fax:31816146  
E-mail: nepel.lacenpe@hotmail.com

## ANEXO B- APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA DO CCS-UFPE

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
PERNAMBUCO CENTRO DE  
CIÊNCIAS DA SAÚDE / UFPE-



### PROJETO DE PESQUISA

**Título:** Características epidemiológicas e filogenéticas dos subtipos B e F do HIV-1 na Região Metropolitana do Recife - Pernambuco

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 03849612.8.0000.5208

**Pesquisador:** Kledaldo Oliveira de Lima

**Instituição:** CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

**Número do Parecer:** 114.722

**Data da Relatoria:** 03/10/2012

#### Apresentação do Projeto:

Trata-se de um estudo transversal, retrospectivo no qual resultados de análises filogenéticas, epidemiológicas (informações demográficas, laboratoriais) e de características virais, obtidas das sequências pol do HIV-1 isoladas a partir de indivíduos recentemente diagnosticados em CTAs e de um hospital de grande porte (terciário) da região metropolitana do Recife, serão avaliados para uma melhor compreensão da epidemia local, através de ferramentas de epidemiologia molecular. Além disso, as sequências serão estudadas quanto à sua origem e características moleculares. A análise filogenética de sequências da região pol do HIV-1, relacionando-as com informações sociodemográficas, laboratoriais e de características virais (mutações de resistência) de pacientes diagnosticados para esta infecção na Região metropolitana do Recife.

O estudo tem como finalidade atender requisito para curso de Doutorado apresentado ao colegiado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco.

Tem como orientadora a Prof.ª. Dra. Heloisa Ramos Lacerda de Melo e co-orientador o Prof. Dr. Élcio de Souza Leal.

#### Objetivo da Pesquisa:

**Objetivo Geral:** Realizar a análise filogenética de sequências da região pol do HIV-1, relacionando-as com informações sociodemográficas, laboratoriais e de características virais (mutações de resistência) de pacientes diagnosticados para esta infecção na Região metropolitana do Recife.

Como objetivos específicos o estudo analisará:

- A associação das características sociodemográficas com as possíveis cadeias de transmissão (grupos filogenéticos) e com os subtipos B e F do HIV-1.
- A associação das características clínicas e laboratoriais (determinação de infecção recente, contagem de células T CD4+, carga viral e presença de co-infecções do HIV com o vírus da hepatite B (HBV), o vírus da hepatite C (HCV), o vírus linfotrópico de células T humanas (HTLV) e sífilis) com as possíveis cadeias de transmissão (grupos filogenéticos) e com os subtipos B e F do HIV-1.
- Reconstruir a história evolutiva da epidemia dos subtipos B e F do HIV-1 para delinear suas origens e características moleculares.
- Caracterizar os padrões filogeográficos das sequências estudadas.

**Endereço:** Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS  
**Bairro:** Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600  
**UF:** PE **Município:** RECIFE  
**Telefone:** (81)2126-8588 **Fax:** (81)2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
PERNAMBUCO CENTRO DE  
CIÊNCIAS DA SAÚDE / UFPE-



**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Trata-se de consulta a banco de amostras biológicas estocadas no LACEN cuja manipulação poderá acarretar riscos de contaminação. Tal condição é atenuada pela capacitação técnica do serviço e dos profissionais envolvidos na pesquisa.

Como benefícios os resultados do estudo proporcionarão significativos conhecimentos sobre os subtipos B e F do HIV na região metropolitana.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Trata-se de um importante estudo cuja análise filogenética dos subtipos do HIV ( B e F )será relacionada com as informações sociodemográficas, laboratoriais e características virais, particularmente mutações de resistência.

Apresenta metodologia adequada,os critérios de inclusão estão claros e bem definidos.

O estudo analisará amostras estocadas no Lacen, provenientes de dois estudos já realizados anteriormente(Medeiros et al - 2006 e Cavalcanti et al 2012)totalizando 214 sequências parciais. Cronograma apresentado de forma adequada com a coleta de dados prevista para o segundo semestre de 2012 após aprovação do CEP.

Quanto ao orçamento a quantia de R\$12.659,00 destinada à aquisição de Kits para o diagnóstico de laboratorial da infecção pelos vírus B, C , HTLV e Sífilis terá o apoio financeiro proporcionado pelo programa nacional de cooperação acadêmica - novas fronteiras, ligado à Fundação CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento Profissional de Pessoal de Nível Superior).

O material de escritório orçado em R\$2.101,00 será da responsabilidade do pesquisador.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Folha de rosto preenchida de forma adequada,termo de compromisso quanto ao cumprimento da resolução 196 assinada pelo pesquisador e orientador, Cartas de autorização da Dra.Ana Salustiano Cavalcanti e Dra. Luzidalva Barbosa Medeiros permitindo a utilização do banco de dados redigidas corretamente e anexadas ao projeto.Consta também carta de anuência do Laboratório Central da Secretaria de Saúde de PE para realização dos testes objetos da pesquisa.Cronograma e orçamento adequados. Curriculum dos pesquisadores demonstram ampla capacitação para realização do estudo.

**Recomendações:**

Projeto sem recomendações

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Sem pendências

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

O Colegiado aprova o parecer do protocolo em questão e o pesquisador está autorizado para iniciar a coleta de dados.

Projeto foi avaliado e sua APROVAÇÃO definitiva será dada, por meio de ofício impresso, após a entrega do relatório final ao Comitê de Ética em Pesquisa/UFPE.

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS  
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.740-600  
 UF: PE Município: RECIFE  
 Telefone: (81)2126-8588 Fax: (81)2126-8588 E-mail: cepccs@ufpe.br