



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL
E SAÚDE PÚBLICA**

MÔNICA NOGUEIRA DA GUARDA REIS

**Genomas completos e parciais de formas
recombinantes BF1 e BC do HIV-1 circulantes nos
estados de Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do
Sul, Tocantins, Maranhão e Piauí**

**Goiânia
2017**

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR
VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES E DISSERTAÇÕES
NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: ☐ Dissertação ☒ Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação:

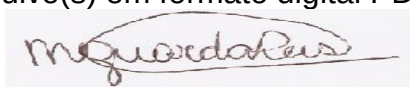
Nome completo do autor: Mônica Nogueira da Guarda Reis

Título do trabalho: Genomas completos e parciais das formas recombinantes BF1 e BC do HIV-1 circulantes nos estados de Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Tocantins, Maranhão e Piauí

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento ☒ SIM ☐ NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.



Assinatura do(a) autor(a)²

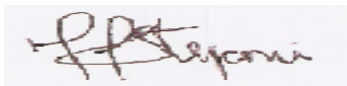
Ciente e de acordo:

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

² A assinatura deve ser escaneada.



Assinatura do(a) orientador(a)²

Data: 01 /07 /2019

Versão atualizada em setembro de 2017.

MÔNICA NOGUEIRA DA GUARDA REIS

**Genomas completos e parciais de formas
recombinantes BF1 e BC do HIV-1 circulantes nos
estados de Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do
Sul, Tocantins, Maranhão e Piauí**

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Medicina Tropical e Saúde Pública da
Universidade Federal de Goiás para
obtenção do Título de Doutor em
Medicina Tropical e Saúde Pública.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Mariane
Martins de Araújo Stefani

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Monick
Lindenmeyer Guimarães

Esse trabalho foi realizado com o auxílio financeiro do Programa de Apoio a Núcleos de
Excelência (PRONEX)/Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG)/
Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (07/2012) e CNPq
Universal (481208/2012-7).

**Goiânia
2017**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do
Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Reis, Mônica Nogueira da Guarda

Genomas completos e parciais de formas recombinantes BF1 e
BC do HIV-1 circulantes nos estados de Goiás, Mato Grosso, Mato
Grosso do Sul, Tocantins, Maranhão e Piauí [manuscrito] / Mônica
Nogueira da Guarda Reis. - 2017.

xxii, 142 f.

Orientador: Profa. Dra. Mariane Martins de Araújo Stefani; co
orientadora Dra. Monick Lindenmeyer Guimarães.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de
Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP), Programa de Pós
Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública, Goiânia, 2017.

Bibliografia. Anexos.

Inclui siglas, abreviaturas, símbolos, tabelas, lista de figuras, lista
de tabelas.

1. HIV-1. 2. Formas recombinantes. 3. Genoma completo. I.
Stefani, Dra. Mariane Martins de Araújo, orient. II. Título.

CDU 579



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA
Rua 235, s/n – Setor Universitário - Goiânia/GO – CEP: 74.605-050
Fones: (62) 3209.6362 - 3209.6102 – Fax: (62) 3209.6363 - e-mail: ppgmtsp.ufg@gmail.com

ATA DA REUNIÃO DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MÔNICA NOGUEIRA DA GUARDA REIS - Aos catorze dias do mês de agosto do ano de 2017 (14/08/2017), às 14:00 horas, reuniram-se os componentes da Banca Examinadora: Profs. Drs. MARIANE MARTINS DE ARAÚJO STEFANI, ANDRÉ FELIPE ANDRADE DOS SANTOS, EDSON DELATORRE, JOÃO ALVES DE ARAÚJO FILHO e LUDIMILA PAULA VAZ CARDOSO, para, sob a presidência da primeira, e em sessão pública realizada no INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA, procederem à avaliação da defesa de tese intitulada: **“GENOMA COMPLETO DE FORMAS RECOMBINANTES BF1 E BC DO HIV-1 CIRCULANTES NOS ESTADOS DE GOIÁS, MATO GROSSO, MATO GROSSO DO SUL, TOCANTINS, MARANHÃO E PIAUÍ”** em nível de **DOUTORADO**, área de concentração em **MICROBIOLOGIA**, de autoria de **MÔNICA NOGUEIRA DA GUARDA REIS** discente do PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA, da Universidade Federal de Goiás. A sessão foi aberta pela Orientadora Profa. Dra. MARIANE MARTINS DE ARAÚJO STEFANI, que fez a apresentação formal dos membros da Banca e orientou a Candidata sobre como utilizar o tempo durante a apresentação de seu trabalho. A palavra a seguir, foi concedida ao autor da tese que, em 30 minutos procedeu à apresentação de seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da Banca arguiu a Candidata, tendo-se adotado o sistema de diálogo sequencial. Terminada a fase de arguição, procedeu-se à avaliação da defesa. Tendo-se em vista o que consta na Resolução nº. 1034/2014 do Conselho de Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura (CEPEC), que regulamenta o Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública a Banca, em sessão secreta, expressou seu Julgamento, considerando a candidata **Aprovada** ou **Reprovada**:

Banca Examinadora

Profa. Dra. Mariane Martins de Araújo Stefani
Prof. Dr. André Felipe Andrade dos Santos
Prof. Dr. Edson Delatorre
Prof. Dr. João Alves de Araújo Filho
Profa. Dra. Ludimila Paula Vaz Cardoso

Aprovada / Reprovada

Aprovada
APROVADA
APROVADA
APROVADA
Aprovada

Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou a candidata habilitada, (**Habilitada ou não Habilitada**), cumprindo todos os requisitos para fins de obtenção do título de **DOUTOR EM MEDICINA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA**, na área de concentração em **MICROBIOLOGIA**, pela Universidade Federal de Goiás. Cumpridas as formalidades de pauta, às 14h10 min, a presidência da mesa encerrou esta sessão de defesa de tese e para constar eu, KARINY VIEIRA SOARES E SILVA, secretária do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública lavrei a presente Ata que depois de lida e aprovada, será assinada pelos membros da Banca Examinadora e por mim em duas vias de igual teor. A Banca Examinadora aprovou a seguinte alteração no título da Tese:

Profa. Dra. Mariane Martins de Araújo Stefani (IPTSP/UFG) _____

Prof. Dr. André Felipe Andrade dos Santos (UFRJ/RJ) _____

Prof. Dr. Edson Delatorre (FIOCRUZ/RJ) _____

Prof. Dr. João Alves de Araújo Filho (IPTSP/UFG) _____

Profa. Dra. Ludimila Paula Vaz Cardoso (CAJ/UFG) _____

Secretário da Pós-Graduação: _____

Kariny Vieira Soares

“Cada pessoa que passa na nossa vida, passa sozinha, porque cada pessoa é única e nenhuma substitui a outra. Cada pessoa que passa pela nossa vida passa sozinha, não nos deixa só, porque deixa um pouco de si e leva um pouquinho de nós. Essa é a mais bela responsabilidade da vida e a prova de que as pessoas não se encontram por acaso”.

Charles Chaplin

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida, esperança e fé. Por me guiar em todos os momentos, por me inspirar a prosseguir, mesmo quando os dias eram escuros e parecia não ter nenhuma saída. Ainda que os acontecimentos parecessem uma coincidência, no meu coração eu sabia que tudo estava sendo conduzido pela Sua mão Onipotente, Onipresente e Onisciente. Obrigada pelas inúmeras vezes que o Senhor pegou na minha mão e disse: Está com medo? Vai com medo mesmo, mas faz!

Aos meus pais Júlio José da Guarda e Iva Nogueira da Guarda, que sempre me incentivaram a buscar o conhecimento e me fizeram entender que o conhecimento nos faz melhores, não para nós mesmos, mas para ajudar os que necessitam.

Ao meu esposo, Adriano, e ao meu filho, Pedro Henrique, que entenderam minhas ausências durante minhas viagens ao Rio de Janeiro e as frustrações durante o doutorado. Vocês sempre estiveram do meu lado e me apoiaram. E como o Pedro Henrique diz: - A ciência não pode parar.

À orientadora prof.^a Dr.^a Mariane M A Stefani, por esses onze anos de convivência marcados pelo respeito, confiança e incentivos. Obrigada pelo auxílio, pela disponibilidade e por abrir não apenas o seu laboratório para mim, mas também sua casa. Mesmo estando aposentada, não mediu esforços para as inúmeras horas de dedicação, disponibilidade, orientação e conselhos. Mariane, você é uma pessoa que faz seu trabalho com tanto amor, excelência e um olhar minucioso que nos impulsiona a querer dar sempre o nosso melhor. Sua orientação fez a diferença nessa Tese.

À coorientadora Dr.^a Monick L Guimarães, que me auxiliou grandemente durante todo o doutorado, acolheu-me no Laboratório de AIDS e Imunologia Molecular/FIOCRUZ/RJ, deixando-me confortável, fazendo com que a saudade de casa fosse diminuída. Muito obrigada pela sua disponibilidade, mesmo que separadas por alguns quilômetros, você conseguia ser presente via Skype, via email, via telefone. Agradeço pelos ensinamentos, pelas análises, por sua amizade e pelos passeios.

À coordenação da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro que nos permitiu realizar esse trabalho.

À banca de qualificação composta pelos Profs. Drs. André Kipnis, João Alves de Araújo Filho e a Valéria Christina Rezende Feres pelas preciosas contribuições.

Ao Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública pelo incentivo para que eu pudesse me qualificar. Agradeço a diretora do IPTSP, prof.^a Flávia Oliveira, que nos últimos meses me apoiou para que eu pudesse me dedicar a Tese.

Aos colegas servidores que me auxiliaram nessa caminhada, ora com informações pertinentes, ora com palavras de ânimo. Meus sinceros agradecimentos a Valéria, Sr Fernando, Zezinho, Kariny e Vânia. A querida Viviane que sempre se dispôs a me ajudar com o sequenciador, e mesmo quando o sequenciador do IPTSP estragou, não se negou a me acompanhar em outra unidade, ajudando-me a manusear o sequenciador da PUC. E ao Agabo que sempre foi companheiro nas idas e vindas da PUC para a UFG.

À professora Vera Saddi que de bom ânimo nos emprestou o sequenciador para continuarmos com as reações. Aos servidores Cesar e Ricardo que foram muitos solícitos nos ajudando com o sequenciador da PUC.

Aos amigos do Laboratório de Imunologia da Aids e Hanseníase/LIAH que passaram pela minha vida, foram tantos (Alexsander, Angela, Ludimila, Bruna, Adriana, Adriano, Lucas, Dr Maurício, Maria Edileuza, Emerith, Regiane, Keila, Aline Freitas, Janaína, Danielle, Rodrigo e João Pedro), cada um deixou sua marca e saudades. Hoje, somos poucos, Aline e Myuki (professora Mariane) perseverando diariamente, uma dando força pra outra. Myuki, muito obrigada pelas inúmeras palavras de apoio e por sempre ver o melhor em todas as situações. Sua amizade é um presente de Deus; Ernandes e Dienny (professora Samira) obrigada pelas conversas divertidas e leves. Meus sinceros agradecimentos à Yanna que muito me auxiliou na formatação da Tese. O que fica é a certeza de que luz no fim do túnel está cada vez mais próxima e brilhante. À professora Samira sempre alegre e prestativa.

As professoras Simone, Patrícia e Regina Beatriz, vocês são um canal de benção de Deus na minha vida, vocês foram instrumentos Divino para me fortalecer durante esse

momento. Obrigada pelas palavras de carinho, de fé, que aqueceram o meu coração em momentos de dúvidas e tristeza.

Aos companheiros do Libtec e CEPRACO, profa Lucimeire, Cristina, Isabela, Priscila, Monalisa, Batalha, Layanny, Silvio e Camila, obrigada pela convivência e carinho. À profa Adriana Crespo pelos conselhos e amizade.

Aos amigos que fiz no Laboratório de AIDS e Imunologia Molecular na FIOCRUZ/RJ, obrigada pelas informações e pelo carinho que me fizeram sentir em casa.

Aos meus amados irmãos da Igreja Metodista do Jardim Esmeraldas, vocês me suportaram todos esses anos chorando quando o experimento não dava certo, reclamando quando o sequenciador estragava. Obrigada por cada oração e pelos inúmeros “orgulho santo de você”, obrigada por vibrarem quando o artigo era publicado, mesmo não sabendo ao certo o que ele dizia.

Aos colegas que coletaram e processaram as amostras que fizeram parte desse estudo, mediante o excelente trabalho de vocês foi possível realizar esse projeto tão relevante para a epidemiologia do HIV-1 no Brasil. O meu agradecimento à doutora Ludimila (pioneira do sequenciamento no LIAH), doutora Keila, doutora Yanna e doutora Zelma (Goiás), mestra Adriana (Mato Grosso), doutor Alexsander (Mato Grosso do Sul), mestra Bruna (Tocantins) e doutora Maria Edileuza (Maranhão e Piauí).

Aos pacientes que aceitaram participar de cada estudo nos estados de Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Tocantins, Maranhão e Piauí.

SUMÁRIO

EPÍGRAFE.....	iii
AGRADECIMENTOS.....	iv
SUMÁRIO.....	vii
TABELAS, FIGURAS E ANEXOS.....	ix
SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS.....	xi
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xv
APRESENTAÇÃO	xvii
ORGANIZAÇÃO DA TESE	xxii
1. INTRODUÇÃO/REVISÃO DA LITERATURA.....	1
1.1 Vírus da Imunodeficiência Humana - Morfologia Viral e organização genômica	1
1.2 Ciclo Replicativo do HIV-1	4
1.3 Variabilidade genética do HIV-1.....	7
1.3.1- Subtipos Puros do HIV-1	9
1.3.2- Formas Recombinantes do HIV-1	15
2. JUSTIFICATIVA	28
3. OBJETIVOS	30
3.1 OBJETIVOS GERAIS	30
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
5. ARTIGO/MANUSCRITOS	31
Characterization of HIV-1 CRF90_BF1 and putative novel CRFs_BF1 in Central West, North and Northeast Brazilian regions.....	pdf 1/16
Characterization of three new URFs_BF identified in Brazil	48
HIV-1 subtype C and F1 infections and extensive variability of BC, BFC and CF mosaics in Central West, North and Northeast Brazil	65
6. DISCUSSÃO	86
7. CONCLUSÕES	94

8. REFERÊNCIAS.....	95
9. ANEXOS.....	127

TABELAS, FIGURAS E ANEXOS

Figura 1	A. Partícula viral do HIV-1 identificando suas proteínas, glicoproteínas e enzimas; B. Genoma completo do HIV-1 com as subdivisões de cada gene.....	2
Figura 2	Infecção da célula alvo pelo HIV-1, e ciclo replicativo incluindo a entrada viral, transcrição reversa, integração de DNA viral, montagem de vírions e liberação das partículas virais.....	6
Figura 3	Análise filogenética entre HIV-1, SIVcpz e SIVgor.	8
Figura 4	Ciclo replicativo ilustrando a formação de vírions recombinantes....	16
Tabela 1	Resumo das estruturas dos mosaicos das Formas Recombinantes Circulantes (CRFs) atualmente descritas mundialmente (Los Alamos, julho 2017).	18
Anexos 1	<i>Pareceres do Comitê de Ética- HDT</i>	127
Anexos 2	<i>Pareceres do Comitê de Ética- HC</i>	129
Anexo 3	<i>Aprovação do Projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Júlio Muller - Universidade Federal de Mato Grosso</i>	131
Anexo 4	<i>Parecer do Comitê de Ética- MA e PI</i>	132
Anexo 5	<i>Termo de Consentimento Livre e Esclarecido</i>	133
Anexo 6	<i>Molecular characteristics of HIV-1 infection among prisoners from</i>	

	<i>Central Western Brasil (Artigo Publicado em 2011)</i>	136
Anexo 7	<i>Increasing heterosexual transmission of HIV-1 subtype C in Inland Central Western Brazil (Artigo Publicado em 2013)</i>	137
Anexo 8	<i>Polymorphisms in the HIV-1 gp41 env gene, natural resistance to enfuvirtide (T-20) and pol resistance among pregnant Brazilian women (Artigo publicado em 2014)</i>	138
Anexo 9	<i>Low rate of transmitted drug resistance may indicate low access to antiretroviral treatment in Maranhão State, Northeast Brazil (Artigo publicado em 2015)</i>	139
Anexo 10	<i>HIV-1 transmittes drug resistance and genetic diversity among patients from Piauí State, Northeast Brazil (Artigo publicado em 2015)</i>	140
Anexo 11	<i>Incident and long-term HIV-1 infection among pregnant women in Brazil : Transmitted drug resistance and Mother-to-child transmission (Artigo publicado em 2016)</i>	141
Anexo 12	<i>HIV-1 infection and pregnancy in young women in Brazil : socioeconomic and drug resistance profiles in a cross-sectional study (Artigo publicado em 2016)</i>	142

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

Aids	Síndrome da imunodeficiência adquirida (<i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i>)
ARV	Antirretroviral
CCR2	Receptor C-C de quimiocinas do tipo 2
CCR3	Receptor C-C de quimiocinas do tipo 3
CCR5	Receptor C-C de quimiocinas do tipo 5
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CEPMHA	Comitê de Ética em Pesquisa Médica Humana e Animal
CPR	<i>Calibrated Population Resistance</i>
CRF	Forma recombinante circulante (<i>Circulating Recombinant Form</i>)
CXCR4	Receptor C-X-C de quimiocinas do tipo 4
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNAc	DNA complementar
dNTPs	desoxirribonucleotídeos fosfatados
env	gene que codifica o envelope
gag	Gene - Antígeno de grupo específico (<i>Group specific antigen</i>)
GO	Goiás
gp	Glicoproteína
HAART	Terapia antirretroviral de alta potência (<i>Highly active antiretroviral therapy</i>)
HC	Hospital das Clínicas
HDT	Hospital de Doenças Tropicais
HIV-1	Vírus da imunodeficiência humana do tipo 1 (<i>Human Immunodeficiency Virus type 1</i>)
HIV-2	Vírus da imunodeficiência humana do tipo 2 (<i>Human Immunodeficiency Virus type 2</i>)
IPTSP	Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública
Kb	Kilobase
LTR	Repetições terminais longas (<i>Long terminal repeats</i>)
MA	Maranhão
MTCT	transmissão materno infantil (<i>Mother-to-child-transmission</i>)
nef	Gene que codifica a proteína nef (fator negativo)
NK	Célula matadora natural (<i>Natural Killer</i>)
nm	Nanômetro

OMS/WHO	Organização Mundial de Saúde/World Health Organization
Pb	Pares de base
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PI	Piauí
PIC	Complexo de pré-integração (<i>Pre-integration complex</i>)
<i>pol</i>	Gene Polimerase
PR	Protease
<i>rev</i>	Gene regulador da expressão viral
RNA	Ácido ribonucleico
RNA_m	Ácido ribonucleico mensageiro
SIV	Vírus da imunodeficiência símia
SIV_{cpz}	Vírus da imunodeficiência símia isolado de chimpanzés
SIV_{gor}	Vírus da imunodeficiência símia isolado de gorilas
<i>tat</i>	Gene de transativação
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
T_{MRCA}	Tempo do ancestral comum mais recente
TR/RT	Transcriptase reversa/ <i>Reverse transcriptase</i>
TV	Transmissão vertical
UESPI	Universidade Estadual do Piauí
UFG	Universidade Federal de Goiás
UFMT	Universidade Federal do Mato Grosso
UFMS	Universidade Federal do Mato Grosso do Sul
UNAIDS	Programa Conjunto das Nações Unidas sobre HIV/Aids (Joint United Nations Programme on HIV/AIDS)
URF	Forma recombinante única (<i>Unique Recombinant Form</i>)
vif	Fator de infectividade viral
vpr	Proteína viral R
vpu	Proteína viral U

RESUMO

Introdução e Objetivos: Uma das características marcantes do HIV-1 é o seu extenso polimorfismo genético baseado no qual pode ser classificado em quatro grupos (M, N, O e P). O grupo pandêmico M pode ser dividido em nove subtipos (A-D, F-H, J, K), seis sub-subtipos (A1-A4, F1-F2), dezenas de formas recombinantes circulantes (CRFs) e incontáveis formas recombinantes únicas (URFs). A epidemiologia molecular do HIV-1 no Brasil é complexa e dinâmica e é caracterizada pela cocirculação dos subtipos B, F1 e C e de recombinantes BF e BC. Estudos anteriores sobre sequências do gene *pol* de isolados de HIV-1 de seis estados Brasileiros (Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Tocantins, Maranhão e Piauí) indicaram grande variabilidade de formas recombinantes intersubtipos BF, BC, BFC e CF. Esta Tese apresenta caracterização molecular destes recombinantes com reclassificação dos isolados em *pol*, genoma completo/quase completo/parcial de formas recombinantes representativas. Os resultados desta tese estão apresentados na forma de artigos, sendo que um já está publicado e dois estão na forma de manuscritos a serem submetidos. **Métodos:** O DNA proviral foi extraído do sangue total e quatro fragmentos sobrepostos que compõem o genoma completo do HIV-1 foram amplificados por “nested”-PCR. As sequências geradas foram alinhadas (BioEdit 7.2.0) e as análises filogenéticas realizadas (MEGA 6, Neighbor-Joining, Kimura 2 parâmetros). Os perfis de recombinação foram identificados por análises de pontos, árvores filogenéticas de fragmentos e análise de bootscan (SIMPLLOT v3.5.1). O tempo do ancestral comum mais recente (time of the most recent common ancestor, T_{MRC}) dos clados HIV-1 BF1 foi estimado (Bayesian Markov Chain Monte Carlo, BEAST v1.8). **Resultados:** Artigo 1; PlosOne: Dentre 828 isolados de HIV-1 dos seis estados Brasileiros, as análises filogenéticas identificaram, 87 isolados recombinantes BF em *pol*: 48% (42/87) se agruparam em cinco clusters distintos (Cluster #1-5), 21% (18/87) eram CRF_BF-like e 31% (27/87) foram classificadas como URFs_BF. Dentre os 22 isolados BF do maior cluster (#5), obtivemos seis genomas completos, um genoma quase completo e quatro genomas parciais. Estes 11 isolados, obtidos de pacientes sem vínculo epidemiológico, compartilharam perfil de recombinação idêntico em toda a extensão do seu genoma, permitindo a caracterização de uma nova CRF. Esse recombinante denominado CRF90_BF1 está circulando nos estados de Goiás, Mato Grosso e Tocantins. Dentre os

vinte isolados BF que compunham os outros quatro clusters BF obtivemos: três genomas completos, quatro genomas quase completos e cinco genomas parciais. As análises destas sequências permitiram a caracterização de três URFs_BF (Clusters #1, #2 e #3), circulantes na região Centro-Oeste. Estimativas sugerem que o ancestral comum mais recente destes recombinantes BF/ T_{MRCA} data o início da década de 90. Análises de BLAST permitiram a identificação de outras sequências que compartilham o mesmo padrão de recombinação de pacientes das regiões Norte e Sul, sugerindo que estes recombinantes podem representar potenciais CRFs, ainda não descritas. Identificamos também taxa moderada de isolados semelhantes a CRF28/CRF29_BF (16,1%, 14/87) em Goiás, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul. Manuscritos 1 e 2: Foram também detectados recombinantes BC, BFC e CF (2,9%; 24/828): BC (2,3%, 19/828), BFC (0,4%, 3/828) e CF (0,2%, 2/828). Dentre estes 24 isolados, 19 se agruparam em seis clusters enquanto cinco (BRGO4156, BRMT2509, BRMT3086, BRMS43 e BRPI34) não se agruparam em nenhum cluster. Seis clusters foram identificados (Clusters #1-6): dois apresentavam sete isolados com perfil de recombinação semelhante a CRFs_BC já descritas (29,2%, 7/24). O Cluster #4/CRF31_BC-like continha cinco isolados (20,8%) e dois isolados eram do Cluster #5/CRF60_BC-like (8,3%). A maioria dos pacientes infectados com isolados BC, BFC e CF era virgem de tratamento antirretroviral (23/24) e 21,7% (5/23) apresentaram mutações associadas à resistência transmitida a drogas. **Conclusões:** Nossas análises em isolados das regiões Centro-Oeste, Norte e Nordeste do Brasil permitiram a caracterização de uma nova CRF_BF (CRF90_BF1) e de URFs_BF e BC diferentes das descritas, além da detecção de isolados semelhantes à CRFs já descritas (CRF28/29_BF-like, CRF31_BC-like, CRF60_BC-like). Estes resultados indicam que a coinfeção/superinfecção e a recombinação entre subtipos diferentes podem ser mais frequentes que reportado. Além disso, nossos resultados destacam a geração contínua de recombinantes na epidemia Brasileira que se desenvolve em centros urbanos distantes do epicentro da epidemia. Estudos de vigilância incluindo genoma completo/quase completo em amostragem abrangente são necessários para identificar o surgimento e disseminação de novos recombinantes e a implicação destes na transmissão e controle do HIV-1 no país.

Palavras-chave: HIV-1; Formas recombinantes; Genoma completo.

ABSTRACT

Background and objectives: One of the most striking features of HIV-1 is its extensive genetic polymorphism which allows its classification into four groups (M, N, O and P). The pandemic group M can be classified into nine subtypes (A-D, F-H, J, K), six sub-subtypes (A1-A4, F1-F2), dozens of circulating recombinant forms (CRFs) and countless unique recombinant forms. The molecular epidemiology of HIV-1 in Brazil is complex and dynamic and has been characterized by the cocirculation of subtypes B, F1 and C and BF, BC, BFC and CF recombinants. Previous studies on *pol* sequences of HIV-1 isolates from six Brazilian States (Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Tocantins, Maranhão e Piauí) have shown great variability of BF, BC and FC recombinant viruses. This thesis describes the molecular characterization of these mosaic genomes including reclassification in *pol* and generation of full length/near full length/ partial genomes of representative isolates. The results of this thesis are presented as articles, one of them is already published and two other are presented as manuscripts to be submitted. **Methods:** Proviral DNA was extracted from whole blood and four overlapping fragments that compose HIV-1 whole genome were amplified by “nested”-PCR. The generated sequences were aligned (BioEdit 7.2.0) and phylogenetic analysis performed (MEGA 6, Neighbor-Joining, Kimura 2 parameters). The recombination profiles were identified by point analysis, phylogenetic analysis of fragments, and Bootscan analysis (SIMPLLOT v3.5.1). The time of the most recent common ancestor (T_{MRCA}) of HIV-1 BF clades was estimated (Bayesian Markov Chain Monte Carlo, BEAST v1.8). **Results:** Article 1/Plos One: Among 828 HIV-1 isolates from six Brazilian States, phylogenetic analysis of *pol* identified 87 BF recombinant isolates: 48% (42/87) grouped into five different clusters (Cluster #1-5), 21% (18/87) was CRF_BF-like and 31% (27/87) were classified as URFs_BF. Among 22 isolates that composed the largest BF cluster (#5), we have obtained six full length genomes, one near full length genome and four partial genomes. These 11 isolates, obtained from patients that did not have any epidemiological link shared identical recombination profile in their genomes, allowing the description of a new CRF. This recombinant named CRF90_BF1 is circulating in Goiás, Mato Grosso e Tocantins states. Among 20 BF isolates from the other four clusters we have obtained: three full length genomes, four near full length genomes and five partial genomes. Analysis of these sequences characterized three URFs (Clusters #1, #2 e #3), circulating in the Central West region.

The estimated T_{MRC} for these BF clades was the beginning of the 90's. BLAST search analysis identified other sequences sharing the same recombination pattern among isolates from the North and South regions, suggesting that they may represent other potential, unidentified CRFs. A moderate rate of CRF28/CRF29_BF-like isolates was seen (16.1%, 14/87) in Goiás, Mato Grosso and Mato Grosso do Sul states. Manuscripts 1 and 2: BC and BF recombinant isolates were also detected (2.9%; 24/828): BC (2.3%, 19/828), BFC (0.4%, 3/828) and CF (0.2%, 2/828). Among these 24 isolates, 19 grouped into six clusters while five (BRGO4156, BRMT2509, BRMT3086, BRMS43, BRPI34) did not cluster. Six clusters were identified (Clusters #1-6): two clusters contained 7 isolates with recombination profiles similar to already identified CRFs_BC (29.2%, 7/24). Cluster #4/CRF31_BC-like comprised 5 isolates (20.8%) and two isolates were Cluster #5/CRF60_BC-like (8.3%). Most patients infected with BC and FC isolates was antiretroviral naïve and (23/24) and 21.7% (5/23) had mutations associated with transmitted drug resistance. **Conclusions:** Our analyses of isolates from Central West, North and Northeast regions allowed the characterization of the new CRF90_BF1 and different URFs_BF and BC from already described ones. Also isolates sharing recombination profiles with already described ones were also observed (CRF28/29_BF-like, CRF31_BC-like, CRF60_BC-like). Altogether our results indicate that coinfection/ superinfection and intersubtype recombination may be more prevalent than reported. Also, our results indicate the continuing generation of recombinants in the Brazilian epidemic that is taking place in urban centers located away from the epicenter of the epidemic. Continued surveillance studies including full/near full genomes in larger sample sizes are necessary to identify emerging and disseminating recombinants and their implication in the transmission and control of HIV-1 in Brazil.

Key words: HIV-1; Recombinants forms; Full length genomes

APRESENTAÇÃO

O curso de Biomedicina me apresentou esse mundo tão extenso que é o ambiente dentro do laboratório. Sou formada pela Pontifícia Universidade Católica de Goiás (PUC/GO) em Ciências Biológicas, modalidade médica, desde 1995. Em 1993, fiz um estágio no laboratório da Organização de Saúde do Estado de Goiás (antiga OSEGO), onde fui treinada para realizar exame de baciloscopia: eu coletava linfa no lóbulo auricular e no cotovelo de pacientes com suspeita de Hanseníase, preparava e corava as lâminas. Ao término do meu estágio fui convidada para substituir, por seis meses, uma funcionária na sessão de parasitologia de um laboratório da iniciativa privada. Em 1994, fiz um concurso e fui aprovada para o cargo de técnico de laboratório no Hospital das Clínicas. Ao me formar em 1995, comecei trabalhar em laboratório particular (carga horária: 6 horas) e, no final de 1996 fui chamada para tomar posse da vaga de técnico de laboratório no Hospital das Clínicas. Entretanto, não tomei posse do cargo e abri mão da vaga.

Trabalhei dez anos na iniciativa privada, até que em 2005, resolvi concorrer novamente ao concurso de técnico de laboratório no Hospital das Clínicas. O concurso oferecia quatro vagas e eu fui aprovada em quarto lugar. A quarta vaga foi disponibilizada ao IPTSP/UFG, logo, eu comecei a trabalhar com a professora Maria de Fátima Costa Alves e a professora Mariane Martins A Stefani. Em 2007, fui convidada a participar do Estudo de Prevalência de Doenças Sexualmente Transmissíveis (DST) em adolescentes e jovens do sexo feminino do Estado de Goiás, sob a coordenação da Prof.^a Maria de Fátima Costa Alves. Neste projeto fui responsável pelas coletas de sangue e plasma na cidade de Inhumas/Goiás, bem como pela realização dos exames de VDRL e FTA-ABS, que foram realizados no IPTSP.

No mesmo ano, comecei curso de especialização *Latu Sensu* em “Tratamento e Disposição Final de Resíduos Sólidos e Líquidos” na Escola de Engenharia Civil/UFG. Ao final de 2009, defendi minha monografia, intitulada: “Proposta de Controle e Tratamento de Resíduos Líquidos dos Laboratórios da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás”. Os resultados deste trabalho foram apresentados no VI Congresso de Pesquisa, Ensino e Extensão-CONPEEX em 2009:

REIS, M.N.G., SANTIAGO, M.F. Proposta de Controle e Tratamento de Resíduos no Estado Líquido dos Laboratórios da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás. Goiânia, 2009.

Os resultados referentes ao Estudo de Prevalência de Doenças Sexualmente Transmissíveis (DST) em adolescentes e jovens do sexo feminino do Estado de Goiás foram apresentados em Congresso internacional (14th International Congress on Infectious Diseases em 2010):

GARCIA, F.L.B., TURCHI, M.D., GUIMARÃES, E.M.B., CARVALHO, N.R., RIBEIRO, C.T., **REIS, M.N.G.,** ALVES, M.F.C. Syphilis among young woman: a population based survey in Central Brazil. Flórida, 2010.

Este estudo resultou em publicação científica na International Journal of Infectious Diseases:

LIMA, Y.A.R., TURCHI, M.D., FONSECA, Z.C., GARCIA, F.L.B., CARDOSO, F.A.B., **REIS, M.N.G.,** GUIMARÃES, E.M.B., ALVES, R.R.F., CARVALHO, N.R., ALVES, M.F.C. Sexually transmitted bacterial infections among young women in Central Western Brazil. International Journal of Infectious Diseases, v. 25: p. e16–e21, 2014.

Trabalhando no “Laboratório de Imunologia da AIDS e da Hanseníase/LIAH” coordenado pela professora Mariane Martins A Stefani, tive a oportunidade de participar de diversos projetos de pesquisa referentes ao HIV-1. Em 2009, começamos um projeto em HIV-1 entre os detentos da Agência Prisional (CEPAIGO) localizado no município de Aparecida de Goiânia em parceria com o HDT (Hospital de Doenças Tropicais). Neste projeto participei de cinco visitas ao CEPAIGO quando o HDT suspendeu os trabalhos de assistência nesse local. Neste projeto coletamos amostras de nove detentos e os resultados juntamente com resultados de detentos de Campo Grande/MS, geraram artigo científico publicado no periódico Aids Research and Human Retroviruses:

CARDOSO, L.P.V., da SILVEIRA, A.A., FRANCISCO, R.B.L., **REIS, M.N.G.,** STEFANI, M.M.A. Molecular Characteristics of HIV Type 1 Infection Among Prisoners from Central Western Brazil. AIDS RESEARCH AND HUMAN RETROVIRUSES, v. 27, p. 1349-53, 2011.

Em 2011, ingressei no mestrado no Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública (PPMTSP), sob orientação da Prof.^a Dr.^a Mariane Martins de Araújo Stefani e coorientação da Prof.^a Dr.^a Ludimila de Paula Vaz Cardoso. O título da dissertação era Resistência Natural ao T-20 em Gestantes Infctadas pelo HIV-1 do Estado de Goiás. Os resultados dessa dissertação foram publicados no periódico Journal of Medical Virology:

REIS, M.N.G., ALCÂNTARA, K.C., CARDOSO, L.P.V., STEFANI, M.M.A. . Polymorphisms in the HIV-1 gp41 *env* gene, natural resistance to enfuvirtide (T-20) and *pol* resistance among pregnant Brazilian women. Journal of Medical Virology (Print), v. 86, p. 8-17, 2013.

Em 2013, iniciei o doutorado no PPMTSP, sob orientação da Prof.^a Dr.^a Mariane Martins de Araújo Stefani e coorientação da Dr.^a Monick Lindenmeyer Guimarães, FIOCRUS/RJ. O tema do meu projeto foi: “Genoma completo de formas recombinantes BF1 e BC do HIV-1 circulantes nos estados de Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Tocantins, Maranhão e Piauí”. Em agosto de 2013 fiz um treinamento no Laboratório de AIDS e Imunologia Molecular na FIOCRUZ/RJ referente aos procedimentos laboratoriais envolvidos no sequenciamento do genoma completo do HIV-1. Alguns projetos foram desenvolvidos durante esses anos de doutoramento dentro do LIAH, rendendo outras publicações:

LIMA, Y.A.R., CARDOSO, L.P.V., **REIS, M.N.G.,** STEFANI, M.M.A. Incident and long term HIV-1 infection among pregnant women in Brazil: Transmitted drug resistance and mother-to-child transmission. Journal of Medical Virology, v.88, n. 11, p. 1936-43, 2016.

LIMA, Y.A.R., **REIS, M.N.G.,** CARDOSO, L.P.V., STEFANI, M.M.A. HIV-1 infection and pregnancy in young women in Brazil: socioeconomic and drug resistance profiles in a cross-sectional study: Table 1. BMJ Open, v. 6, p. e010837, 2016.

MOURA, M.E.S., **REIS, M.N.G.,** LIMA, Y.A.R., EULÁLIO, K.D., CARDOSO, L.P.V., STEFANI, M.M.A. HIV-1 transmitted drug resistance and genetic diversity among patients from Piauí State, Northeast Brazil. Journal of Medical Virology, 87(5):798-806, 2015.

MOURA, M.E.S., **REIS, M.N.G.**, LIMA, Y.A.R., EULÁLIO, K.D., CARDOSO, L.P.V., STEFANI, M.M.A. Low Rate of Transmitted Drug Resistance May Indicate Low Access to Antiretroviral Treatment in Maranhão State, Northeast Brazil. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 31(2):250-4.2014.

ALCÂNTARA, K.C., **REIS, M.N.G.**, CARDOSO, L.P.V., BELLO, G., STEFANI, M.M.A. Increasing heterosexual transmission of HIV-1 subtype C in Inland Central western Brazil. *Journal of Medical Virology*, v. 85, p. 396-404, 2013.

Outras parcerias foram desenvolvidas durante esses anos: com a prof.^a Sheila Teles/FEN sequenciando amostras HIV-1⁺ em profissionais do sexo, com a prof.^a Megmar Carneiro/IPTSP, sequenciando amostras HIV-1⁺ de usuários de Crack, com a prof.^a Keila Alcântara/FF, no projeto de pesquisa: “Doenças sexualmente transmissíveis, HIV-1, hepatites B e C e o uso de álcool e drogas de abuso em caminhoneiros que trafegam pela BR153 passando pelo Estado de Goiás no Centro-Oeste Brasileiro”.

Colaboramos com a professora Ludimila Cardoso no sequenciamento de alguns isolados de HIV-1 gerando resultados que foram apresentados em três eventos:

1. no 13º Congresso de Pesquisa, Ensino e Extensão da UFG:

SILVA, P.R., **REIS, M.N.G.**, STEFANI, M.M.A., CARDOSO, L.P.V. Avaliação do curso da infecção pelo HIV em pacientes com falha terapêutica sob terapia orientada por genotipagem para resistência no município de Jataí/Goiás. 2016.

2. no XIII Seminário de Patologia Tropical e Saúde Pública/VI Semana de Biotecnologia:

DIAS, R.F.G., BENTO, L.O., TAVARES, C., **REIS, M.N.G.**, FILHO, H.R., STEFANI, M.M.A., MORELI, M.L., CARDOSO, L.P.V. Perfil Clínico-Epidemiológico Da Infecção pelo HIV no período de 2005 a 2015 em Pacientes do Sudoeste Goiano Brasileiro e Resistência à Terapia Antirretroviral. 2015.

3. no XIX Congresso Brasileiro de Infectologia:

DIAS, R.F.G., BENTO, L.O., **REIS, M.N.G.**, SILVA, P.R., SA, P.P.D., FILHO, H.R., STEFANI, M.M.A., MORELI, M.L., CARDOSO, L.P.V. RESISTÊNCIA ÀS

DROGAS ANTIRRETROVIRAIS E DIVERSIDADE GENÉTICA EM PACIENTES
HIV+/AIDS DO SUDOESTE GOIANO. 2015.

ORGANIZAÇÃO DA TESE

Esta Tese será apresentada no formato de “Modalidade Artigos científicos”, atendendo a Norma CPGMTSP No 04/2009 do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás.

Esta Tese se trata da caracterização das formas recombinantes do HIV-1 circulando em seis estados Brasileiros e é composta pelos seguintes itens:

- Introdução/Revisão da literatura;
- Justificativa;
- Objetivos;
- Artigo I: O primeiro artigo intitulado: **Characterization of HIV-1 CRF90_BF1 and putative novel CRFs_BF1 in Central West, North and Northeast Brazilian regions**, foi realizado em colaboração com Dra Monick Lindenmeyer Guimarães e Dr Gonzalo Bello do Laboratório de AIDS e Imunologia Molecular na FIOCRUZ/RJ. Esse artigo foi publicado na PLOS One. 2017 Jun 19;12(6):e0178578;
- O Manuscrito I intitulado: **Characterization of three new URFs_BF identified in Brazil** está em fase de finalização para posterior submissão para publicação;
- O manuscrito II intitulado: **HIV-1 subtype C and F1 infections and extensive variability of BC, BFC and CF mosaics in Central West, North and Northeast Brazil**, realizado em colaboração com Dra Monick Lindenmeyer Guimarães do Laboratório de AIDS e Imunologia Molecular na FIOCRUZ/RJ está em fase de conclusão para posterior submissão para publicação;
- Discussão geral;
- Conclusões
- Referências
- Anexos.

1. INTRODUÇÃO/REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Vírus da Imunodeficiência Humana - Morfologia Viral e organização genômica

O Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV, do inglês *Human Immunodeficiency Virus*) retrovírus da família *Retroviridae* do gênero *Lentivirus*, é o responsável pela síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA/AIDS) (BARRE-SINOUSSE *et al.*, 1983; BARRE-SINOUSSE, 1996). Segundo as análises filogenéticas, existem dois tipos de HIV: o HIV-1 e o HIV-2, sendo que o HIV-1 é o responsável pela pandemia global (HEMELAAR, 2012).

O vírion, partícula viral infecciosa do HIV-1 tem formato esférico de 100 a 120 nanômetros (nm) de diâmetro, apresenta um genoma diplóide de duas moléculas de RNA de fita simples, polaridade positiva, cujo comprimento é de 9719 kb. O genoma do HIV-1 apresenta nove genes que codificam quinze proteínas. Este genoma contém três genes estruturais: *gag*, *pol* e *env*, dois genes reguladores: *tat* e *rev*, quatro genes acessórios: *nef*, *vif*, *vpr* e *vpu* e duas regiões de repetições terminais longas (LTRs) (BARRE-SINOUSSE, 1996; WYATT e SODROSKI, 1998; LI *et al.*, 2015) (Figura 1).

A estrutura de uma partícula viral madura do HIV-1 é composta por um envelope viral constituído de bicamada lipídica derivada da membrana da célula hospedeira, na qual estão inseridas aproximadamente 72 espículas. Cada espícula possui forma triangular e é composta pela glicoproteína transmembrana (gp41) que serve de âncora para a glicoproteína de superfície (gp120). Envolvida pelo envelope encontra-se a proteína matriz p17, internamente a ela está localizado o capsídeo viral composto pela proteína principal do capsídeo, p24. O nucleocapsídeo que envolve o genoma do HIV-1 é composto pelas proteínas p7/p9 (FERGUSON *et al.*, 2002; MAILLER *et al.*, 2016) (Figura 1).

Duas repetições terminais longas idênticas (LTRs, do inglês *Long terminal repeats*) localizam-se nas extremidades 5' e 3' do genoma viral. As LTRs dividem-se em três porções: U3, R e U5 e auxiliam na integração do genoma viral ao genoma da célula hospedeira, na expressão dos genes do vírus e na sua replicação (LU *et al.*, 2011). A poliproteína gag, que possui 55 kD, é codificada pelo gene *gag* e é clivada em cinco sítios específicos pela protease viral durante a maturação do vírion. Neste processo são geradas novas proteínas que constituirão a proteína matriz (p17), a proteína do capsídeo

(p24), do nucleocapsídeo (p7) e as proteínas p1, p2 e p6 (TURNER e SUMMERS, 1999; BRIGGS e KRAUSSLICH, 2011). A proteína matriz é o componente N-terminal da poliproteína gag, que está internamente associada à membrana por meio da inserção de três grupos mirísticos dentro da bicamada lipídica e também se associa com a extremidade citoplasmática da gp41 (FRANKEL e YOUNG, 1998; SWANSON e MALIM, 2008).

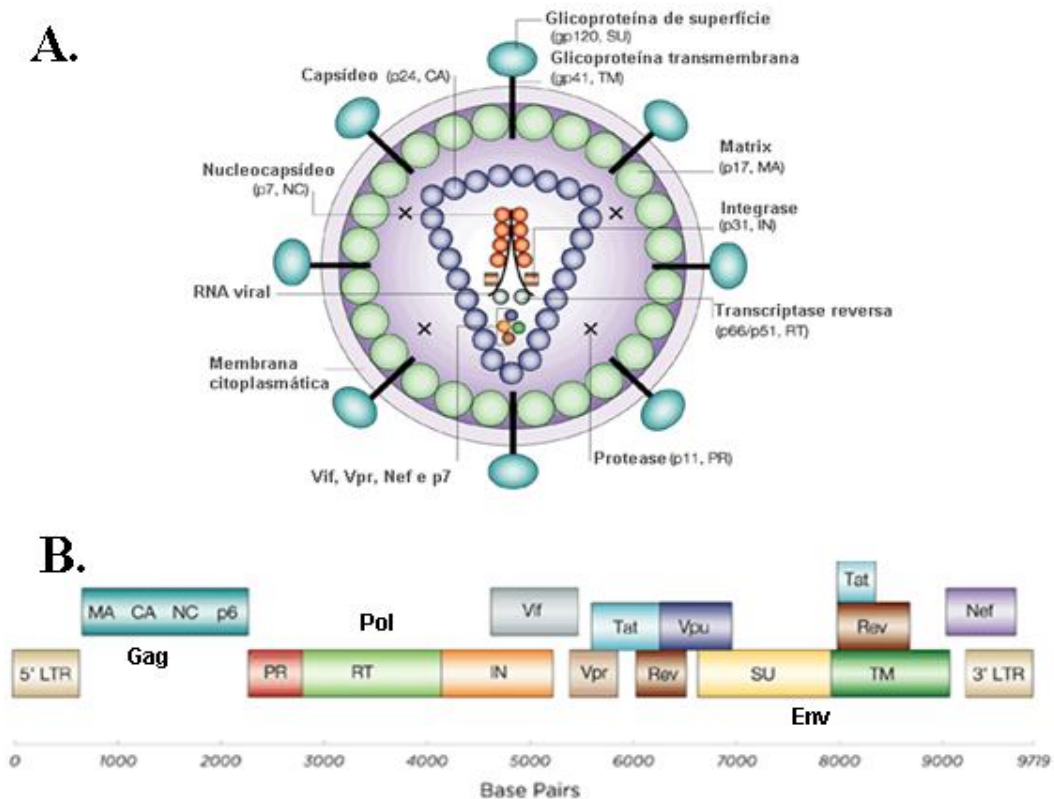


Figura 1: A. Partícula viral do HIV-1 identificando suas proteínas, glicoproteínas e enzimas; B. Genoma completo do HIV-1 detalhando os seus nove genes.

(Adaptado de Robinson, 2002)

O capsídeo apresenta-se sob a forma de cone e representa o segundo componente da poliproteína e, circunda o nucleocapsídeo. O nucleocapsídeo se associa intimamente com o genoma viral compactando-o e protegendo-o contra as nucleases, além de transportá-lo para dentro do vírion a ser montado. O peptídeo p6 é composto por 51 aminoácidos da porção C-terminal de gag e tem a função de incorporar a

proteína vpr no vírion durante a montagem do mesmo (FRANKEL e YOUNG, 1998; SAKURAGI, 2011).

As enzimas virais codificadas pelo gene *pol*, protease (p10), transcriptase reversa (p51) e a integrase (p32) são cruciais para o ciclo replicativo. A protease viral (p10) sofre auto-ativação, começando a atuar sobre as proteínas do capsídeo e as enzimas ainda não clivadas. A protease viral é responsável pela clivagem da poliproteína gag-pol no meio extracelular quando o vírus imaturo é liberado da célula hospedeira. A transcriptase reversa, composta pela p66 e p51, possui duas atividades enzimáticas: a DNA polimerase que copia a fita de DNA ou RNA e a RNase H que cliva o RNA quando o mesmo forma um híbrido com o DNA complementar (DNAc). Desta maneira, a transcriptase reversa tem a função de converter a fita simples de RNA viral em uma fita dupla de DNA viral. O DNA viral se liga ao vpr, à integrase, à proteína matriz e a outros elementos celulares, formando o complexo de pré-integração (PIC). O PIC é conduzido ao núcleo, atravessa o poro nuclear por difusão passiva, na qual a integrase cliva o DNA da célula hospedeira e o DNA viral integra-se na terminação 5' do DNA da célula hospedeira com ajuda de enzimas da própria célula gerando um DNA proviral estável (FRANKEL e YOUNG, 1998; SARAFIANOS *et al.*, 2009).

A proteína precursora gp160 é codificada pelo gene *env* e é produzida no Retículo Endoplasmático e após clivagem no Complexo de Golgi origina a gp120 e a gp41. A gp120 possui cinco regiões variáveis e cinco regiões constantes e consiste de três domínios que ficam ancorados em três domínios da gp41. A gp120 interage com as moléculas CD4 das células alvo, que são consideradas o receptor primário do HIV-1 enquanto os principais receptores secundários são coreceptores para quimiocinas (BERGER *et al.*, 1999).

As proteínas reguladoras e acessórias do vírus HIV-1 possuem diferentes funções na replicação viral. As proteínas tat e rev são classificadas como proteínas reguladoras. A proteína tat codificada pelo gene *tat* é trans-ativadora da transcrição do genoma viral. Esta proteína contém aproximadamente 14 kD e está localizada na região U3 da 5'LTR. Em conjunto com outras proteínas virais e celulares, a tat auxilia a RNA polimerase II no momento da transcrição do DNA proviral integrado ao cromossomo da célula hospedeira, aumentando a taxa de iniciação da transcrição e estabilizando o alongamento da molécula de RNA mensageiro (RNAm). A proteína tat é considerada essencial para a replicação viral e pode aumentar a produção de RNAm viral em

aproximadamente 100 vezes (FRANKEL e YOUNG, 1998). A proteína rev é uma fosfoproteína de 18 kD que participa do transporte do RNAm do núcleo para o citoplasma (SEELAMGARI *et al.*, 2004).

As proteínas acessórias são: nef, vif, vpu e vpr. A proteína nef é uma proteína de 27 kD, apresenta 206 aminoácidos na sua parte N-terminal mirística. A proteína nef apresenta duas funções: aumentar a replicação viral e reduzir a quantidade de receptores CD4 por endocitose. Logo após, a infecção viral nef é expressa em altas concentrações (SWANSON e MALIM, 2008). A proteína vif (fator de infectividade viral) é uma proteína de 23 kD que se localiza no citoplasma e é capaz de induzir a produção de vírions altamente infecciosos. Na ausência da proteína vif, os vírions apresentam defeitos na sua infectividade sendo chamados de “semipermissivos” ou “não permissivos” (SEELAMGARI *et al.*, 2004; ENGELMAN e CHEREPANOV, 2012).

A Vpu é a proteína viral U (17 kD) que é responsável por formar canais iônicos nas bicamadas lipídicas aumentando sua permeabilidade a várias moléculas. A vpu tem as funções de induzir a degradação de CD4 junto com nef, aumentar a liberação dos vírions da célula infectada antagonizando o fator de restrição intracelular humano teterina e juntamente com tat, vpr contribui para o processo de apoptose (SEELAMGARI *et al.*, 2004; BELL *et al.*, 2007). A proteína vpr composta por 99 aminoácidos apresenta inúmeras funções no ciclo replicativo e na evolução da infecção do HIV no hospedeiro. A proteína Vpr se liga ao DNA proviral juntamente com a integrase e a proteína matriz conduzindo estas moléculas ao núcleo onde o DNA proviral será incorporado ao DNA da célula infectada. A proteína Vpr atua na replicação viral, auxiliando na transcrição juntamente com a tat e na patogênese no início da doença. Além disso, vírus mutantes com defeitos na proteína vpr retardam a evolução da doença (SEELAMGARI *et al.*, 2004).

1.2 Ciclo Replicativo do HIV-1

A interação entre o vírus e a célula hospedeira ocorre 10 minutos após a inoculação do HIV-1 no hospedeiro (Figura 2). Ao infectar a célula alvo, o HIV-1, estabelece ligação entre a gp120 viral com o receptor primário CD4 da célula hospedeira (linfócitos T auxiliares CD4⁺/LT CD4⁺, macrófagos e células dendríticas), e em seguida, a gp120 sofre uma mudança conformacional expondo sítios que facilitam sua ligação com os receptores secundários ou correceptores dentre eles o CCR2, CCR3,

CCR5 e CXCR4. Os correceptores CCR5, expresso pelos macrófagos e células dendríticas e o CXCR4, expresso pelos LT CD4⁺, são os mais utilizados pelo HIV-1 (CONNOR *et al.*, 1997; GOTO *et al.*, 1998). A escolha do correceptor celular é determinada pelo vírus, sendo este mecanismo denominado tropismo viral. Os vírus chamados de “R5-trópicos” se ligam ao correceptor CCR5, enquanto os denominados “X4-trópicos” ligam-se ao correceptor CXCR4 enquanto os denominados vírus “duo-trópicos” ou R5X4 interagem com os dois correceptores. No início da infecção, a maior parte da população viral é constituída de “R5-trópicos” e com o passar do tempo, esses vírus diferenciam-se e passam a usar também os correceptores CXCR4 tornando-se “X4-trópicos”. Essa alteração no tropismo viral em geral se relaciona com a progressão da doença. Estudos indicam que os vírus “R5-trópicos” são responsáveis pela maioria das infecções (90% das infecções em todo o mundo) (BERGER *et al.*, 1998; SHATTOCK e ROSENBERG, 2012).

Após a interação da gp120 viral aos correceptores celulares ocorre mudança conformacional com exposição da gp 41. Os peptídeos de fusão da gp41 que são ricos em glicina são inseridos na membrana da célula hospedeira, aproximando as membranas viral e celular, ocorrendo então a fusão das mesmas. Este processo resulta na formação de um poro de fusão pelo qual o capsídeo do HIV-1 é liberado no citoplasma da célula hospedeira (WILEN *et al.*, 2012).

Assim que o capsídeo viral é liberado no citoplasma da célula hospedeira, ele se desfaz liberando as fitas de RNA viral e inicia-se o processo de retrotranscrição das fitas do RNA viral em DNAc promovida pela enzima transcriptase reversa. Em seguida, o DNAc duplicado liga-se a outras proteínas formando o PIC, este é conduzido ao núcleo onde será integrado ao DNA da célula infectada, mediante ação da integrase e a partir desse momento o DNA viral pode ser denominado também de “provírus” (HU *et al.*, 1990; BARRE-SINOUSSE, 1996) (Figura 2).

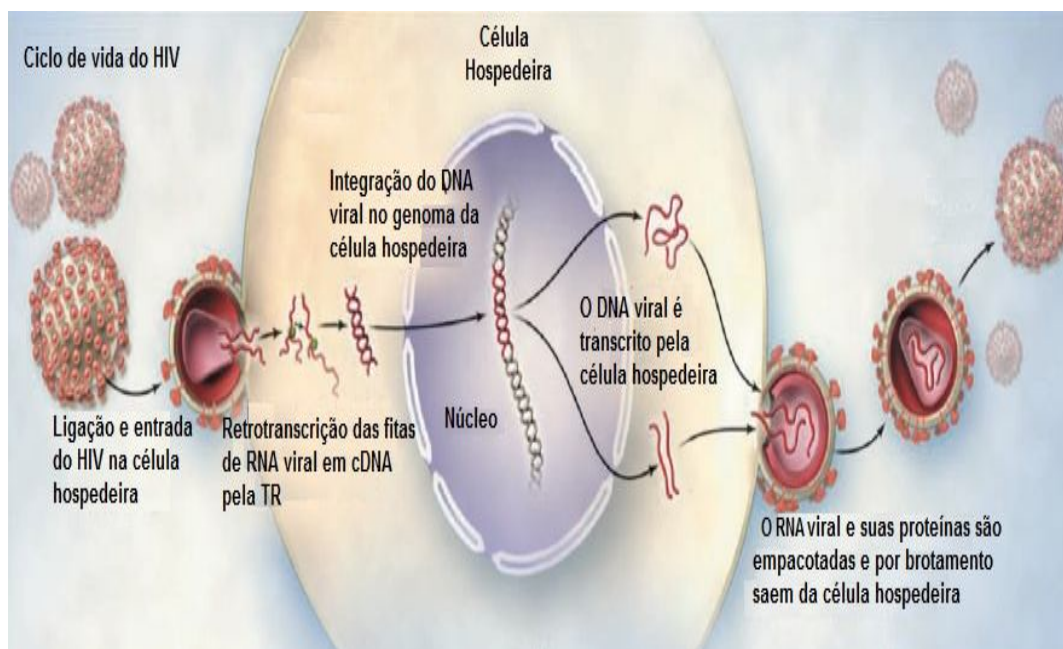


Figura 2: Infecção da célula alvo pelo HIV-1 e ciclo replicativo incluindo a entrada viral, transcrição reversa, integração de DNA viral, montagem de vírions e liberação das novas partículas virais.

(Adaptado de Taylor et al. 2008)

Quando a célula hospedeira infectada pelo HIV-1 é ativada inicia-se a transcrição de genes, incluindo os genes do HIV-1 integrados em seu genoma, a partir do DNA proviral. A transcrição produz uma única fita de RNA, essa fita é processada, produzindo vários RNAm de tamanhos diferentes (~2 kb, ~4 kb e ~9 kb), o RNAm menor consegue passar pelo poro da membrana nuclear e assim ocorre a tradução de suas proteínas: rev, tat e nef. A proteína rev retorna ao núcleo e auxilia na saída dos RNAm restantes, o RNAm de 4kb traduzirá as proteínas do envelope, vpu, vpr e vif, já o RNAm maior será traduzido nas proteínas virais gag e gag-pol ou será usado como RNA genômico do novo vírus. As duas fitas de RNA genômico viral sintetizadas podem fazer parte de um novo vírion ou podem ser traduzidas em proteínas (FRANKEL e YOUNG, 1998; SEELAMGARI *et al.*, 2004). As poliproteínas longas virais gag e gag-pol são sintetizadas próximas à membrana celular, enquanto que a poliproteína env é sintetizada no Retículo Endoplasmático (TURNER e SUMMERS, 1999).

No Retículo Endoplasmático ocorre formação do complexo da poliproteína env com o CD4, que posteriormente será separado devido à ação das proteínas vpu e nef que

degradam o CD4. Desta forma as glicoproteínas gp120 e gp41 são liberadas e migram para a membrana citoplasmática revestindo a membrana externa dos novos vírions (FRANKEL e YOUNG, 1998). Próximo à membrana citoplasmática da célula hospedeira ocorre a montagem viral com a reunião das poliproteínas gag, gag-pol, as proteínas vif, vpr e nef e o RNA genômico viral, formando assim um vírion imaturo. O vírion imaturo é liberado por brotamento e no meio extracelular, a protease viral (que faz parte da poliproteína p160) é auto-ativada e inicia o processo de clivagem das poliproteínas virais. Este processo faz com que as partículas virais passem por modificação morfológica conhecida como maturação (Figura 2) (BRIGGS e KRAUSSLICH, 2011).

A poliproteína gag é clivada para formar as proteínas p24, p17, p7/p9 e p6. Primeiramente ocorre a separação das proteínas p7/p9, permitindo a condensação do RNA viral revestido pelas mesmas. Logo após, acontece nova clivagem que permite a formação do capsídeo que abriga o RNA, as proteínas e as enzimas virais. A proteína p17 fica ligada próxima à membrana citoplasmática viral. Simultaneamente, a poliproteína pol também é clivada para formar as enzimas protease, transcriptase reversa e integrase. O processamento dessas poliproteínas no vírion completa o ciclo de replicação do HIV-1 e assim as partículas virais maduras são capazes de infectar outras células hospedeiras (BRIGGS e KRAUSSLICH, 2011) (Figura 2).

1.3 Variabilidade genética do HIV-1

O HIV-1 apresenta uma extensa variabilidade genética gerada a partir das altas taxas de replicação, mutações e recombinação do vírus HIV-1. Segundo essa variabilidade genética foi estabelecido um sistema de classificação do HIV-1 que o divide em grupos, subtipos, sub-subtipos, formas recombinantes as quais podem ser circulantes (CRFs) ou únicas (URFs) (ROBERTSON *et al.*, 2000).

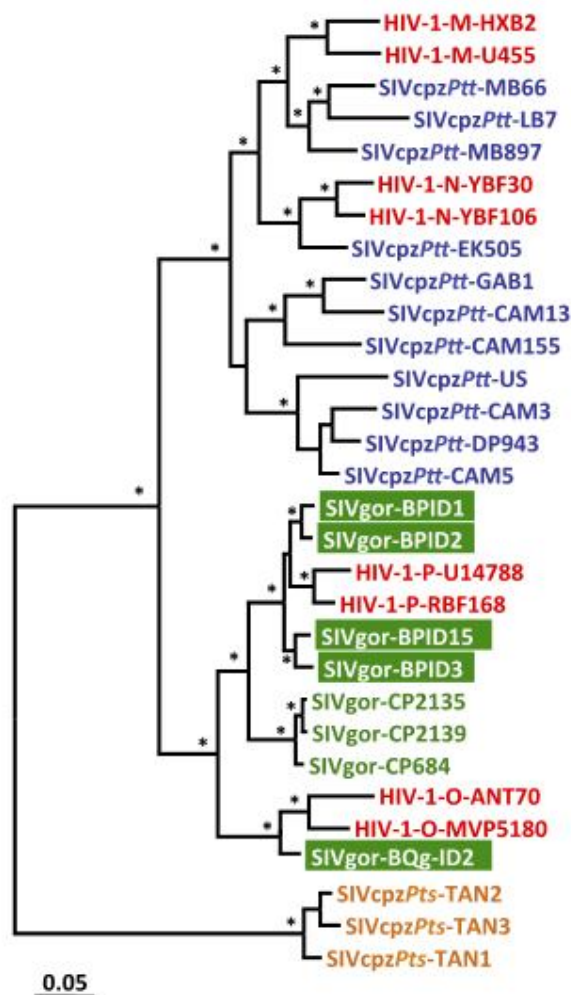


Figura 3: Árvore filogenética ilustrando relações entre o HIV-1, o SIVcpz e o SIVgor.

(Adaptado de D'Arc et al. 2015)

O HIV-1 é resultado de transmissão zoonótica e acredita-se que ocorreram pelo menos quatro transmissões independentes entre primatas e o homem. O HIV-1 é classificado em quatro grupos: M (main), N (non-M, non-O), O (outlier) e P (GAO *et al.*, 1999; THOMSON *et al.*, 2002; PLANTIER *et al.*, 2009). Os vírus dos grupos M e N estão filogeneticamente relacionados com o SIVcpzPtt cujo reservatório natural são chimpanzés da espécie *Pan troglodytes troglodytes* que habitam as florestas equatoriais em Camarões. Os vírus do grupo O e P estão relacionados com o SIVgor que infecta gorilas da espécie *Gorilla gorilla gorilla* que habitam a região centro-oeste do continente Africano (Figura 3). Não existe precisão de quando esses eventos de

transmissão interespécies ocorreram, mas mediante os cálculos moleculares estima-se que o grupo M tenha se originado no início do século 20, o grupo O por volta de 1920, o grupo N em 1963; a origem do grupo P, apesar de poucas evidências, foi estimada ser em 1980 (HAHN *et al.*, 2000; PLANTIER *et al.*, 2009; SHARP e HAHN, 2011; MOUREZ *et al.*, 2013).

O grupo M do HIV-1 é o responsável pela maioria das infecções mundiais, e segundo estimativas, por volta de 1920 já existiam indivíduos infectados com HIV-1 M na República Democrática do Congo, mais especificamente na sua capital, Kinshasa. A partir desse período o HIV-1 M começou a se disseminar para países vizinhos. O grupo M é responsável por mais de 36 milhões de infecções em todos os continentes e é subdividido em nove subtipos virais (A, B, C, D, F, G, H, J e K) e seis sub-subtipos (A1-A4, F1-F2), todos originados na África Central (THOMSON *et al.*, 2002; MELONI *et al.*, 2004; VIDAL *et al.*, 2006; FARIA *et al.*, 2014; PEETERS *et al.*, 2014; JUNQUEIRA e ALMEIDA, 2016). O grupo O, descrito em 1990, provavelmente já circulava em 1960 segundo dados de sequenciamento de amostras de um marinheiro norueguês e sua família, coletadas em 1997 e que estavam estocadas e congeladas. O grupo O representa 1% das infecções no mundo e a maioria dos indivíduos infectados é oriunda de Camarões, Guiné Equatorial e Gabão. Até o momento foram identificados quinze isolados do grupo N, descrito pela primeira vez em 1998, e dois isolados do grupo P, descrito em 2009, todos eles provenientes de Camarões (JONASSEN *et al.*, 1997; VALLARI *et al.*, 2011; EBERLE e GURTNER, 2012; MOUREZ *et al.*, 2013). É possível ocorrer recombinação entre grupos, a homologia entre os genomas dos diferentes grupos é 65%. Em 1999 foi descrita a recombinação entre os grupos O e M em uma mulher de Camarões (TAKEHISA *et al.*, 1999).

1.3.1- Subtipos Puros do HIV-1

A epidemia de AIDS atinge em torno de 36 milhões de pessoas mundialmente (WHO, 2015). A prevalência e a diversidade do HIV-1 no mundo é alta e abrange os diferentes subtipos do HIV-1. O subtipo C é mais prevalente, sendo responsável por mais de 48% das infecções por HIV-1. Em segundo lugar, aparece o subtipo A, com 12% das infecções pelo HIV-1, 11% pelo subtipo B, 5% pelo subtipo G e 2% pelo subtipo D (SANTOS e SOARES, 2010; HEMELAAR *et al.*, 2011).

A epidemia do subtipo B fora da África começou a partir do Haiti nos anos de 1960, quando trabalhadores haitianos infectados pelo HIV retornaram ao seu país, vindos da África. Em seguida houve a expansão do subtipo B para outros países caribenhos, para os Estados Unidos da América, América do Sul e outros países do mundo (GILBERT *et al.*, 2007; MURILLO *et al.*, 2013). Na Europa, o subtipo B foi introduzido diversas vezes mediante usuários de drogas injetáveis, turistas e por comércio sexual, espalhando-se de diferentes formas, sendo que cada país tem sua epidemia peculiar (PARASKEVIS *et al.*, 2009). Recentemente estudos mostraram que a epidemia do subtipo B da América do Sul está diretamente relacionada com a epidemia do Caribe, sendo o Brasil, Argentina e Venezuela responsáveis pela expansão da infecção do HIV-1 dentro da América do Sul (JUNQUEIRA *et al.*, 2011; MIR *et al.*, 2015; JUNQUEIRA e ALMEIDA, 2016).

O subtipo B apresenta algumas variantes circulando no mundo com padrões de assinaturas alternativos ou mutações diferenciadas. Quatro variantes do subtipo B foram identificadas como responsáveis por epidemias regionais, dentre elas o subtipo B coreano (“Korean B” ou B^K) que apresenta o motivo GPGS atípico na alça V3, ou seja, uma assinatura padrão em 32 aminoácidos dispersos na gp160 em relação ao subtipo B. Estima-se que o subtipo B^K tenha sido originado por volta de 1967 (KIM *et al.*, 2012). O subtipo B tailandês (B^T Thailand, Thai-B ou Bb) exibe um motivo GPGQ distinto na alça V3, além de mutações na p17. Estima-se que este subtipo tenha surgido em 1983 (YE *et al.*, 2014). O subtipo B de Trinidad e Tobago (B^{TT}) apresenta uma deleção da treonina na porção final da alça V3 (GILBERT *et al.*, 2007). O subtipo B Brasileiro apresenta a sequência GWGR na alça V3 no gene *env* (MORGADO *et al.*, 1994; DIAZ *et al.* 2008).

O subtipo B no Brasil foi introduzido por múltiplas cepas, a partir da década de 60 quando se estabeleceu predominando em quase todas as regiões do país, com exceção da região sul, onde predomina o subtipo C (BELLO *et al.*, 2011). Os estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Goiás e Mato Grosso tem uma grande importância na transmissão do subtipo B dentro do país. Além disso, como São Paulo e Rio de Janeiro recebem grande número de visitantes de vários lugares do mundo, estes estados podem potencialmente contribuir para disseminação do subtipo B para outros países (JUNQUEIRA e ALMEIDA, 2016). No Brasil, duas variantes do subtipo B foram identificadas: o clado B pandêmico (B_{pandêmico}) e o clado do subtipo B não pandêmico do Caribe. O clado B caribenho (B_{CAR}) representa 1-4% das infecções causadas pelo

subtipo B no Brasil, estando mais presentes nos estados de Roraima, Amazonas e Maranhão (DIVINO *et al.*, 2016).

O subtipo C é responsável pela maioria das infecções do HIV-1 em todo mundo, acredita-se que o ancestral do subtipo C originou-se no final da década de 30 na República Democrática do Congo, em Kinshasa, e depois disseminou-se para os países africanos vizinhos (HEMELAAR *et al.*, 2011; FARIA *et al.*, 2015). Na década de 80 a África do Sul recebeu milhares de imigrantes para trabalhar nas minas com comportamento de alto risco para a infecção do HIV-1 contribuindo para a disseminação do subtipo C no país. Estes imigrantes permaneciam confinados em dormitórios por longos períodos sem ter contato com suas famílias e buscavam múltiplos parceiros sexuais em zona de prostituição (WILKINSON *et al.*, 2015).

Na América do Sul, o subtipo C foi descrito inicialmente no Brasil em 1994, e posteriormente na Argentina e Uruguai nos anos de 1999 e 2001, respectivamente. Acredita-se que o subtipo C tenha se disseminado na América do Sul a partir do Brasil (MONTEIRO *et al.*, 2007; CARRION *et al.*, 2004; GAO *et al.*, 1994). Diversos estudos apontam que a introdução do subtipo C ocorreu por um único evento fundador ou por várias introduções com variantes geneticamente muito próximas, na região Sul (FONTELLA *et al.*, 2008; BELLO *et al.*, 2008). Porém, existem controvérsias sobre o local exato da origem do subtipo C Brasileiro. Em 2008, dois estudos sobre a origem do subtipo C do Brasil foram publicados. Um deles propôs que as variantes C do Brasil teriam uma relação filogenética muito próxima com as cepas provenientes de Burundi na África (BELLO *et al.*, 2008). Por outro lado, outro estudo apontava que as cepas C Brasileiras tinham uma relação filogenética muito próxima com as variantes do Quênia (FONTELLA *et al.*, 2008). Posteriormente, estes achados foram contestados baseados na hipótese de origem do subtipo C Brasileiro em Moçambique devido a forte ligação sócio cultural entre os dois países devido a intensa migração de moçambicanos para o Brasil fugindo da guerra civil (BRIGIDO, 2009). Logo em seguida, análises filogenéticas refutaram esse argumento indicando que não havia nenhuma relação filogenética próxima entre as variantes C Brasileiras e moçambicanas (FONTELLA *et al.*, 2009). Em conjunto, estas evidências apontam que as cepas C no Brasil estão relacionadas com as variantes do Leste Africano. Outro estudo propôs que as cepas C Brasileiras teriam se originado no Leste Africano, e foram introduzidas no Brasil pelo Reino Unido. Porém, análises filogenéticas posteriores mostram que o subtipo C teria sido introduzido no Brasil a partir da África Oriental e posteriormente as cepas C teriam

entrado no Reino Unido oriundas do Brasil (de OLIVEIRA *et al.*, 2010; VERAS *et al.*, 2011; GRAF e PINTO, 2013).

Existem duas teorias sobre a introdução do subtipo C no Brasil, uma indicando que o subtipo C tenha sido introduzido no Paraná e disseminado para Santa Catarina e depois para o estado do Rio Grande do Sul, por volta dos anos 1970. Posteriormente, na década de 80, o subtipo C migrou do estado do Paraná para as regiões Sudeste e Centro-Oeste e do estado de Santa Catarina para o estado do Rio de Janeiro. A outra teoria sugere que o subtipo C Brasileiro tenha sido introduzido na cidade de Porto Alegre no início dos anos 70. Inicialmente a migração ocorreu nas cidades vizinhas. Na década de 80, o subtipo C alcançou as capitais das regiões Sul e Sudeste e posteriormente alcançou o Centro-Oeste, Goiânia por volta de 1981, Campo Grande em meados da década de 80. No início dos anos 90, o subtipo C chegou até a região Norte (Manaus e Palmas) (DELATORRE *et al.*, 2013; GRAF *et al.*, 2015). O primeiro isolado do subtipo C Brasileiro a ter seu genoma completo sequenciado foi a cepa 92BR025.8, pertencente a uma paciente hemofílica, 23 anos, natural de Porto Alegre e sua amostra foi coletada em 1992 (GAO *et al.*, 1998).

Grande parte das infecções por HIV-1 do subtipo F1 no mundo tem sido relatada na África, mais especificamente em Angola e na República Democrática do Congo. A sua origem ocorreu provavelmente por volta da década de 40 na República Democrática do Congo quando então iniciou sua disseminação da África para a Europa (Romênia) e América do Sul (MEHTA. *et al.*, 2011; LAI *et al.*, 2014). Acredita-se que a Itália tenha recebido cepas do subtipo F1 vindas da América do Sul e da África (GUIMARÃES *et al.*, 2009; BELLO *et al.*, 2012). Na América do Sul, as cepas do subtipo F1 estão relacionadas filogeneticamente com as cepas da Angola e da República Democrática do Congo. Análises filogenéticas sugerem que no Brasil, o subtipo F1 teve uma fase de expansão inicial, no final da década de 70 até o início dos anos 1990, que foi seguida de recente desaceleração dessa taxa de expansão (BELLO *et al.*, 2012).

Provavelmente logo após sua introdução no Brasil, o subtipo F1 tenha se recombinado com o subtipo B, e as formas recombinantes BF tenham se adaptado e expandido no país melhor que o subtipo F1. Na América do Sul, as formas “puras” do subtipo F1 parecem estar restritas ao Brasil e apresentam uma prevalência variável, na maioria dos estados, baixa prevalência, com exceção dos estados do Amapá, Minas Gerais e Pernambuco. É possível que essa baixa frequência do subtipo F1 puro no Brasil seja decorrente da vantagem adaptativa das formas recombinantes principalmente com o

subtipo B, que em geral são mais frequentes. O subtipo F1 foi identificado no Brasil no início da década de 90 mediante do genoma quase completo do isolado 93BR020.1 que foi classificado como subtipo F puro (MORGADO *et al.*, 1994; GAO *et al.*, 1998; BELLO *et al.*, 2011).

Segundo o Boletim Epidemiológico HIV/Aids (Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das Infecções Sexualmente Transmissíveis, do HIV/Aids e das Hepatites Virais, Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde) em 2015 havia no Brasil cerca de 840 mil infectados com o HIV-1. Esses indivíduos estavam distribuídos em cinco regiões Brasileiras, sendo 52,9% no Sudeste, 20,1% no Sul, 15,1% no Nordeste, 6,0% no Centro-Oeste e 5,9% no Norte.

As características da epidemiologia molecular do HIV-1 no Brasil diferem em cada região geográfica. A região Norte, composta por sete estados, corresponde a 45% de todo território Brasileiro e apresenta cerca de 50 mil infectados pelo HIV-1, porém os dados moleculares do HIV-1 nesta região ainda são escassos. Baseando-se nos dados disponíveis de estados da região Norte observa-se predomínio do subtipo B (84%) variando de 63% no Amapá e 97% em Roraima. (CARVALHO *et al.*, 2011; CUNHA *et al.*, 2012; LOPES *et al.*, 2015; dos ANJOS SILVA *et al.*, 2016; da COSTA *et al.*, 2016, ANDRADE *et al.*, 2017; MACHADO *et al.*, 2017; CORADO *et al.*, 2017). Na região Norte a segunda forma mais prevalente é recombinante BF (8.0%) sendo que em Rondônia a prevalência alta de 18% de BF foi observada. Nesta região, o subtipo F1 tem prevalência de 4,4% (Amapá apresenta uma frequência de 14%). A prevalência do subtipo C foi 2,7%, ressaltando que Rondônia teve uma prevalência de 7,8% de sequências CRF31_BC-like e outros 0,9% (da COSTA *et al.*, 2016).

Um resumo dos dados de epidemiologia molecular do HIV-1 na região Nordeste indica predomínio do subtipo B (73% variando de 45% em Alagoas a 86% em Piauí). O subtipo F1 representa 12,4% sendo que a frequência mais alta foi encontrada em Pernambuco: 37%. As formas recombinantes BF representam 8,1%, principalmente em Pernambuco, onde foram caracterizadas as CRF70/71_BF. Estudos recentes têm mostrado uma frequência intermediária das CRF70/71_BF (12%). O subtipo C representou 2,7% e 3,8% dos vírus correspondiam a outras formas recombinantes BC, dentre elas CRF31_BC-like e CRF60_BC-like, além da forma recombinante AG (ARRUDA *et al.*, 2011; CAVALCANTI *et al.*, 2012; ALENCAR *et al.*, 2013; de MORAES SOARES *et al.*, 2014; MOURA *et al.*, 2015a; MOURA *et al.*, 2015b;

PESSOA *et al.*, 2014b; PESSOA *et al.*, 2016; LIMA *et al.*, 2016^a; DELATORRE *et al.*, 2017).

Na região Centro-Oeste, a epidemiologia molecular do HIV-1 indica prevalência do subtipo B: 71,5% sendo a menor frequência detectada em população carcerária de Goiás e Mato Grosso do Sul (59%) e a maior frequência detectada em Goiás (82%). Em segundo lugar, observam-se formas recombinantes BF (13,2%). O subtipo C correspondeu a 8,5% dos isolados do Centro-Oeste. Entretanto, esse subtipo tem uma frequência alta em gestantes (16,6%). O subtipo F1 teve frequência de 4,6% e formas recombinantes BC de 2,2% (CARDOSO *et al.*, 2009; CARDOSO e STEFANI, 2009; CARDOSO *et al.*, 2010; CARDOSO *et al.*, 2011; FERREIRA *et al.*, 2011; ALCANTARA *et al.*, 2012; da SILVEIRA *et al.*, 2012; da COSTA *et al.*, 2013; ALCANTARA *et al.*, 2013; REIS *et al.*, 2014; LIMA *et al.*, 2016b).

A região Sudeste, responsável por 52,1% das infecções no Brasil é caracterizada por predomínio do subtipo B (74% variando de 58% no São Paulo a 86% no Rio de Janeiro) e formas recombinantes BF (11%). Nessa região foram caracterizadas seis CRFs: CRF28/29/46_BF em São Paulo, CRF39/40_BF no Rio de Janeiro e CRF72_BF em Minas Gerais (DE SÁ-FILHO *et al.*, 2006; GUIMARÃES *et al.*, 2008; SANABANI *et al.*, 2010; SANABANI *et al.*, 2011; SANABANI *et al.*, 2013; ALENCAR *et al.*, 2013; De MORAES SOARES *et al.*, 2014; PESSOA *et al.*, 2014a; PESSOA *et al.*, 2014b; PESSOA *et al.*, 2016). Também nessa região têm sido identificados subtipos C, F1, D, CRF45_cpx e CRF02_AG-like (PILOTTO *et al.*, 2013; PIMENTEL *et al.*, 2013; VELASCO-DE-CASTRO *et al.*, 2014; GUIMARÃES *et al.*, 2015; DELATORRE *et al.*, 2016).

Na região Sul, a epidemiologia molecular do HIV-1 difere de todas outras regiões do Brasil, sendo caracterizada pela alta prevalência do subtipo C e das formas recombinantes BC. Estudos da região Sul indicam que o subtipo C representa 52% e o subtipo B 27,9%. As formas recombinantes BC representam 8,8% e CRF31_BC 5,6%. A CRF31_BC tem alta prevalência em Porto Alegre e nas cidades da região metropolitana de Porto Alegre, apresentando uma prevalência de 35%. As formas recombinantes BF correspondem a 3,7% e o subtipo F1 a 2% das infecções (MEDEIROS *et al.*, 2011; da SILVEIRA *et al.*, 2012; LIBRELOTTO *et al.*, 2015; GRINBERG *et al.*, 2015; GRAF *et al.*, 2016).

1.3.2- Formas Recombinantes do HIV-1

O HIV-1 é considerado um dos patógenos emergentes mais polimórficos que se conhece. As principais causas da diversidade são: a ausência de atividade de correção da enzima transcriptase reversa, a alta taxa de mutação, a extensa produção de vírions diária e a recombinação viral que ocorre entre dois ou mais subtipos. Dentre elas o processo de recombinação dentro de uma célula hospedeira durante a replicação viral contribui de modo significativo para este polimorfismo. O processo de recombinação pode ocorrer entre vírus com subtipos genéticos idênticos ou diferentes (recombinação intra ou intersubtipos) ou entre vírus de grupos diferentes (intergrupos). A recombinação viral tem o potencial de contribuir para a grande variabilidade genética do HIV-1 a qual pode influenciar o *fitness* viral e sua adaptação ao sistema imune (TAKEHISA *et al.*, 1999; DELVIKS-FRANKENBERRY *et al.*, 2011).

A recombinação pode ocorrer durante os constantes “saltos” da enzima transcriptase reversa entre as fitas de RNA viral durante a retrotranscrição. A transcriptase reversa pode comutar entre as fitas de 3 a 12 vezes por ciclo replicativo, podendo gerar deleções e inserções de nucleotídeos (HU e SEEGER, 1996; TAYLOR *et al.*, 2008; DELVIKS-FRANKENBERRY *et al.*, 2011).

Um indivíduo infectado pelo HIV-1 pode produzir aproximadamente 10^{10} novos vírions por dia. Após múltiplos ciclos replicativos, a população viral pode ser considerada uma “*quasiespecie*”, ou seja, uma população que contém um grande número de variantes genéticas proximamente relacionadas, mas distintas. Essas variantes genéticas podem apresentar vários polimorfismos ou mutações. Muitas mutações introduzidas no genoma são letais ou deletérias para replicação viral (ROBERTSON *et al.*, 1995; EBERLE e GURTLER, 2012). A recombinação intrasubtipos tem sido pouco detectada e citada na literatura, devido a alta similaridade entre as sequências, o que faz com que esse fenômeno não seja facilmente identificado (GALLI *et al.*, 2010).

Por outro lado a recombinação intersubtipos tem sido amplamente relatada na literatura. Este processo ocorre quando uma célula hospedeira é infectada por dois ou mais vírus de subtipos diferentes, não necessariamente ao mesmo tempo, a coinfecção pode ocorrer com intervalos de dias, meses ou anos. Nesta situação, os RNAs genômicos de ambos os vírus diferentes são empacotados no mesmo nucleocapsídeo de forma que o material genético desse novo vírus apresenta duas fitas de RNA distintos

dos dois vírus que causaram a coinfeção. Nessa primeira fase da infecção, após o ciclo replicativo, são liberados vírions apresentando material genético de subtipos diferentes, ou seja, possuem no seu material genético, fitas de RNA de diferentes subtipos. Quando esse vírus infecta uma nova célula, durante o processo de retrotranscrição, a transcriptase reversa pode comutar entre as duas fitas de RNA distinta. Desta forma é gerada, uma fita de DNA viral com sequências de dois subtipos diferentes, ou seja, uma fita de DNAc semelhante a um mosaico. Os futuros vírions “híbridos” produzidos por essa célula serão recombinantes intersubtipos e poderão infectar outras células (QUINONES-MATEU *et al.*, 1999; TAYLOR *et al.*, 2008) (Figura 4).

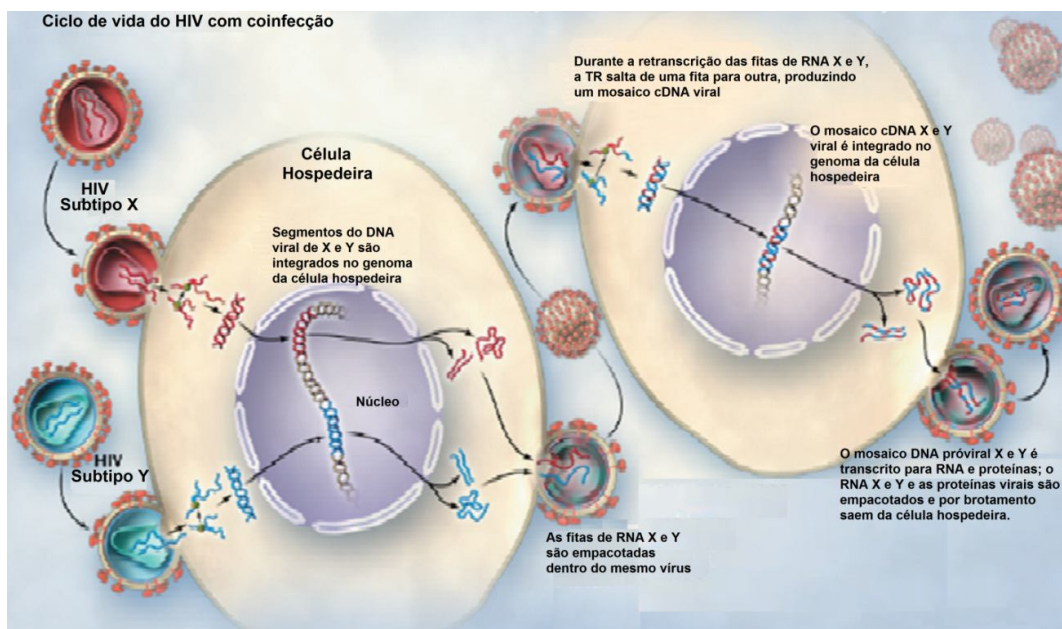


Figura 4: Superinfecção ou coinfeção com diferentes subtipos do HIV-1: Ciclo replicativo viral ilustrando as etapas envolvidas na recombinação e formação de novos vírions recombinantes.

(Adaptado de Taylor et al. 2008)

As formas recombinantes únicas (URFs, do inglês *Unique Recombinant Forms*) são caracterizadas por genomas completos do HIV-1 contendo pontos de recombinação idênticos entre dois ou mais subtipos identificados em até dois indivíduos ou em um grupo de indivíduos com vínculo epidemiológico (ROBERTSON *et al.*, 2000; THOMSON *et al.*, 2002). Por outro lado, as formas recombinantes circulantes (CRFs,

do inglês *Circulating Recombinant Forms*) são caracterizadas em pelo menos três indivíduos sem vínculo epidemiológico, baseadas em pelo menos dois genomas completos com pontos de recombinação idênticos entre subtipos diferentes e um terceiro genoma quase completo (ROBERTSON *et al.*, 2000; NAJERA *et al.*, 2002; TAYLOR *et al.*, 2008; LOS ALAMOS HIV DATABASE, 2016). Estima-se que as CRFs sejam responsáveis por 16% das infecções por HIV-1 enquanto as URFs contribuem para microepidemias (SANTOS e SOARES, 2010; HEMELAAR *et al.*, 2011)

A primeira recombinação entre subtipos diferentes foi relatada por Sabino e colaboradores em dois indivíduos com vínculo epidemiológico no Rio de Janeiro. O sequenciamento na região V1-V5 do envelope do HIV-1 mostrou coinfeção pelos subtipos B e F1 (SABINO *et al.*, 1994). Com o passar dos anos, técnicas de sequenciamento mais acessíveis permitiram caracterização de número crescente de formas recombinantes. Atualmente, existem 81 CRFs publicadas do HIV-1, cada uma apresentando características moleculares peculiares. As CRFs compostas por mais de dois subtipos diferentes são denominadas cpx (complexa), e existem relatos de CRFs formadas por seis subtipos diferentes, como por exemplo: CRF18_cpx e CRF27_cpx. Além disso, outras CRFs representam uma segunda geração de CRFs, pois são formadas pela recombinação entre CRFs ou entre uma CRF já descrita e outros subtipos, por exemplo: CRF30_0206, CRF36_cpx e CRF37_cpx. Por outro lado, a CRF46_BF apresenta na sua quase totalidade o subtipo F1 e o subtipo B representa apenas em uma pequena porção na região 3'LTR (LOS ALAMOS HIV DATABASE, 2017) (Tabela 1).

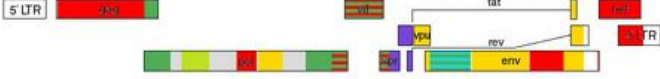
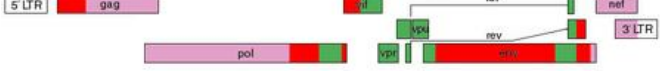
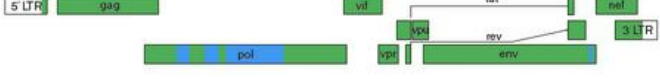
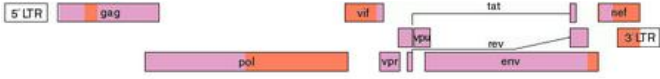
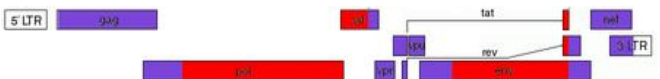
A primeira CRF descrita foi a CRF01_AE, indicando a recombinação entre os subtipos A e E, embora o subtipo E “puro” nunca tenha sido descrito. Ela surgiu na África Central e é responsável por 5% das infecções em todo mundo. Foi responsável por um surto na Tailândia na década de 80 e rapidamente alcançou os países vizinhos (CARR *et al.*, 1996). Um estudo realizado na Austrália observou um aumento considerável da prevalência da CRF01_AE. Enquanto entre 2000 a 2003 a sua prevalência era de 6,6%, houve uma expansão desta epidemia que nos anos de 2012 a 2014 alcançou prevalência de 20,4%. Possivelmente este aumento estaria ligado ao turismo e a imigração frequente na Austrália (CASTLEY *et al.*, 2016). Estudos realizados no Japão, Suécia e Finlândia têm mostrado a disseminação da CRF01_AE entre usuários de drogas injetáveis e entre os heterossexuais (SKAR *et al.*, 2011; LAU e

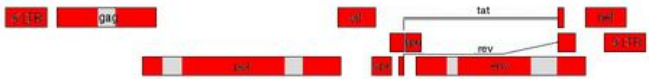
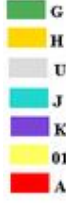
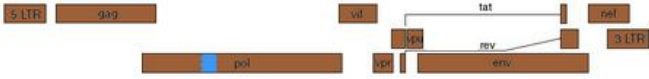
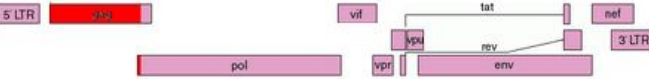
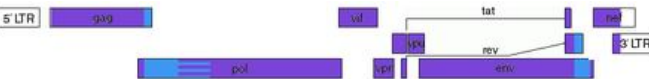
WONG, 2013; SHIINO *et al.*, 2014). As CRF02_AG e CRF07_BC são responsáveis por infecções pontuais em algumas regiões do mundo. A CRF_02AG, responsável por 8% das infecções mundialmente, tem sido descrita no Japão, Índia, Paquistão, África Subsaariana. Já a CRF07_BC tem sido prevalente na China e as CRF19_cpx, CRF20_BG, CRF23_BG são responsáveis pela epidemia do HIV-1 em Cuba (HEMELAAR *et al.*, 2011; MACHADO *et al.*, 2013; LOS ALAMOS HIV DATABASE, 2017).

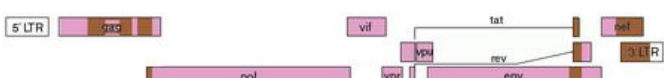
Tabela 1: Resumo das estruturas dos mosaicos das Formas Recombinantes Circulantes (CRFs) do HIV-1 atualmente descritas mundialmente (Los Alamos, Agosto 2017).

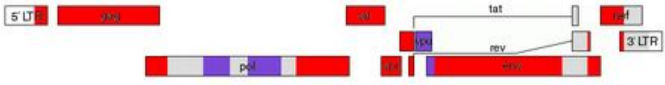
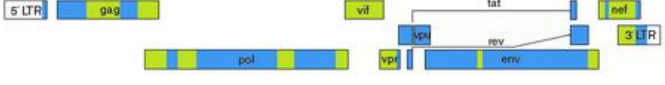
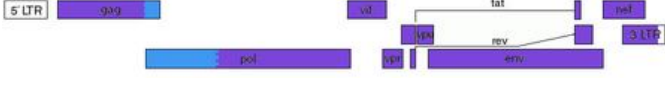
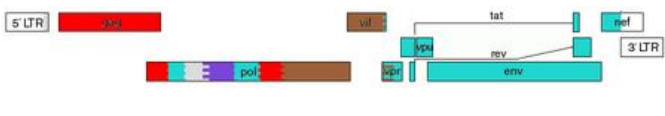
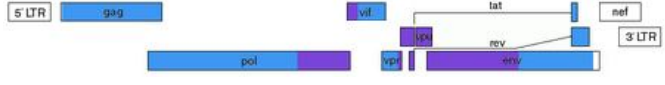
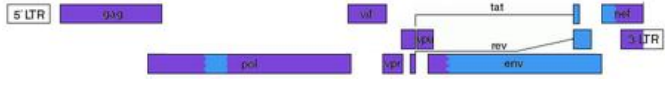
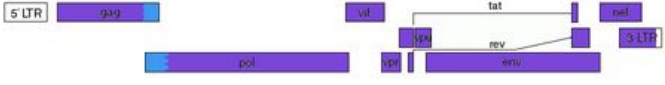
Nome	Mapa recombinante	Subtipos	Artigos	Ano
CRF01_AE		A E	Carr et al 1996	1996
CRF02_AG		G A	Carr et al 1998	1998
CRF03_AB		A B	Liitsola et al 1998	1998
CRF04_cpx		A G K H	Paraskevis et al 2001	2001
CRF05_DF		D F	Laukkanen et al 2000	2000
CRF06_cpx		A G K J	Oelrichs et al 1998	1998

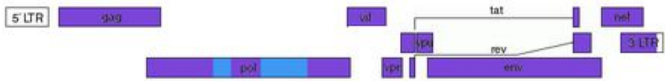
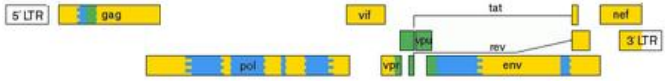
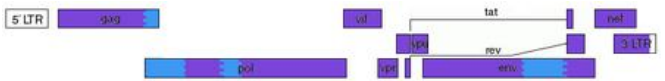
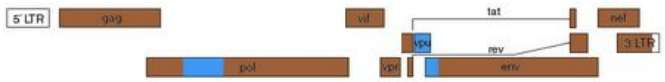
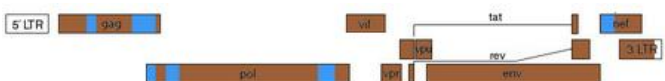
CRF07_BC		Su et al 2000	2000
CRF08_BC		McCutchan et al 2000	2000
CRF09_cpx	N/A	McCutchan et al 2000	2000
CRF10_CD		Koulinska et al 2001	2001
CRF11_cpx		Montavan et al 2002	2002
CRF12_BF		Carr et al 2001a	2001
CRF13_cpx		Wilbe et al 2002	2002
CRF14_BG		Delgado et al 2002	2002
CRF15_01B		Tovanabutra et al 2003	2003
CRF16_A2D		Visawapoka et al 2006	2006

CRF17_BF			Carr et al 2001a	2001
CRF18_cpx			Thomson et al 2005	2005
CRF19_cpx			Casado et al 2005	2005
CRF20_BG			Perez et al 2006	2006
CRF21_A2D			Visawapoka et al 2006	2006
CRF22_01A1			Carr et al 2001b	2001
CRF23_BG			Perez et al 2006	2006
CRF24_BG			Perez et al 2006	2006
CRF25_cpx			Kijak et al. 2004	2004

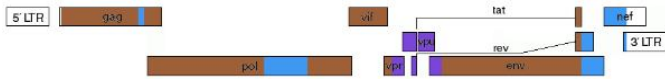
CRF26_AU			Vidal et al. 2009	2009
CRF27_cpx			Vidal et al. 2008	2008
CRF28_BF			De Sá-Filho et al. 2006	2006
CRF29_BF			De Sá-Filho et al. 2006	2006
CRF30_0206	N/A		Mamadou et al. 2003	2003
CRF31_BC			Santos et al. 2006	2006
CRF32_0601			Adojaan et al. 2005	2005
CRF33_01B			Tee et al. 2006	2006
CRF34_01B			Tovanabutra et al. 2007	2007

CRF35_A1D		A D	Sanders-Buell et al. 2007	2007
CRF36_cpx		01 02 A G	Powell et al. 2007b	2007
CRF37_cpx		01 A G U A1 02	Powell et al. 2007a	2007
CRF38_BF		B F	Ruchansky et al. 2009	2009
CRF39_BF		B F	Guimarães et al. 2008	2008
CRF40_BF		B F	Guimarães et al. 2008	2008
CRF41_CD		D C	Billings et al. 2017	2017
CRF42_BF	N/A		Struck et al. in press	2008
CRF43_02G		02 G	Yamaguchi et al. 2008	2008
CRF44_BF		B F	Rios et al. 2007	2007

CRF45_cpx			Niama et al. 2009	2009
CRF46_BF			Sanabani et al.2010	2010
CRF47_BF			Fernandes-Garcia et al. 2010	2010
CRF48_01B			Li et al. 2010	2010
CRF49_cpx			de Silva et al. 2010	2010
CRF50_A1D			Foster et al. 2014	2014
CRF51_A1B			Ng et al. 2011	2011
CRF52_A1B			Liu et al. 2012	2012
CRF53_A1B			Chow et al. 2012	2012
CRF54_01B			Ng et al. 2012a	2012

CRF55_01B		01 B	Han et al. 2013a	2013
CRF56_cpx		02 B G	Leoz et al 2013	2013
CRF57_BC		C B	Li et al. 2012	2012
CRF58_01B		01 B	Chow et al. 2014	2014
CRF59_01B		01 B	Han et al. 2013b	2013
CRF60_BC		C B	Simonetti et al. 2014	2014
CRF61_BC		C B	Li et al. 2013	2013
CRF62_BC		C B	Wei et al. 2014	2014
CRF63_02A		02 A	Baryshev et al. 2014	2014
CRF64_BC		C B	Hsi et al. 2014	2014

CRF65_cpx			Feng et al.2014	2014
CRF67_01B			Wu et al. 2013	2013
CRF68_01B			Wu et al. 2013	2013
CRF70_BF			Pessoa et al. 2014b	2014
CRF71_BF			Pessoa et al 2014b	2014
CRF72_BF			Pessoa et al 2014a	2014
CRF73_BG			Fernandez-Garcia et al. 2016	2016
CRF74_01B			Cheong et al. 2015	2015
CRF76_01B			Ogawa et al. 2016	2016
CRF78_cpx			Song et al. 2016	2016

CRF82_cpx			Chen et al 2016	2016
CRF83_cpx			Chen et al 2016	2016
CRF85_BC			Su et al 2016	2016
CRF86_BC			Li et al 2016	2016
CRF87_cpx			Hu et al 2016	2016
CRF88_BC			Hu et al 2016	2016

Considera-se que as formas recombinantes BF estejam circulando na América do Sul desde os meados da década de 80. A primeira CRF descrita nas Américas (Argentina e Uruguai) e, provavelmente, a CRF mais antiga originada fora de África, foi a CRF12_BF. Esta CRF foi descrita em 2001, sendo a sua possível origem estimada no início dos anos 70 (CARR *et al.*, 2001; DILERNIA *et al.*, 2011). A CRF17_BF foi relatada na Argentina, Bolívia e Uruguai; a CRF38_BF foi identificada no Uruguai e a CRF44_BF caracterizada no Chile. Até o momento, doze diferentes CRFs_BF foram descritas na América do Sul (CARR *et al.*, 2001; RUCHANSKY *et al.*, 2009; RIOS *et al.*, 2007, HEMELAAR *et al.*, 2011; MACHADO *et al.*, 2013; LOS ALAMOS HIV DATABASE, 2017).

Estudos recentes têm mostrado que os recombinantes BF têm aumentado sua prevalência na população Brasileira. Um estudo mostrou que de cada seis sequências recombinantes descritas no Brasil, cinco sequências são recombinantes BF (MELO *et al.*, 2012). Em 1998, Gao e colaboradores sequenciaram o genoma completo da primeira URF_BF Brasileira. A amostra pertencia a uma adolescente (17 anos) da cidade de São Paulo, coletada em 1993. Desde então, um número crescente de relatos de mosaicos BF têm sido relatados no país. Em algumas regiões do Brasil, como no Centro-Oeste, mais

especificamente no estado de Goiás, as formas recombinantes BF representam a segunda variante genética mais frequente do HIV-1 (CARDOSO *et al.*, 2009; CARDOSO *et al.*, 2010; ALCANTARA *et al.*, 2012; da COSTA *et al.*, 2013; LIMA *et al.*, 2016b). Das 81 CRFs publicadas, catorze (17,3%) são recombinantes entre os subtipos B e F1 e destas, oito foram descritas no Brasil. Seis CRFs_BF foram caracterizadas na região Sudeste e duas na região Nordeste. No Brasil as primeiras formas recombinantes circulantes reportadas foram as CRF28_BF e CRF29_BF identificadas em pacientes da cidade de Santos, São Paulo (DE SA FILHO *et al.*, 2006). Posteriormente as CRF39_BF e CRF40_BF foram identificadas em pacientes da cidade do Rio de Janeiro e a CRF46_BF foi identificada em pacientes da cidade de São Paulo (GUIMARAES *et al.*, 2008; SANABANI *et al.*, 2010). As CRF70_BF1 e CRF71_BF1 foram identificadas mais recentemente em doadores de sangue do estado de Pernambuco, no Nordeste enquanto que a CRF72_BF1 foi identificada também em doadores de sangue de Minas Gerais no Sudeste (PESSOA *et al.*, 2014a; PESSOA *et al.*, 2014b).

2. JUSTIFICATIVA

Uma das linhas de pesquisa do Laboratório de Imunologia de Aids e Hanseníase é a caracterização da epidemiologia molecular do HIV-1 em diversos subgrupos populacionais de estados do Centro-Oeste (Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul), do Norte (Tocantins) e do Nordeste (Maranhão e Piauí) (STEFANI *et al.*, 2000; PEREIRA *et al.*, 2006; STEFANI *et al.*, 2007; ALCÂNTARA *et al.*, 2009; CARDOSO *et al.*, 2009; CARDOSO e STEFANI, 2009; COSTA *et al.*, 2009; CARDOSO *et al.*, 2010; CARDOSO *et al.*, 2011; CARVALHO *et al.*, 2011; FERREIRA *et al.*, 2011; ALCANTARA *et al.*, 2012; da SILVEIRA *et al.*, 2012; da COSTA *et al.*, 2013; ALCANTARA *et al.*, 2013; REIS *et al.*, 2014; MOURA *et al.*, 2015a; MOURA *et al.*, 2015b; LIMA *et al.*, 2016b).

Estes estudos realizados durante o período de 2000-2013 incluíram sequenciamento automatizado de *pol* (750 pb do fragmento da transcriptase reversa-TR e a protease inteira-PR) e mostraram diferenças regionais importantes na epidemiologia molecular do HIV-1 e nas taxas de resistência transmitida a ARV. Em geral, nossos resultados indicaram extensa diversidade genética do HIV-1, com predomínio do subtipo B e introdução e disseminação do subtipo C, especialmente entre gestantes do centro-oeste. Além disso, observamos um percentual significativo de formas recombinantes BF enquanto que vírus recombinantes BC foram também observados em menor proporção. A principal justificativa do presente estudo se baseia na necessidade de aprofundar estudos moleculares sobre HIV-1 recombinantes circulando em regiões distantes do epicentro da epidemia Brasileira. Estes dados são importantes para se mensurar a real diversidade viral indicando a evolução desta diversidade no Brasil bem como níveis e padrões de resistência a ARV.

A caracterização molecular de HIV-1 recombinantes identificados nestes seis estados Brasileiros incluiu os seguintes parâmetros: identificação de subtipos envolvidos, perfil de recombinação, identificação de CRFs novas ou descritas e de novas URFs bem como mutações associadas a resistência a ARV. Além disso, sabe-se que a identificação de vírus recombinantes pode ser significativamente aumentada pela análise de múltiplas regiões do genoma viral. Nosso estudo incluiu geração e análise de genomas completos, quase completos e parciais de HIV-1 recombinantes que permitiram a caracterização de uma nova CRF_BF (CRF90_BF1) e novas URFs_BF e

BC identificadas nestes seis estados Brasileiros. Estudos de sequenciamento completo destes isolados são importantes para determinar a real prevalência de recombinantes do HIV-1 fora do epicentro da epidemia de AIDS no Brasil.

A extensa diversidade genética do HIV-1 identificada nestes seis estados Brasileiros reforça a importância de estudos continuados para o monitoramento da diversidade do HIV-1 que permitam identificar a introdução e disseminação de distintos subtipos virais e sua evolução em diferentes regiões do Brasil. Estes estudos contribuem para compor o mapa molecular do HIV-1 no Brasil identificando diferenças regionais na epidemiologia molecular do vírus no território nacional.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

Caracterizar isolados recombinantes intersubtipos BF e BC na região *pol* de pacientes de seis estados Brasileiros e mediante análises de genoma completo/quase completo/genoma parcial, identificar CRFs novas ou já descritas e novas URFs.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

-Caracterizar os isolados recombinantes BF, potenciais novas CRFs_BF, URFs_BF ou “CRFs_BF-like” e avaliar a disseminação geográfica das novas formas recombinantes identificadas (artigo 1, publicado e manuscrito I).

-Caracterizar os isolados recombinantes BC, BFC e CF, CRF_cpx, CRFs_BC, “CRFs_BC-like” ou novas URFs_BC e URF_CF (manuscrito II).

5. ARTIGO/MANUSCRITOS

5.1 - Artigo publicado

Characterization of HIV-1 CRF90_BF1 and putative novel CRFs_BF1 in Central West, North and Northeast Brazilian regions

Mônica Nogueira da Guarda Reis, Gonzalo Bello, Monick Lindenmeyer Guimarães, Mariane Martins de Araújo Stefani

Revista: PLOS One. 2017 Jun 19;12(6):e0178578.

5.2 - Manuscrito I

CHARACTERIZATION OF THREE NEW URFs_BF IDENTIFIED IN BRAZIL

Mônica Nogueira da Guarda Reis, Mariane Martins de Araújo Stefani

A ser submetido

5.3 - Manuscrito II

HIV-1 SUBTYPE C AND F1 INFECTIONS AND EXTENSIVE VARIABILITY OF BC, BFC AND CF MOSAICS IN CENTRAL WEST, NORTH AND NORTHEAST BRAZIL

Mônica Nogueira da Guarda Reis, Monick Lindenmeyer Guimarães, Mariane Martins de Araújo Stefani

A ser submetido

RESEARCH ARTICLE

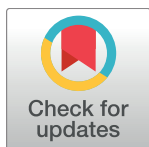
Characterization of HIV-1 CRF90_BF1 and putative novel CRFs_BF1 in Central West, North and Northeast Brazilian regions

Mônica Nogueira da Guarda Reis¹, Gonzalo Bello², Monick Lindenmeyer Guimarães²*, Mariane Martins Araújo Stefani¹✉*

1 Laboratório de Imunologia da AIDS e da Hanseníase, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, UFG, Goiânia, Brazil, **2** Laboratório de AIDS e Imunologia Molecular, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil

✉ These authors contributed equally to this work.

* mmastefani@gmail.com



OPEN ACCESS

Citation: Reis MNdG, Bello G, Guimarães ML, Stefani MMA (2017) Characterization of HIV-1 CRF90_BF1 and putative novel CRFs_BF1 in Central West, North and Northeast Brazilian regions. PLoS ONE 12(6): e0178578. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178578>

Editor: Kok Keng Tee, University of Malaya, MALAYSIA

Received: February 24, 2017

Accepted: May 15, 2017

Published: June 19, 2017

Copyright: © 2017 Reis et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All full, near full and partial genome sequences of HIV-1 are available from the GenBank database accession numbers KY628215-KY628225.

Funding: This work was supported by the "Programa de Apoio a Núcleos de Excelência/PRONEX; Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás/FAPEG; Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico/CNPq (grant number:201210267000801 to MMAS) and by the "Conselho Nacional de

Abstract

The Brazilian AIDS epidemic has been characterized by an increasing rate of BF1 recombinants and so far eight circulating recombinant forms/CRFs_BF1 have been described countrywide. In this study, *pol* sequences (protease/PR, reverse transcriptase/RT) of 87 BF1 mosaic isolates identified among 828 patients living in six Brazilian States from three geographic regions (Central West, North, Northeast) were analyzed. Phylogenetic and bootscan analyses were performed to investigate the evolutionary relationship and mosaic structure of BF1 isolates. Those analyses showed that 20.7% of mosaics (18 out of 87) were CRFs-like isolates, mostly represented by CRF28/CRF29_BF-like viruses (14 out of 18). We also identified five highly supported clusters that together comprise 42 out of 87 (48.3%) BF1 sequences, each cluster containing at least five sequences sharing a similar mosaic structure, suggesting possible new unidentified CRFs_BF1. The divergence time of these five potential new CRFs_BF1 clusters was estimated using a Bayesian approach and indicate that they probably originated between the middle 1980s and the middle 1990s. DNA was extracted from whole blood and four overlapping fragments were amplified by PCR providing full/near full length genomes (FLG/NFLG) and partial genomes. Eleven HIV-1 isolates from Cluster # 5 identified in epidemiologically unlinked individuals living in Central West and North regions provided FLG/NFLG/partial genome sequences with identical mosaic structure. These viruses differ from any known CRF_BF1 reported to date and were named CRF90_BF1 by the Los Alamos National Laboratory. This is the 9th CRF_BF1 described in Brazil and the first one identified in Central West and North regions. Our results highlight the importance of continued molecular screening and surveillance studies, especially of full genome sequences to understand the evolutionary dynamics of the HIV-1 epidemic in a country of continental dimensions as Brazil.

Desenvolvimento Científico e Tecnológico/CNPq Universal grant number: 481208/2012-7 to MMAS). MNGR was supported by a scholarship from FAPEG (grant number: 201410267000598). MMAS is a recipient of a fellowship from CNPq (grant number 308381/2015-7). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Introduction

Human Immunodeficiency Virus-1 (HIV-1) is a highly polymorphic and fast evolving pathogen [1]. Worldwide HIV-1 can be classified into groups (M, N, O and P), and the pandemic group M is classified in subtypes (A-D, F-H, J and K) and sub-subtypes (A1-A4, F1-F2) [2,3]. While mutation rates are similar to other RNA viruses, HIV-1 has a high recombinogenic capacity and intersubtype recombination events are frequent in coinfecting or superinfected individuals from areas where two or multiple variants cocirculate [4]. Recombinant strains exhibiting identical mosaic patterns identified in at least three epidemiologically unlinked individuals have been classified as circulating recombinant forms (CRFs), while the ones displaying unique mosaic structures or only infecting individuals with epidemiological link are known as unique recombinant forms (URFs) [5,6]. Recombination has been recognized as a driving force in shaping the diversity of HIV-1 globally since the mid 90's [7]. Currently, 88 CRFs have been assigned and 81 of them have been published with public data available at the Los Alamos HIV database [<http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/CRFs/CRFs.html>]. CRFs together with URFs are estimated to account for at least 20% of HIV-1 infections worldwide [8].

The Brazilian AIDS epidemic is characterized by the cocirculation of multiple HIV-1 subtypes. Subtype B predominates in most regions followed by subtypes F1, C, and recombinants among these subtypes [9–15]. The first Brazilian BF1 mosaics were identified in the early 90's in the Southeast region which is considered the epicenter of the epidemic [16,17]. Among the 14 CRFs_BF1 described so far, eight originated in Brazil (CRF28_BF, CRF29_BF, CRF39_BF, CRF40_BF, CRF46_BF, CRF70_BF, CRF71_BF and CRF72_BF) [18–22]. The importance of BF1 recombinants in Brazil is further corroborated by the description of countless URFs in all country regions [23–26]. Previous studies from our research group in different study populations in Central West, North and Northeast Brazilian States showed variable prevalence of BF1 recombinants in the *pol* subgenomic fragment: (Goiás: 3.7–18.1%, Mato Grosso: 11.9%, Mato Grosso do Sul: 8.2–25.9%, Tocantins: 7.7%, Maranhão: 7.5%, Piauí: 4.5% [11,27–37].

In this study, previously produced *pol* sequences of BF1 mosaic isolates circulating in Central West, North and Northeast Brazil were reclassified into possible CRFs or URFs. Full/near full-length genome (FLG/NFLG) and partial genome sequences were obtained for the most representative potential CRF detected. These analyzes allowed the identification of the novel CRF90_BF1 that is circulating in Central West and North Brazil, away from the epicenter of the epidemic. Other putative novel CRFs_BF1 are also described. The median time of origin of these mosaics was also estimated. The detailed molecular characterization of recombinant forms circulating countrywide contributes to the mapping of HIV-1 diversity in Brazil.

Material and methods

Study population

Previous studies from our group recruited from 2003 to 2013 a total of 828 individuals infected with HIV-1 residing in six Brazilian States located in three geographic regions (Central West: Goiás/GO, Mato Grosso/MT, Mato Grosso do Sul/MS; North: Tocantins/TO; Northeast: Maranhão/MA, Piauí/PI) (S1 Table) [11,27–37]. These studies have identified a total of 87 (10.5%) BF1 recombinant isolates based on sequencing of *pol* subgenomic fragment covering the protease (PR) and partial reverse-transcriptase (RT) (positions 2253–3251 relative to HXB2 genome). The related research protocols were approved by the institutional Ethics Committee review boards (Goiás: protocols #073/05, #003/2008, #163/2010 at CEPMHA/HC/UFG, Mato Grosso: protocol #435/07 at Universidade Federal do Mato Grosso/UFMT, Mato Grosso do

Sul: protocol #1143 at Universidade Federal do Mato Grosso do Sul/UFMS, Piauí; protocol #022/2011 at Universidade Estadual do Piauí/UESPI, Maranhão: protocol #16/2011 at Hospital de Doenças Tropicais Dr Natan Portela). All patients signed an informed consent form before blood collection for HIV-1 molecular studies.

Amplification of HIV-1 PR/RT

RNA extraction, reverse transcription into complementary DNA (cDNA) and amplification by nested polymerase chain reaction (nested-PCR) of the PR/RT regions were previously described [11,27–37].

Amplification of HIV-1 full length genomes

Genomic DNA was extracted from whole blood samples (QIAamp® DNA Blood Mini Kit/QIAGEN, Qiagen, Hilden, Germany). The complete HIV-1 genome was amplified by nested-PCR employing Platinum Taq DNA polymerase enzyme (Invitrogen, Carlsbad, CA) into four overlapping fragments using HIV-1 specific primers, as following: fragment 1- SCAOSD/LR51 external primers and SCANS/DP11 internal primers (408–2594), fragment 2- DP10/SCCNAS external primers and DP16/SCCOAS internal primers (2253–4830); fragment 3- MMINT8/ED14 external primers and MMINT3/ED12 internal primers (4653–7811); fragment 4- ED5/SCDOAD external primers and JH44/LTR2 internal primers (6954–9625) (S2 Table) [38–40], all positions were relative to HXB2 genome. Isolates with all four fragments completely sequenced were considered full length genomes (FLG); isolates with three complete fragments were considered near full length genomes (NFLG), and isolates with one or two fragment sequences were referred as partial genomes.

DNA sequencing

The amplified DNA fragments from the nested-PCR products were separated by gel electrophoresis, purified (kit QIAquick® PCR Purification Kit/QIAGEN, Qiagen, Hilden, Germany) and sequenced with the *Big Dye Terminator Sequencing Kit v. 3.1* (Applied Biosystems, Foster City, CA) in an automated ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA). Chromatograms were analyzed and edited using the SeqMan software from the package DNASTAR Lasergene (MA, USA).

Phylogenetic and recombination analyses

Sequences were aligned using Clustal X 2.0 implemented in BioEdit 7.2.0 program [41]. Reference sequences of HIV-1 group M subtypes (A-D, F-H, J and K) and CRF-BF1 sequences were obtained from the Los Alamos HIV database (<http://hiv.lanl.gov/>). Phylogenetic trees were generated using the neighbor-joining (NJ) method [42] under the Kimura two-parameter model [43] using MEGA 6.0 software [44]. Bootstrap values (BP, 1,000 replicates) above 70% were considered significant. Recombination analyses were performed in all viral isolates using bootscan implemented in Simplot v3.5.1 software with the following parameters: 200nt or 300nt window, 20nt increments, NJ method under Kimura's two-parameter correction with 100 bootstrap replicates [45]. In this study the parameters used for bootscan analyses of recombinant viruses differed for smaller and larger fragments: for the analyses of pol fragments (998nt) a smaller sliding window of 200nt was used whereas for larger fragments of near full-genomes (>6670nt) a larger sliding window of 300nt was adopted. To better characterize the recombination breakpoints suggested in the previous analyses, the putative recombinants were subjected to informative site analyses as described elsewhere [39]. For this purpose, consensus

sequences from Brazilian HIV-1 subtypes B and F were generated in the DAMBE program [46]. Fragments of sequences assigned to specific HIV-1 subtypes were finally confirmed by separate NJ phylogenetic analysis as described above.

Representative samples from the HIV-1 BF1 Brazilian clusters herein identified were submitted to a Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) analysis in order to recover other Brazilian sequences with high similarity (>95%) and probably similar recombination profile. The BLAST analysis was done sequences using sequences obtained from the Los Alamos HIV database (<http://hiv.lanl.gov/>).

Evolutionary analyses of BF1 recombinants

The time of the most recent common ancestor (T_{MRC}) of HIV-1 BF1 clades was estimated using a Bayesian Markov Chain Monte Carlo (MCMC) approach implemented in BEAST v1.8 [47,48] with BEAGLE to improve run-time [49]. Analyses were performed using the GTR+I+G nucleotide substitution model, a Bayesian Skyline coalescent tree prior [50] and a relaxed uncorrelated lognormal molecular clock model [51] with an informative uniform prior interval ($1.0-3.0 \times 10^{-3}$ nucleotide substitutions per site per year). One MCMC chain was run for 1×10^7 generations. Convergence and uncertainty of parameter estimates were assessed by calculating the effective sample size (ESS) and the 95% highest probability density (HPD) values, respectively using Tracer v1.6 [52]. The maximum clade credibility (MCC) tree was summarized with TreeAnnotator v1.8 and visualized with FigTree v1.4.0.

Data availability

All HIV-1 sequences generated in this study were deposited in the GenBank database (KY628215-KY628225).

Results

Phylogenetic and evolutionary analyses of BF1 *pol* recombinants

Initial phylogenetic analyses of 87 HIV-1 isolates previously characterized as BF1 recombinants in the PR/RT region (S1 Table) classified 18 (21%) sequences as CRF_BF-like (14 CRF28/CRF29_BF-like, two CRF17_BF-like, one CRF12_BF-like and one CRF47_BF-like) and 27 (31%) sequences as URFs_BF (Fig 1). The remaining 42 (48%) sequences were distributed in five clusters comprising between five and 22 sequences, sharing the same mosaic structure and were classified as potential new CRFs_BF1 (Fig 1). Clusters # 1, 3 and 4 displayed high supports ($BP \geq 99\%$) at initial analysis. For Clusters # 2 and 5, however, high supports were obtained only after exclusion of the URFs_BF MS251, BRGO3127 and BRGO4162 sequences (Fig 1). Cluster # 1 had six sequences, from three different States (two from Goiás, three from Maranhão and one from Piauí). Cluster # 2 had five sequences, all from Goiás State. Cluster # 3 comprised four sequences from two States (two from Mato Grosso and two from Goiás). Cluster # 4 had five sequences from three States (one from Goiás, three from Maranhão and one from Piauí). Cluster # 5 contained 22 sequences from three States (20 from Goiás, one from Mato Grosso and one from Tocantins).

A Blast search analysis was performed to identify sequences similar to the five potential new CRF_BF1 Brazilian clusters. The recovered sequences were included in the phylogenetic and recombinant analysis, bootstrap values higher than 87% and similar mosaic profiles compared to those previously classified in Clusters # 3, 4 and 5 was verified (Fig 2). Eighteen sequences branching within Cluster # 3 were recovered from patients recruited in four States from the North region (seven from Amazonas, five from Rondônia, three from Roraima and one from

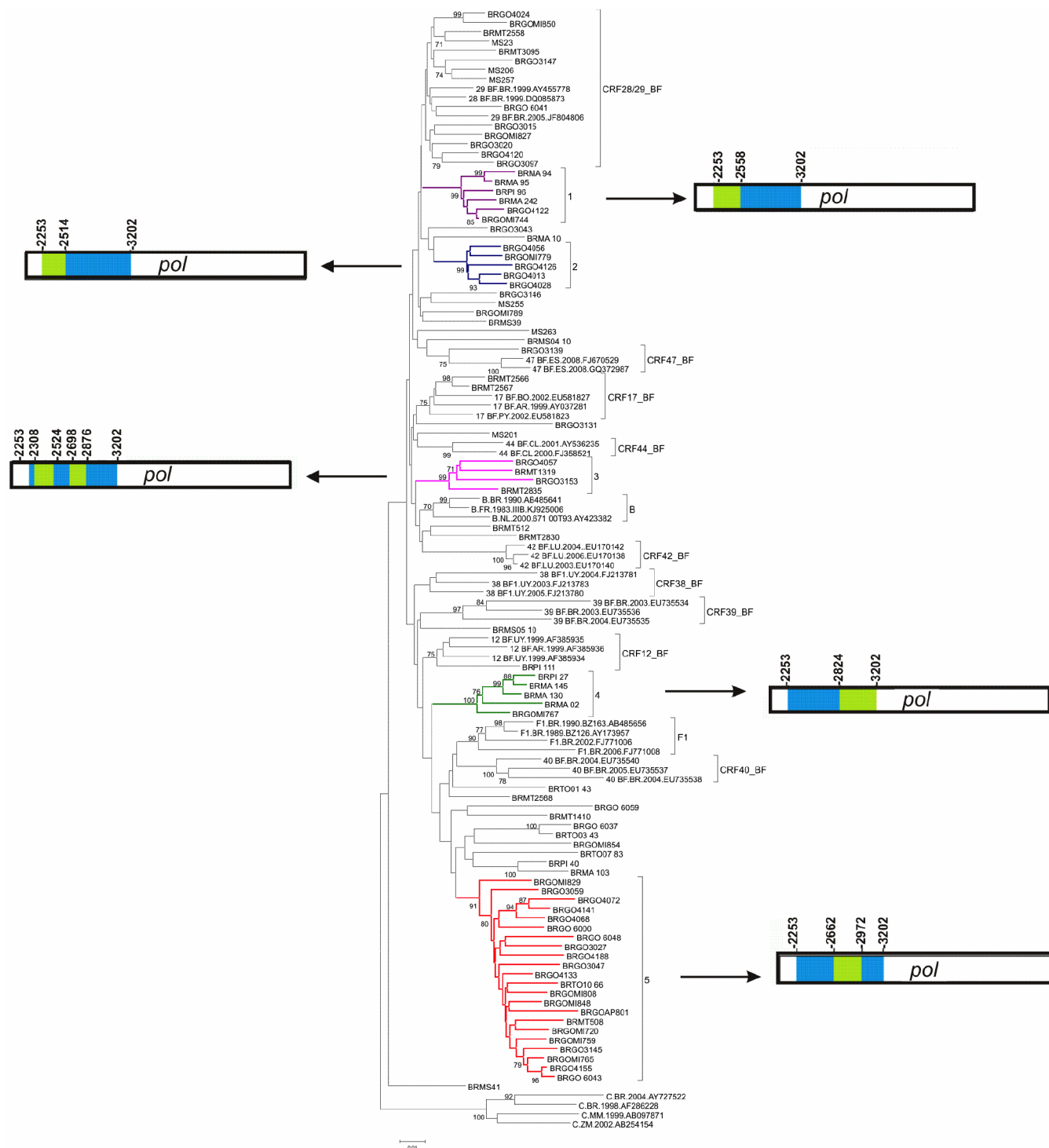


Fig 1. Phylogenetic analysis of 87 *pol* sequences of B/F1 HIV-1 isolates presenting five highly supported clusters and the mosaic pattern of recombination in each cluster (neighbor-joining method, Kimura 2-parameters evolutive model/1000 replicate *bootstrap* values). Bootscanning analyses of BF1 inter-subtype recombinant clusters (# 1–5) are represented. The five clusters identified in our study are indicated by different colors: Cluster # 1: purple, Cluster # 2: blue, Cluster # 3: pink, Cluster # 4: green and Cluster # 5: red. Bootscan analysis was performed in a 200nt sliding window advanced in 20nt step size increments (1.000 replicates). All CRF_BF depicting recombination breakpoints in *pol* region were included in the analysis. In the mosaic structure representations of BF1 isolates, the breakpoint positions according to HXB2 genome numeration are shown on the right and left sides of the clusters, blue stands for subtype B and green stands for subtype F.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178578.g001>

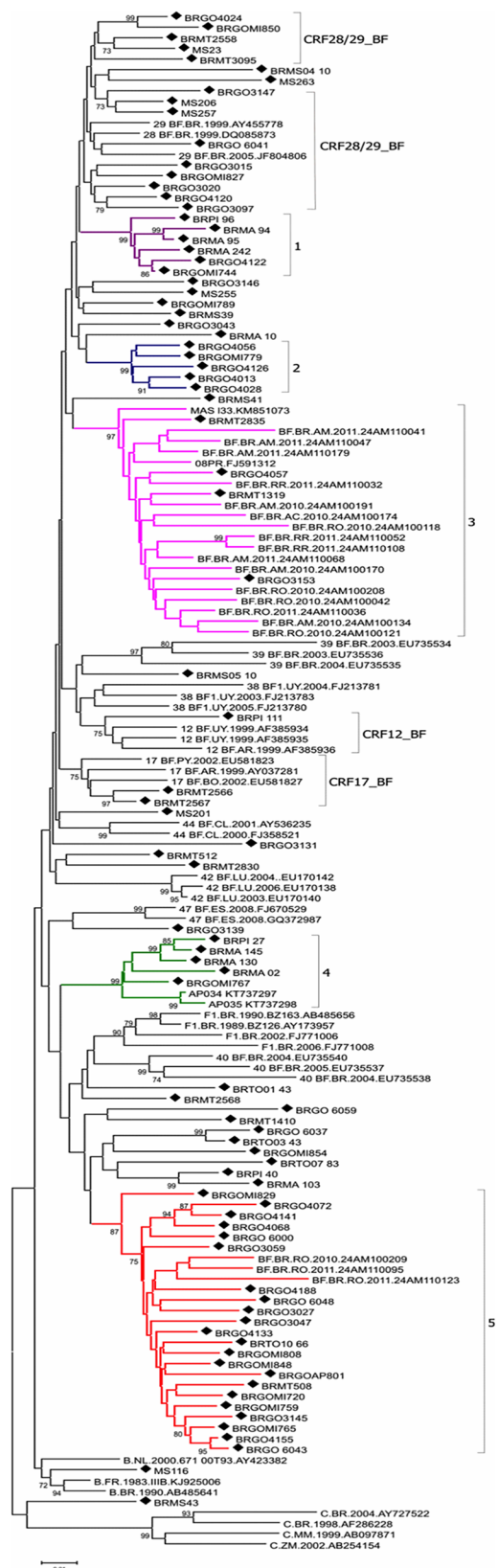


Fig 2. Phylogenetic tree of study BF1 isolates from Central West, North, Northeast and South Brazil and BF1 sequences from GenBank sharing over 95% similarity with study isolates. Trees were constructed using MEGA software, 6.0 version under neighbor-joining and Kimura 2 parameters methods (Bootstrap value over 70%). The sequences described in our study are distinguished from the sequences retrieved from the GenBank by a diamond signal. The five clusters identified in our study are indicated by different colors: Cluster # 1: purple, Cluster # 2: blue, Cluster # 3: pink, Cluster # 4: green and Cluster # 5: red.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178578.g002>

Acre) along with two sequences from the South region (Paraná) (Fig 2). Two sequences from the North region (Amapá) classified in Cluster # 4 and three sequences classified in Cluster # 5 were recovered from patients from the North region (Rondônia) (Fig 2).

The Bayesian MCC tree displayed the same topology of the NJ tree, thus confirming the five BF1 phylogenetic clusters initially described (Fig 3). According to this analysis, the median T_{MRCA} of the five potential new Brazilian CRFs_BF identified was estimated between the middle 1980s and the middle 1990s (Fig 3).

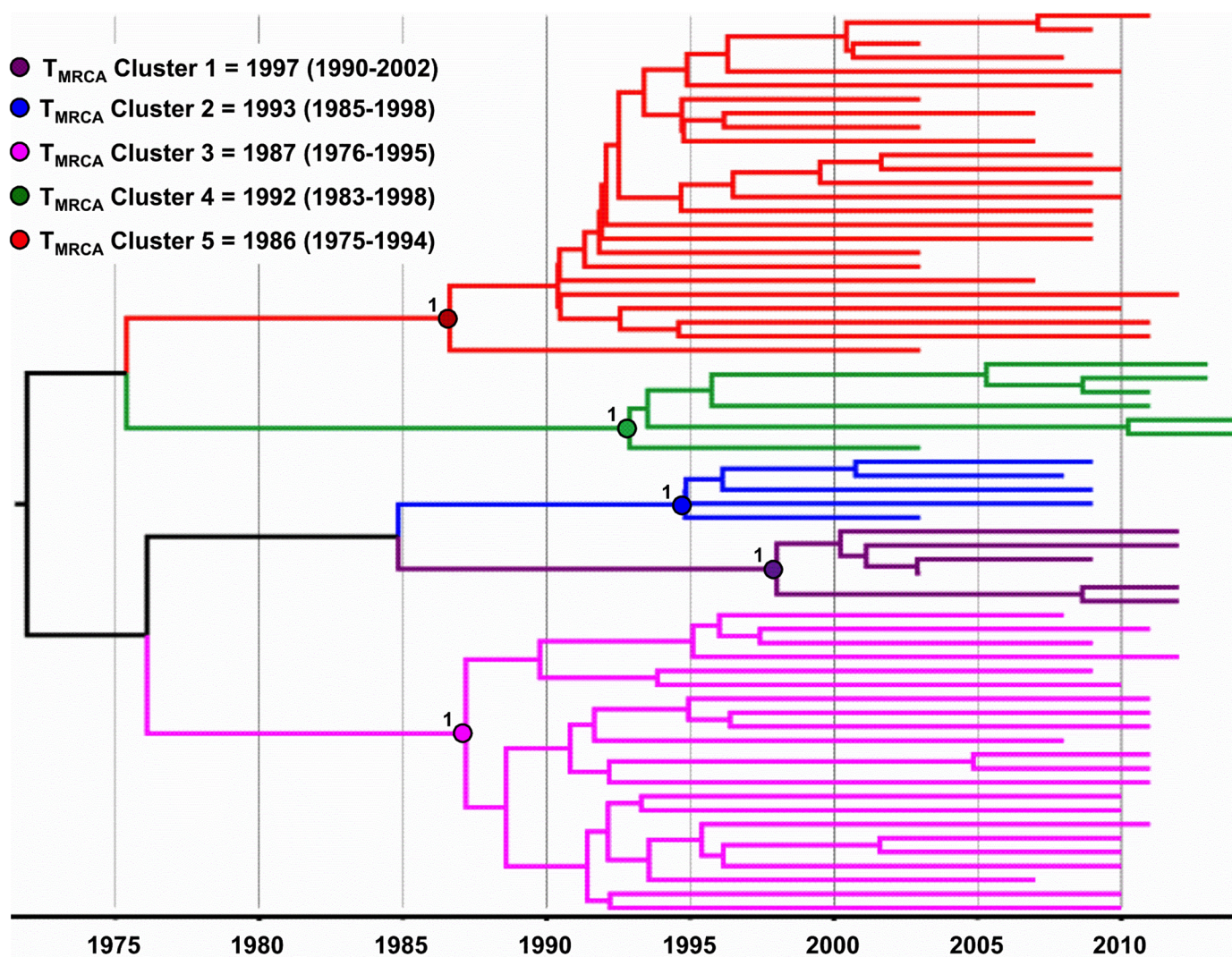


Fig 3. Time-scaled Bayesian MCMC tree of 65 *pol* sequences of BF1 HIV-1 isolates that grouped into five clusters from Central West, North, Northeast and South Brazil. The circles indicate the positions of the MRCA of each BF1 cluster. Branch lengths are depicted in units of time (years). The tree was automatically rooted under the assumption of a relaxed molecular clock. The five clusters identified in our study are indicated by different colors: Cluster # 1: purple, Cluster # 2: blue, Cluster # 3: pink, Cluster # 4: green and Cluster # 5: red.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178578.g003>

Analysis of FLG, NFLG and partial genomes

Phylogenetic (Fig 4) and bootscan analyses of six full length genomes (BRGOAP801, BRGO6043, BRTO10_66, BRGO4141, BRGO3145 and BRGO3047) obtained from isolates classified in Cluster # 5 allowed the description of a new recombinant lineage designated CRF90_BF1 by the Los Alamos HIV Sequence Database (Los Alamos National Laboratory) according to the standardized nomenclature [2]. We also obtained one NFLG and four partial genomes for isolates from this Cluster that share the same mosaic structure (Fig 5). The mosaic structures inferred from the analyses of these FLG, NFLG and partial genomes showed a genome predominantly of subtype B, which can be divided into seven subregions alternating subtypes B and F1. These seven subregions were named I (626–2.661), II (2.662–2.971), III (2.972–4.295), IV (4.296–4.759), V (4.760–8.671), VI (8.672–9.492) and VII (9.493–9.612) all positions relative to HXB2 genome. Subregion NJ analyses also confirmed the putative parental HIV-1 subtype (Fig 5). Fully coincident intersubtype breakpoint locations at I–III sub regions were also observed in the NFLG of BRGO4188 isolate and in the partial genome sequences of BRMT508, BRGO3027, BRGO3059 and BRGO6048 isolates (Fig 5 and Table 1).

The epidemiological features of the 11 patients presenting the newly described CRF90_BF1 lineage included six females (four of them pregnant) and five males (two of them prisoners) (Table 1). The prevailing risk category was heterosexual sex reported by nine patients while one prisoner patient reported intravenous drug use. Six patients were ARV naïve and five had been exposed to ARV drugs either as highly active antiretroviral therapy (HAART) or temporary mother-to-child-transmission (MTCT) prophylaxis. Most patients were from the Central West region (Goiás State: isolates BRGO3027, BRGO3047, BRGO3145, BRGO3059, BRGO4188, BRGO4141, BRGO6048, BRGOAP801 and BRGO6043; Mato Grosso State: isolate BRMT508) and one patient lived in the North region (Tocantins State: isolate BRTO10_66).

Discussion

In this study, we report the characterization of a novel HIV-1 CRF_BF1, named CRF90_BF1 based on six FLG, one NFLG and four partial genome sequences. These isolates shared identical mosaic structures and were identified in individuals without any epidemiological link that live in two distinct geographic regions in Brazil (Central West and North) located around 800–900 km apart. These criteria fulfill the requirements to define a new CRF, which is circulating in distant interior urban areas in Brazil. This novel CRF is the 9th CRF involving subtypes B and F1 described in Brazil and the 14th reported in South America. The estimated frequency of the CRF90_BF1 in our sample set was 1.3% (11/828), with predominant detection in the Central West region. However, the actual prevalence of this new CRF in these geographic regions cannot be accurately estimated since there is limited molecular data on HIV-1 isolates especially from the States of Mato Grosso, Mato Grosso do Sul and Tocantins.

The CRF12_BF, the first CRF identified in the Americas was described in 2001 in patients from Argentina and Uruguay and its origin was estimated around the early 80s [53,54], while BF1 recombinants were first reported in Brazil in the early 90's [16,17]. Patients harboring the CRF90_BF1 were diagnosed between 2002 and 2011. The median estimated T_{MRC} of the CRF90_BF1 and of other putative CRF_BF1 clusters identified in our study is not recent and ranges from middle 80's to middle 90's, similar to that previously estimated for Brazilian CRF28_BF and CRF29_BF [55]. These estimates indicate that CRFs_BF1 have been probably circulating in Brazil for three to four decades.

Besides its early generation, we have evidences, as shown by blast search analyses, that the CRF90_BF1 and also the other putative CRFs_BF1 clades identified here have a wide geographic circulation (Fig 6). The CRF90_BF1 that we identified in Central West (Goiás and

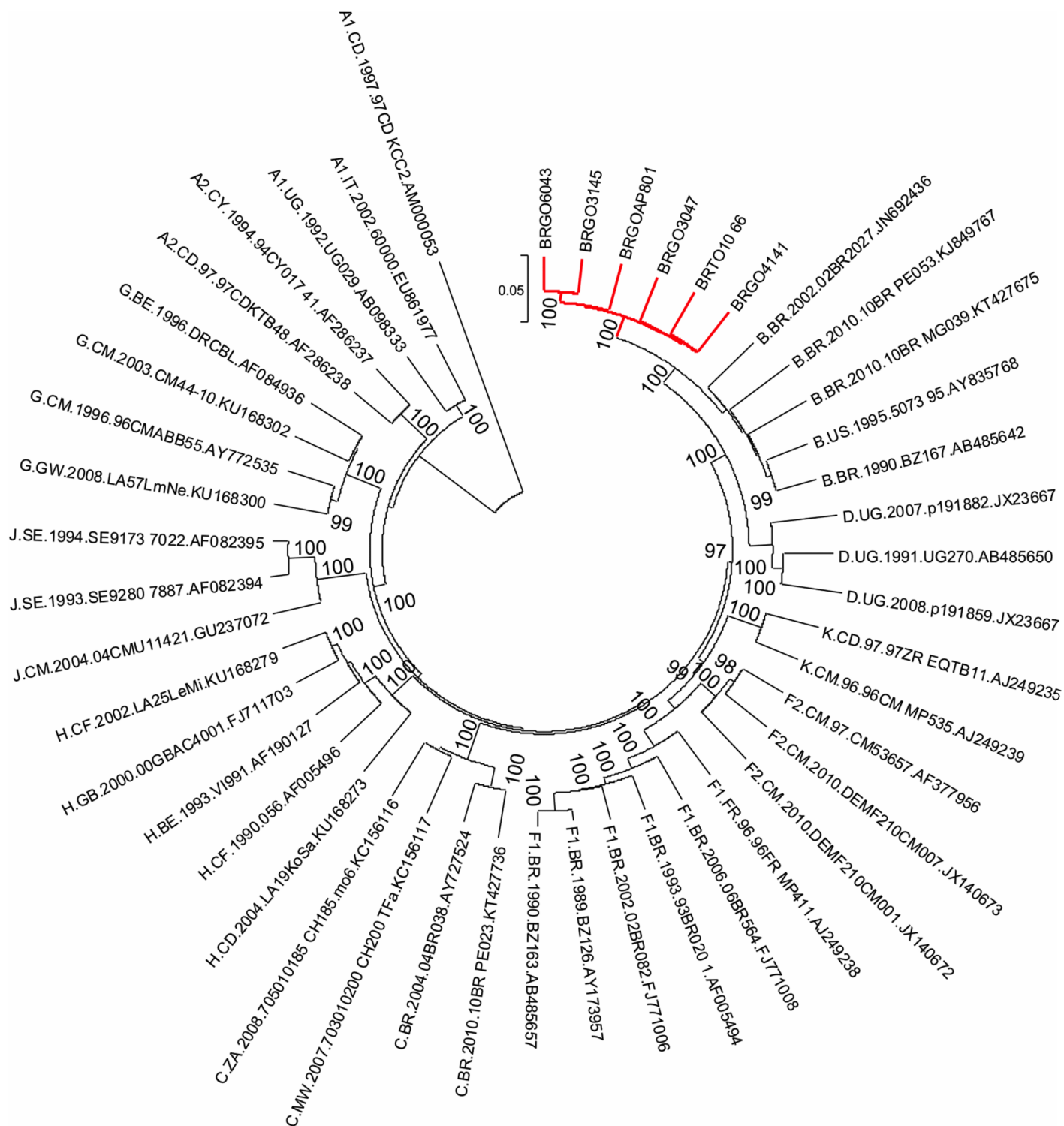


Fig 4. Phylogenetic analyses on the full length/near-full-length genome sequences of HIV-1 BF1 isolates from cluster # 5 belonging to a new CRF90_BF1 identified in patients from Goiás and Tocantins States in the Central West and North Brazilian regions. The HIV group M reference sequences of subtypes were obtained from the Los Alamos database. The scale bar represents 0.02 nucleotide substitutions per site. Phylogenetic analyses were constructed with Mega software version 6.0.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178578.g004>

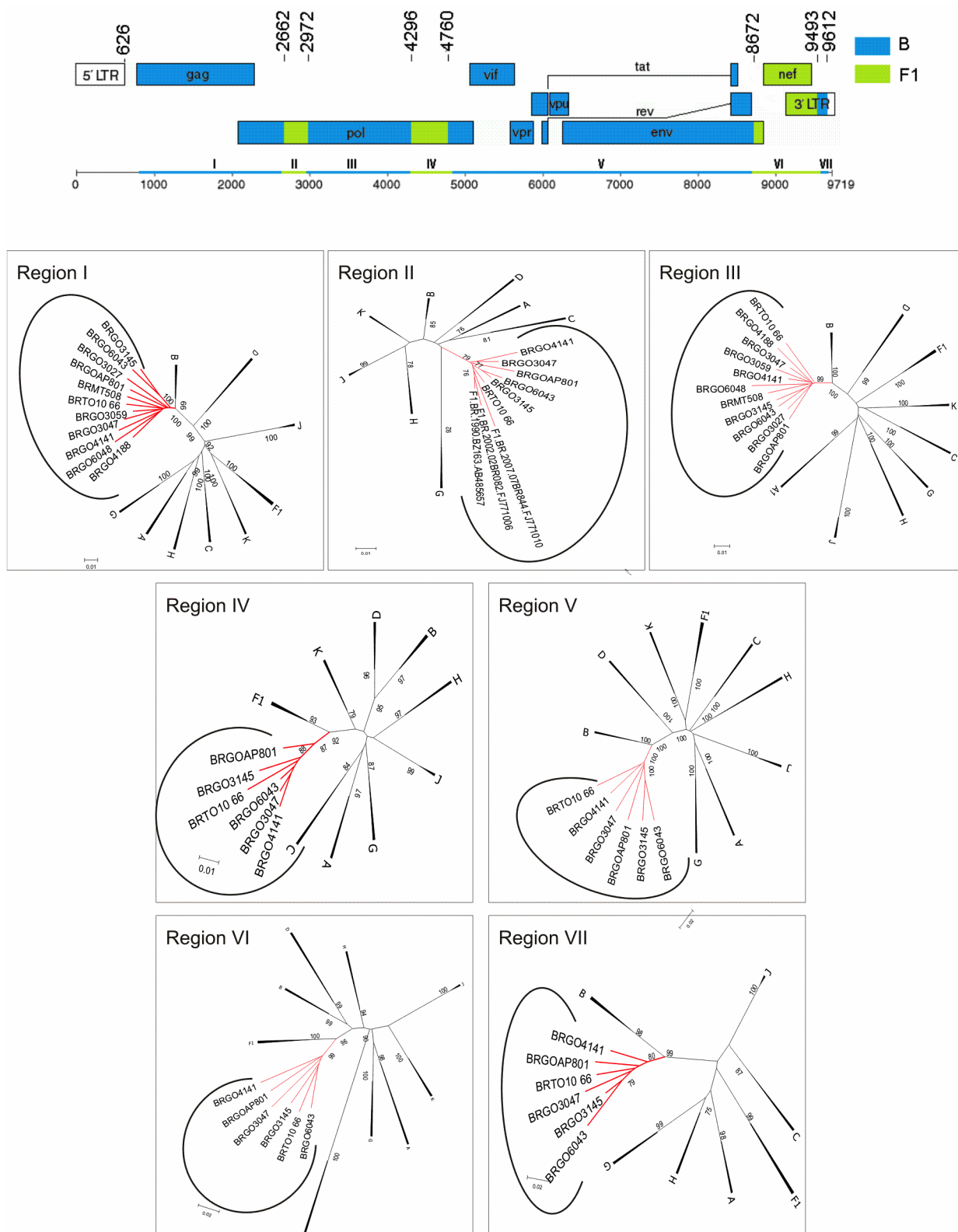


Fig 5. Mosaic structure of the new CRF composed by subtypes B and F1. Breakpoint positions according to HXB2 genome numbering system are indicated. The phylogenetic trees for each of the seven mosaic segments (I-VII) were constructed with Mega software v6.0 and the trees were midpoint rooted. The stability of each node was confirmed by bootstrapping with 1.000 replicates and

only significant bootstrap values >70% are shown at the corresponding nodes. The genetic distance corresponding to the length of the branches is shown by the line at the bottom. The red color represents the CRF90_BF1 identified in this study.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178578.g005>

Mato Grosso) and North Brazil (Tocantins) is probably also circulating in Rondônia, another State in the North region which borders Bolivia in the South/East. HIV-1 BF1 isolates with the same recombination pattern of isolates from Cluster # 3 detected in Central West were also identified in several North Brazilian States (Amazonas, Rondônia, Roraima and Acre), and in the South State of Paraná. Isolates with similar recombination profile of isolates from Cluster # 4 were also identified in the North region (Amapá State) besides the Central West (Goiás) and Northeast Brazil (Maranhão and Piauí). These results suggest the existence of novel CRFs_BF1 circulating in Brazil.

CRF28_BF and CRF29_BF described in the Southeast in 2006 (Santos, São Paulo State) represent the first Brazilian CRFs, and their origin date to 1988–1989 [18,55]. Studies have shown a low prevalence of CRF28_BF and CRF29_BF [14,56], outside São Paulo except in Salvador, Bahia State, Northeast where prevalence ranged from 10%–21% [57,58]. Among all BF1 isolates identified in our study we have found a moderate rate of CRF28/CRF29_BF-like isolates (16.1%, 14 out of 87) and an overall rate of 1.7% (14 out of 828) which represent one of the highest frequencies of these CRFs identified outside São Paulo State.

Despite the predominance of subtype B in most geographic Brazilian regions, except in the South where subtype C prevails, studies have shown that the prevalence of non-B subtypes, particularly URFs_BF1 and URFs_BC has increased in the last decade [15,25,40,59,60]. Our studies have shown a significant percentage of recombinant BF1 forms (3.7–25.9%) in the Central West, North and Northeast Brazilian regions [11,27–37]. The most recently described Brazilian CRFs_BF1 (CRF70_BF1 and CRF71_BF1) were identified among blood donors from Pernambuco State, Northeast region [22]. The CRF72_BF1 was identified among blood donors from five public blood banks in Minas Gerais State, Southeast region [21]. These recent data point out the increasing generation and spread of CRFs, especially involving subtypes B and F1 which play an important role in the Brazilian AIDS epidemic. However, the number of complete genome sequences available is still limited, especially sequences from areas away from the epicenter, as our study areas (Central West, North and Northeast) suggesting that

Table 1. Demographic characteristics of study subjects infected by HIV-1 CRF90_BF1.

Sample ID	ARV status	Gender	Age	Risk Group	HIV Diagnosis (Year)	Sample Collection (Year)	HXB2 location (nt)	Accession Number
BRGOAP801	HAART	M	59	Heterosexual	2007	2010	407–9626	KY628223
BRGO6043	Naïve	F	30	Heterosexual	2011	2011	407–9626	KY628221
BRTO10_66	Naïve	F	27	Heterosexual	2009	2009	407–9616	KY628225
BRGO4141	Prophylaxis	F	24	Heterosexual	2010	2010	408–9615	KY628219
BRGO3145	HAART	F	35	Heterosexual	2004	2007	407–9612	KY628218
BRGO3047	HAART	M	47	NA	2002	2007	474–9589	KY628216
BRGO4188	Prophylaxis	F	27	Heterosexual	2006	2010	407–7080*	KY628220
BRGO3027	Naïve	M	27	IDU	2002	2007	453–5924*	KY628215
BRMT508	Naïve	M	41	Heterosexual	2009	2009	414–5919*	KY628224
BRGO3059	Naïve	M	51	Heterosexual	2007	2007	407–4778*	KY628217
BRGO6048	Naïve	F	30	Heterosexual	2009	2012	454–4122*	KY628222

M: Male; F: Female; Naïve: antiretroviral naïve patients; HAART: Patients under highly active antiretroviral therapy; Prophylaxis: mother-to-child-transmission antiretroviral prophylaxis (MTCT ARV prophylaxis); IDU: intravenous drug user; N.A.: not available

* isolates with partial genome sequences; Isolates are listed according to the size of sequenced fragments. nt: nucleotide position

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178578.t001>

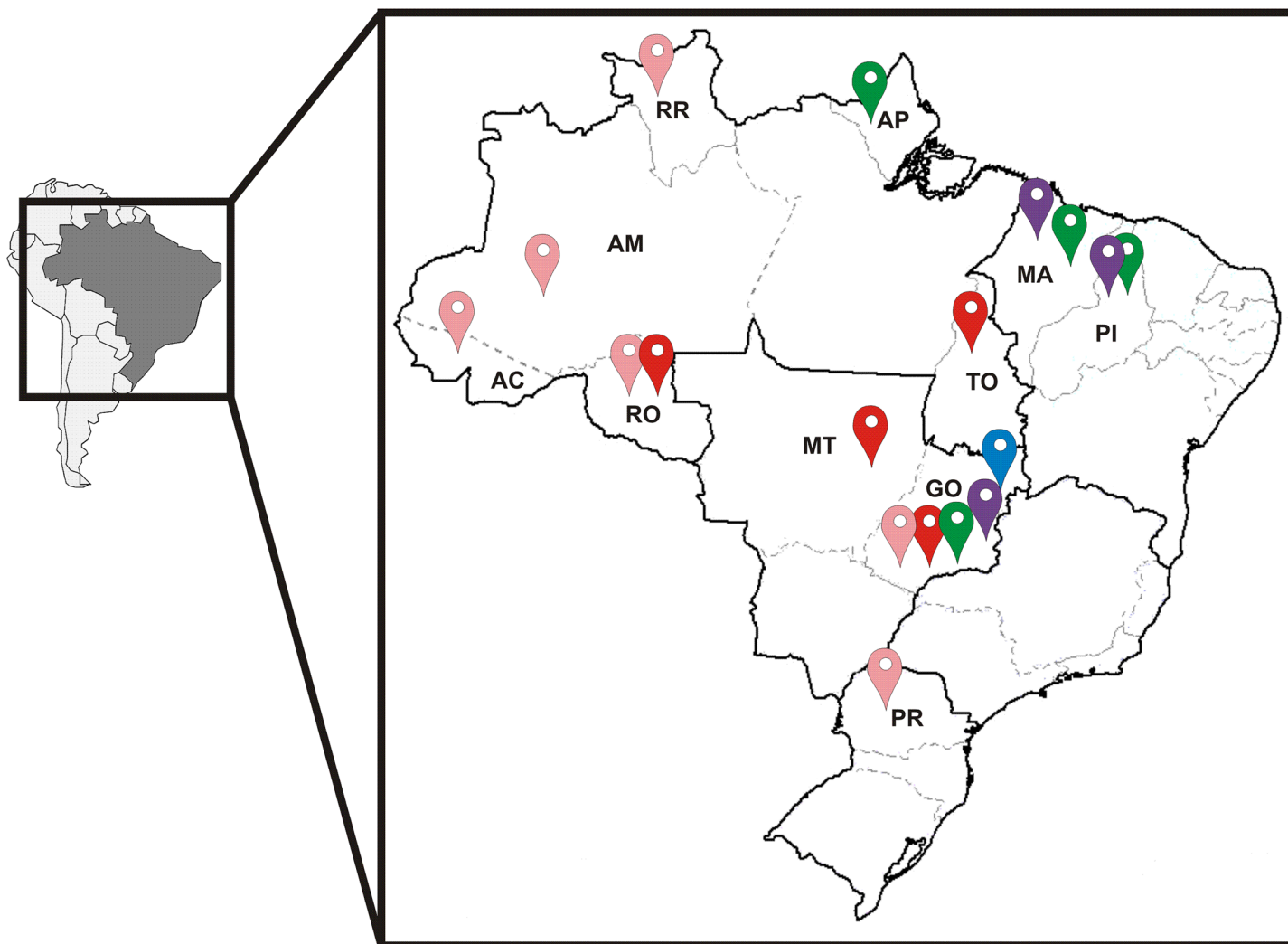


Fig 6. South America map highlighting Brazil. Color marks indicate the possible geographical area of circulation of BF1 isolates identified in Central West, North, Northeast and South Brazil and BF1 sequences from GenBank sharing over 95% similarity with study isolates from Clusters # 1–5. In the Brazilian map, each colored mark represents the geographic area of potential circulation of: Cluster # 1-purple, Cluster # 2-blue, Cluster # 3-pink, Cluster # 4-green, Cluster # 5-red.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178578.g006>

the actual proportion of HIV-1 recombinant forms in the Brazilian pandemic is probably underestimated.

Conclusions

In summary, we identified the novel CRF90_BF1 among heterosexual patients living in two geographic regions in Brazil, away from the epicenter of the epidemic. This is the 9th CRF_BF1 described in Brazil indicating that continued molecular screening and surveillance are necessary to fully understand the evolutionary dynamics of the HIV-1 epidemic in such a country of continental dimensions. Our results also underscore the importance of full-length genome sequencing of HIV-1 isolates obtained from patients infected by different transmission routes and in different country regions to fully understand the diversity and complexity of the HIV-1 epidemic in Brazil.

Supporting information

S1 Table. Prevalence of BF1 recombinants identified in previous studies among patients from six Brazilian States: Goiás/ GO, Mato Grosso/ MT, Mato Grosso do Sul/MS, Tocantins/TO, Piauí/PI and Maranhão/MA. Pregnant: women infected with HIV-1 attending a regional antenatal care; Naïve: antiretroviral naïve patients; HAART: Patients under highly active antiretroviral therapy. * Ref 29: the study group (n = 27) comprises prisoner patients recruited in Goiania/GO (n = 7) and in Campo Grande (n = 20). (DOCX)

S2 Table. List of HIV-1 primers used in the present study for full length genome amplification. *Some primers had their original sequence modified based on the alignment of subtypes B, C and F1 HIV sequence compendium (2005) from HIV Los Alamos Database. (DOCX)

Acknowledgments

We are thankful to all participants of this study and to the institutions where they were recruited. We are also grateful to Dr. Vera Saddi (PUC/GO) for sharing sequencing equipment with us.

Author Contributions

Conceptualization: MMAS.

Data curation: MNGR MLG GB MMAS.

Formal analysis: MNGR MLG GB MMAS.

Funding acquisition: MMAS MLG.

Investigation: MNGR MLG.

Methodology: MNGR MLG GB MMAS.

Project administration: MMAS.

Resources: MMAS.

Supervision: MMAS.

Validation: MMAS MNGR GB MLG.

Visualization: MMAS MNGR GB MLG.

Writing – original draft: MMAS MNGR.

Writing – review & editing: MMAS MNGR GB MLG.

References

1. Robertson DL, Hahn BH, Sharp PM. Recombination in AIDS viruses. *J Mol Evol.* 1995; 40(3):249–59. PMID: [7723052](#)
2. Robertson DL, Anderson JP, Bradac JA, Carr JK, Foley B, Funkhouser RK, et al. HIV-1 nomenclature proposal. *Science.* 2000; 288(5463):55–56 PMID: [10766634](#)
3. Tebit DM and Arts EJ. Tracking a century of global expansion and evolution of HIV to drive understanding and to combat disease. *Lancet Infect Dis.* 2011; 11(1):45–56. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(10\)70186-9](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(10)70186-9) PMID: [21126914](#)

4. Thomson MM, Nájera R. Molecular epidemiology of HIV-1 variants in the global AIDS pandemic: an update. *AIDS Rev.* 2005; 7(4):210–24. PMID: [16425961](#)
5. Thomson MM, Pérez-Alvarez L, Nájera R. Molecular epidemiology of HIV-1 genetic forms and its significance for vaccine development and therapy. *Lancet Infect Dis.* 2002; 2(8):461–471. Review. PMID: [12150845](#)
6. Nájera R, Delgado E, Pérez-Alvarez L, Thomson MM. Genetic recombination and its role in the development of the HIV-1 pandemic. *AIDS.* 2002; Suppl 4:S3–16.
7. Gao F, Robertson D L, Morrison S G, Hui H, Craig S, Decker J, et al. The heterosexual human immunodeficiency virus type 1 epidemic in Thailand is caused by an intersubtype (A/E) recombinant of African origin. *J Virol.* 1996; 70(10):7013–7029. PMID: [8794346](#)
8. Hemelaar J, Gouws E, Ghys PD, Osmanov S. WHO-UNAIDS Network for HIV Isolation and Characterization 2011. Global trends in molecular epidemiology of HIV-1 during 2000–2007. *AIDS.* 2011; 25(5):679–689. <https://doi.org/10.1097/QAD.0b013e328342ff93> PMID: [21297424](#)
9. Brindeiro RM, Diaz RS, Sabino EC, Morgado MG, Pires IL, Brigido L, et al. Brazilian Network for HIV Drug Resistance Surveillance (HIV-BResNet): a survey of chronically infected individuals. *AIDS.* 2003; 17(7):1063–9. <https://doi.org/10.1097/01.aids.0000060345.12269.d7> PMID: [12700457](#)
10. Inocencio LA, Pereira AA, Sucupira MC, Fernandez JC, Jorge CP, Souza DF, et al. Brazilian Network for HIV Drug Resistance Surveillance: a survey of individuals recently diagnosed with HIV. *J Int AIDS Soc.* 2009; 18;12:20.
11. Cardoso LP, Queiroz BB, Stefani MM. HIV-1 pol phylogenetic diversity and antiretroviral resistance mutations in treatment naïve patients from Central West Brazil. *J Clin Virol.* 2009; 46(2):134–139. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2009.07.009> PMID: [19682948](#)
12. Alencar CS, Sabino EC, Carvalho SM, Leao SC, Carneiro-Proietti AB, Capuani L, 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;1; 63(3):387–92. <https://doi.org/10.1097/QAI.0b013e31828ff979> PMID: [23507660](#)
13. Silveira J, Santos AF, Martínez AM, Góes LR, Mendoza-Sassi R, Muniz CP, et al. Heterosexual transmission of human immunodeficiency virus type 1 subtype C in southern Brazil. *J Clin Virol.* 2012; 54(1):36–41. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2012.01.017> PMID: [22326760](#)
14. Guimarães ML, Marques BC, Bertoni N, Teixeira SL, Morgado MG, Bastos FI, et al. Assessing the HIV-1 Epidemic in Brazilian Drug Users: Molecular Epidemiology Approach. *PLoS One.* 2015; 10(11): e0141372. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0141372> PMID: [26536040](#)
15. da Costa CM, Costa de Oliveira CM, Chehuan de Melo YF, Delatorre E, Bello G, Couto-Fernandez JC. High HIV-1 Genetic Diversity in Patients from Northern Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2016; 32(9):918–22. <https://doi.org/10.1089/AID.2016.0044> PMID: [27091699](#)
16. Sabino EC, Shpaer EG, Morgado MG, Korber BT, Diaz RS, Bongertz V, 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(10):6340–6. PMID: [8083973](#)
17. Ramos A, Tanuri A, Schechter M, Rayfield MA, Hu DJ, Cabral MC, et al. Dualand recombinant infections: an integral part of the HIV-1 epidemic in Brazil. *Emerg Infect Dis.* 1999; 5(1):65–74. <https://doi.org/10.3201/eid0501.990108> PMID: [10081673](#)
18. De Sá Filho DJ, Sucupira MC, Caseiro MM, Sabino EC, Diaz RS, Janini LM. Identification of two HIV type 1 circulating recombinant forms in Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2006; 22(1):1–13. <https://doi.org/10.1089/aid.2006.22.1> PMID: [16438639](#)
19. Guimarães ML, Eyer-Silva WA, Couto-Fernandez JC, Morgado MG. Identification of two new CRF_BF in Rio de Janeiro State, Brazil. *AIDS.* 2008; 22(3):433–435. <https://doi.org/10.1097/QAD.0b013e3282f47ad0> PMID: [18195572](#)
20. Sanabani SS, Pastena ER, Neto WK, Martinez VP, Sabino EC. Characterization and frequency of a newly identified HIV-1 BF1 intersubtype circulating recombinant form in São Paulo, Brazil. *Virol J.* 2010; 16;7:74.
21. Pessôa R, Carneiro Proietti AB, Busch MP, Sanabani SS. Identification of a Novel HIV-1 Circulating Recombinant Form (CRF72_BF1) in Deep Sequencing Data from Blood Donors in Southeastern Brazil. *Genome Announc.* 2014a; 12; 2(3).
22. Pessôa R, Watanabe JT, Calabria P, Felix AC, Loureiro P, Sabino EC, 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.* 2014b; 17; 9(11):e112674.
23. Guimarães ML, Couto-Fernandez JC, Eyer-Silva Wde A, Teixeira SL, Chequer-Fernandez SL, Morgado MG. Analysis of HIV-1 BF pr/rt recombinant strains from Rio de Janeiro/Brazil reveals multiple

- unrelated mosaic structures. *Infect Genet Evol.* 2010; 10(7):1094–100. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2010.07.001> PMID: 20621204
24. Sanabani SS, Pastena ÉR, da Costa AC, Martinez VP, Kleine-Neto W, de Oliveira AC, et al. Characterization of partial and near full length genomes of HIV-1 strains sampled from recently infected individuals in São Paulo, Brazil. *PLoS One.* 2011; 6(10):e25869. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025869> PMID: 22022460
25. Sanabani SS, Pessôa R, Soares de Oliveira AC, Martinez VP, Giret MT, de Menezes Succi RC, et al. Variability of HIV-1 genomes among children and adolescents from São Paulo, Brazil. *PLoS One.* 2013; 8(5):e62552. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062552> PMID: 23667488
26. Pessôa R, Loureiro P, Esther Lopes M, Carneiro-Proietti AB, Sabino EC, Busch MP, et al. Ultra-Deep Sequencing of HIV-1 near Full-Length and Partial Proviral Genomes Reveals High Genetic Diversity among Brazilian Blood Donors. *PLoS One.* 2016; 11(3):e0152499. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152499> PMID: 27031505
27. Cardoso LPV, Stefani MMA. High level of multidrug resistance mutations in HIV type 1 pol gene and resistance-associated mutations to enfuvirtide (T-20) among antiretroviral-experienced patients from central Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2009; 25:943–950. <https://doi.org/10.1089/aid.2009.0060> PMID: 19792869
28. Cardoso LPV, Pereira GAS, Viegas AA, Schmaltz LEPR, Stefani MMA. HIV-1 primary and secondary antiretroviral drug resistance and genetic diversity among pregnant women from Central Brazil. *Journal of Medical Virology.* 2010; 82:351–357. <https://doi.org/10.1002/jmv.21722> PMID: 20087934
29. Cardoso LP, da Silveira AA, Francisco RB, da Guarda Reis MN, Stefani MM. Molecular characteristics of HIV type 1 infection among prisoners from Central Western Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2011; 27(12):1349–1353. <https://doi.org/10.1089/aid.2011.0153> PMID: 21732793
30. Ferreira AS, Cardoso LP, Stefani MM. 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(8):1301–1307. <https://doi.org/10.1002/jmv.22128> PMID: 21678433
31. Carvalho BC, Cardoso LP, Damasceno S, Stefani MM. 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.* 2011; 27(10):1081–1087. <https://doi.org/10.1089/AID.2010.0334> PMID: 21417758
32. Silveira AA, Cardoso LP, Francisco RB, de Araújo Stefani MM. HIV type 1 molecular epidemiology in pol and gp41 genes among naïve patients from Mato Grosso do Sul State, central western Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2012; 28(3):304–307. <https://doi.org/10.1089/aid.2011.0128> PMID: 21790471
33. Alcântara KC, Lins JB, Albuquerque M, Aires LM, Cardoso LP, Minuzzi AL, et al. HIV-1 mother-to-child transmission and drug resistance among Brazilian pregnant with high Access to diagnosis and prophylactic measures. *Journal of Clinical Virology.* 2012; 54:15–20. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2012.01.011> PMID: 22317908
34. da Costa ZB, de Lima YA, Martelli CM, Stefani MM. Transmitted HIV resistance among pregnant young women infected with HIV-1 in Brazil. *AIDS Patient Care STDS.* 2013; 27(8):439–441. <https://doi.org/10.1089/apc.2012.0448> PMID: 23968204
35. Moura ME, Reis MN, Lima YA, Eulálio KD, Cardoso LP, Stefani MM. Low rate of transmitted drug resistance may indicate low access to antiretroviral treatment in Maranhão State, northeast Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2015a; 31(2):250–4.
36. Moura ME, da Guarda Reis MN, Lima YA, Eulálio KD, Cardoso LP, Stefani MM. HIV-1 transmitted drug resistance and genetic diversity among patients from Piauí State, Northeast Brazil. *J Med Virol.* 2015b; 87(5):798–806.
37. Lima YA, Cardoso LP, Reis MN, Stefani MM. Incident and long term HIV-1 infection among pregnant women in Brazil: Transmitted drug resistance and mother-to-child transmission. *J Med Virol.* 2016; 88(11):1936–43. <https://doi.org/10.1002/jmv.24540> PMID: 27037910
38. Delwart EL, Shpaer EG, Louwagie J, McCutchan FE, Grez M, Rubsamen-Waigmann H, et al. Genetic relationship determined by a DNA heteroduplex mobility assay: analysis of HIV-1 env genes. *Science.* 1993; 19; 262(5137):1257–61. PMID: 8235655
39. Sierra M, Thomson MM, Rios M, Casado G, Castro RO, Delgado E, 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 CRF12_BF. *Infect. Genet. Evol.* 2005; 5:209–217. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2004.07.010> PMID: 15737911
40. Passaes CP, Bello G, Lorete RS, Matos Almeida SE, Junqueira DM, Veloso VG, et al. Genetic characterization of HIV-1 BC recombinants and evolutionary history of the CRF31_BC in Southern Brazil. *Infect Genet Evol.* 2009; 9(4):474–82. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2009.01.008> PMID: 19460312

41. Thompson JD, Higgins DS, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 1994; 22:4673–4680. PMID: [7984417](#)
42. Nei M & Kumar S. *Molecular Phylogenetics and Evolution.* Oxford University. 2002; 3:567–568
43. Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol.* 1980; 16:111–120. PMID: [7463489](#)
44. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol Biol Evol.* 2013; 30(12): 2725–2729. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst197> PMID: [24132122](#)
45. Lole KS, Bollinger RC, Paranjape RS, Gadkari D, Kulkarni SS, Novak NG, 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(1):152–160. PMID: [9847317](#)
46. Xia X., Xie Z. DAMBE: software package for data analysis in molecular biology and evolution. *J. Hered.* 2001; 92,371–373. PMID: [11535656](#)
47. Drummond AJ, Nicholls GK, Rodrigo AG, Solomon W. Estimating mutation parameters, population history and genealogy simultaneously from temporally spaced sequence data. *Genetics.* 2002; 161:1307–1320. PMID: [12136032](#)
48. Drummond AJ, Rambaut A. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evol Biol.* 2007; 7:214. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-7-214> PMID: [17996036](#)
49. Suchard MA, Rambaut A. Many-core algorithms for statistical phylogenetics. *Bioinformatics.* 2009; 25:1370–1376. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp244> PMID: [19369496](#)
50. Drummond AJ, Rambaut A, Shapiro B, Pybus OG. Bayesian coalescent inference of past population dynamics from molecular sequences. *Mol Biol Evol.* 2005; 22:1185–1192. <https://doi.org/10.1093/molbev/msi103> PMID: [15703244](#)
51. Drummond AJ, Ho SY, Phillips MJ, Rambaut A. Relaxed phylogenetics and dating with confidence. *PLoS Biol.* 2006; 4:e88. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040088> PMID: [16683862](#)
52. Rambaut A, Drummond A. 2007 Tracer v1.6. Available from <http://treebioedacuk/software/tracer/>
53. Carr JK, Avila M, Gomez Carrillo M, Salomon H, Hierholzer J, Watanaveeradej V, et al. Diverse BF recombinants have spread widely since the introduction of HIV-1 into South America. *AIDS.* 2001; 19; 15(15):F41–7. PMID: [11600844](#)
54. Bello G, Aulicino PC, Ruchansky D, Guimarães ML, Lopez-Galindez C, Casado C, et al. Phylodynamics of HIV-1 Circulating Recombinant Forms 12_BF and 38_BF in Argentina and Uruguay. *Retrovirology.* 2010; 7:22. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-7-22> PMID: [20307282](#)
55. Ristic N, Zukurov J, Alkimim W, Diaz RS, Janini LM, Chin MP. 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.* 2011; 6(3):e17485. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017485> PMID: [21390250](#)
56. De Sa-Filho DJ, Ambar RF, Duarte NB, Matias RB, Candido V, Gagliani LH, et al. HIV type 1 diversity from newly diagnosed patients in Santos metropolitan area/Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2009; 25(9):925–9. <https://doi.org/10.1089/aid.2009.0073> PMID: [19689200](#)
57. Monteiro-Cunha JP, Araujo AF, Santos E, Galvao-Castro B, Alcantara LC. Lack of high-level resistance mutations in HIV type 1 BF recombinant strains circulating in northeast Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2011; 27(6):623–31. <https://doi.org/10.1089/AID.2010.0126> PMID: [21087197](#)
58. Santos LA, Monteiro-Cunha JP, Araujo AF, Brites C, Galvao-Castro B, Alcantara LC. Detection of distinct human immunodeficiency virus type 1 circulating recombinant forms in northeast Brazil. *J Med Virol.* 2011; 83(12):2066–72. <https://doi.org/10.1002/jmv.22170> PMID: [22012712](#)
59. Barreto CC, Nishyia A, Araújo LV, Ferreira JE, Busch MP, Sabino EC. Trends in antiretroviral drug resistance and clade distributions among HIV-1 infected blood donors in Sao Paulo, Brazil. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2006; 41(3):338–41. <https://doi.org/10.1097/01.qai.0000199097.88344.50> PMID: [16540943](#)
60. Prellwitz IM, Alves BM, Ikeda ML, Kuhleis D, Picon PD, Jarczewski CA, et al. HIV behind bars: human immunodeficiency virus cluster analysis and drug resistance in a reference correctional unit from southern Brazil. *PLoS One.* 2013; 9; 8(7):e69033. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069033> PMID: [23874857](#)

5.2 - Manuscrito I

SEQUENCE NOTES

Characterization of three new URFs_BF identified in Brazil

Mônica Nogueira da Guarda Reis
Mariane Martins de Araújo Stefani*

**Laboratório de Imunologia da AIDS e Hanseníase, Instituto de Patologia Tropical
e Saúde Pública, UFG, Goiânia, Brazil**

*** E-Mail Autor correspondente: mmastefani@gmail.com**

Abstract

The importance of BF recombinants in the Brazilian epidemic is illustrated by the high number of BF recombinants described: several unique recombinant forms/URF and nine circulating recombinant forms/CRF CRF28_BF, CRF29_BF, CRF39_BF, CRF40_BF, CRF46_BF, CRF70_BF, CRF71_BF, CRF72_BF e CRF90_BF). This study characterizes full length/FLG near full length genome/NFLG sequences of BF isolates sampled from 2003-2013 in patients living in six Brazilian States. Proviral DNA was extracted from whole blood and four overlapping fragments that compose HIV-1 whole genome were amplified by “nested”-PCR. The generated sequences were aligned (BioEdit 7.2.0) and phylogenetic analysis performed (MEGA 6, Neighbor-Joining, Kimura 2 parameters). The recombination profiles were identified by point analysis, phylogenetic analysis of fragments, and bootscan analysis (SIMPLLOT v3.5.1). In this study FLG of three URF_BF and partial genomes of 9 BF isolates from Central West and Northeast regions Brazilian were characterized. These URF_BF described here show distinct breakpoints from all the BF mosaics described in Brazil or elsewhere. BLAST search analyses identified other sequences with similar recombination profiles in patients from North and South Brazil. These evidences suggest that some of these URFs_BF may in fact represent new unidentified CRF_BF with broad circulation in Brazil. Molecular surveillance studies especially including FLG/NFLG are necessary to fully understand the complexity and impact of the generation and dissemination of BF recombinants in the Brazilian AIDS epidemic that is taking course away from its epicenter.

HIV-1 is characterized by extensive genetic variability which can be classified into four groups (M, N, O and P), nine subtypes (A, B, C, D, F, G, H, J and K), six subsubtypes (A1, A2, A3, A4, F1 and F2). The high recombinogenic capacity of HIV-1 can be illustrated by the vast number of recombinant forms described worldwide: 88 circulating recombinant forms (CRFs) and several unique recombinant forms (URFs)¹. Globally URFs may account for 4% of the HIV-1 epidemics².

The Brazilian HIV/AIDS epidemic is complex and dynamic and has been characterized by the predominance of HIV-1 subtype B in most Brazilian regions with and an increasing number of BF recombinant forms. URFs_BF have been probably circulating in South America since early 80's³. The first Brazilian BF mosaic was identified in 1994 in two individuals sharing epidemiologic link⁴. The first Brazilian URF_BF (93BR029.4) was identified in the late 90's⁵. Recent studies have highlighted the increase in the rate of BF recombinants both URFs and CRFs in the Brazilian epidemic. Five out of six recombinants described in the country are in fact BF recombinants⁶. Also, there evidences showing that most, if not all of subtype F1 from Brazil may contain recombinant genomes^{3,7}. Since then the rate of BF mosaics has been increasing in most regions. In some regions as the Central West, BF recombinants represent the second most prevalent genetic variant⁸⁻¹⁷. In the Northeast region studies among blood donors from Pernambuco have described increasing rate of URFs_BF^{18,19}.

The characterization of URFs_BF by full/near full genome sequences in Brazil is still scarce especially away from the epicenter of the epidemic^{18,20}. Previous reports from our group among different population groups have shown rates of BF recombinants ranging from 4.5-25.9% in the HIV-1 pol region among isolates from different Brazilian states located in the Central West, North and Northeast regions^{9-17,21-23}. Among 828 isolates, 87 BF1 strains were identified and phylogenetic, bootscan and point analyses showed that 42 sequences grouped into 5 distinct clusters. Full/near full length/partial genome sequences from the most representative cluster (#5) which contained 22 strains allowed the identification of the new CRF90_BF and several CRF_BF like strains: 14 CRF28/29_BF-like strains, 2 CRF17_BF-like, 1 CRF12_BF-like and 1 CRF47_BF²⁰. In the current study we describe the whole genome sequences of three new URFs_BF each one identified in the previously described clusters #1, 2 and 3 (Fig. 1)²⁰.

This study analyzed 20 HIV-1 isolates sampled from 2003-2013 among newly diagnosed antiretroviral naïve patients, pregnant women, patients under ARV failure who were recruited at different health units (Hospital Anuar Auad, Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás in Goiânia/Goiás; Lacer; LACEN and Hospital Universitário Júlio Muller/UFMT/Palmas/Tocantins; Hospital de Doenças Tropicais Dr

Natan Portela/São Luís/Maranhão and LACEN/ Teresina/Piauí). All patients signed an informed consent form before blood collection.

Genomic DNA was extracted from whole blood samples (QIAamp® DNA Blood Mini Kit/QIAGEN, Qiagen, Hilden, Germany). The complete HIV-1 genome was amplified by nested-PCR employing Platinum Taq DNA polymerase enzyme (Invitrogen, Carlsbad, CA) into four overlapping fragments using HIV-1 specific primers, as following: fragment 1- SCAOSD/LR51 external primers and SCANS/DP11 internal primers (408-2594), fragment 2- DP10/SCCNAS external primers and DP16/SCCOAS internal primers (2253-4830); fragment 3- MMINT8/ED14 external primers and MMINT3/ED12 internal primers (4653-7811); fragment 4- ED5/SCDOAD external primers and JH44/LTR2 internal primers (6954-9625)^{20,24-26}, all positions were relative to HXB2 genome. Isolates with all four fragments completely sequenced were considered full length genomes (FLG); isolates with three complete fragments were considered near full length genomes (NFLG), and isolates with one or two fragment sequences were referred as partial genomes.

The amplified DNA fragments from the nested-PCR products were separated by gel electrophoresis, purified (kit QIAquick® PCR Purification Kit/QIAGEN, Qiagen, Hilden, Germany) and sequenced with the *Big Dye Terminator Sequencing Kit v. 3.1* (Applied Biosystems, Foster City, CA) in an automated ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA). Chromatograms were analyzed and edited using the SeqMan software from the package DNASTAR Lasergene (MA, USA).

Sequences were aligned using Clustal X 2.0 implemented in BioEdit 7.2.0 program²⁷. Reference sequences of HIV-1 group M subtypes (A-D, F-H, J and K) and CRF_{BF} sequences were obtained from the Los Alamos HIV database (<http://hiv.lanl.gov/>). Phylogenetic trees were generated using the neighbor-joining (NJ) method²⁸ under the Kimura two-parameter model²⁹ using MEGA 6.0 software³⁰. Bootstrap values (BP, 1.000 replicates) above 70% were considered significant. Recombination analyses were performed in all viral isolates using bootscan implemented in Simplot v3.5.1 software with the following parameters: 300nt window, 20nt increments, NJ method under Kimura's two-parameter correction with 100 bootstrap replicates³¹. To better characterize the recombination breakpoints suggested in the previous analyses, the putative recombinants were subjected to informative site analyses as described elsewhere²⁵. For this purpose, consensus sequences from Brazilian HIV-1 subtypes B and F1 were generated in the DAMBE program³². Fragments of sequences assigned to specific HIV-1 subtypes were finally confirmed by separate NJ phylogenetic analysis as described above.

Representative samples from the HIV-1 BF Brazilian clusters herein identified were submitted to a Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) analysis in order to recover other sequences with high similarity (>95%) and probably similar recombination profile. The BLAST analysis was done using sequences obtained from the Los Alamos HIV database (<http://hiv.lanl.gov/>).

In the previously described Cluster #1 (Fig. 1), from the six BF isolates we were able to obtain the full length sequence of the BRGOMI744 strain (422-9493bp) from Goiás State, Central West Brazil (Fig. 2A). For the BRMA94 strain, from Maranhão state, Northeast region, partial genome sequences of fragments #1, 2 and 3 were obtained (1028-5930bp, 6004-7765bp relative to HXB2 genome).

The URF_BF/BRGOMI744 was sampled in 2003 from a 21 years old pregnant woman from Goiânia, Goiás, Central West Brazil which heterosexual exposure. This patient was ARV naïve and was in her second pregnancy. The patient was diagnosed during the 14th week of gestation by the regional public health antenatal care program. The bootscanning analysis of the near full genome sequence of BRGOMI744 strain showed a complex recombination profile of subtypes F1 and B comprising 6 recombination breakpoints which divided the HIV-1 genome into 7 subregions as depicted below (Fig. 2A).

The previously described Cluster #2 (Fig. 1) contained 5 HIV-1 sequences from pregnant women recruited in Goiás State. We were able to get the full length genome sequences of the BRGO4056 strain (407-9301bp) and the near full length genome of two strains: BRGO4013 strain, 1186-5845bp and 7750-8576bp and BRGO4028 strain, 362-4774bp and 7072-9614bp.

The URF_BF/BRGO4056 was sampled from a 17 years old pregnant woman from an interior city in Goiás state. This patient was ARV naïve and diagnosed during the 24th week of gestation by the regional public health antenatal care program. The patient referred heterosexual exposure. In this URF_BF, subtype B predominated. The bootscan analysis of the full genome sequence of this strain showed 6 recombination breakpoints which divided the genome into 7 subregions as shown in Fig. 2B.

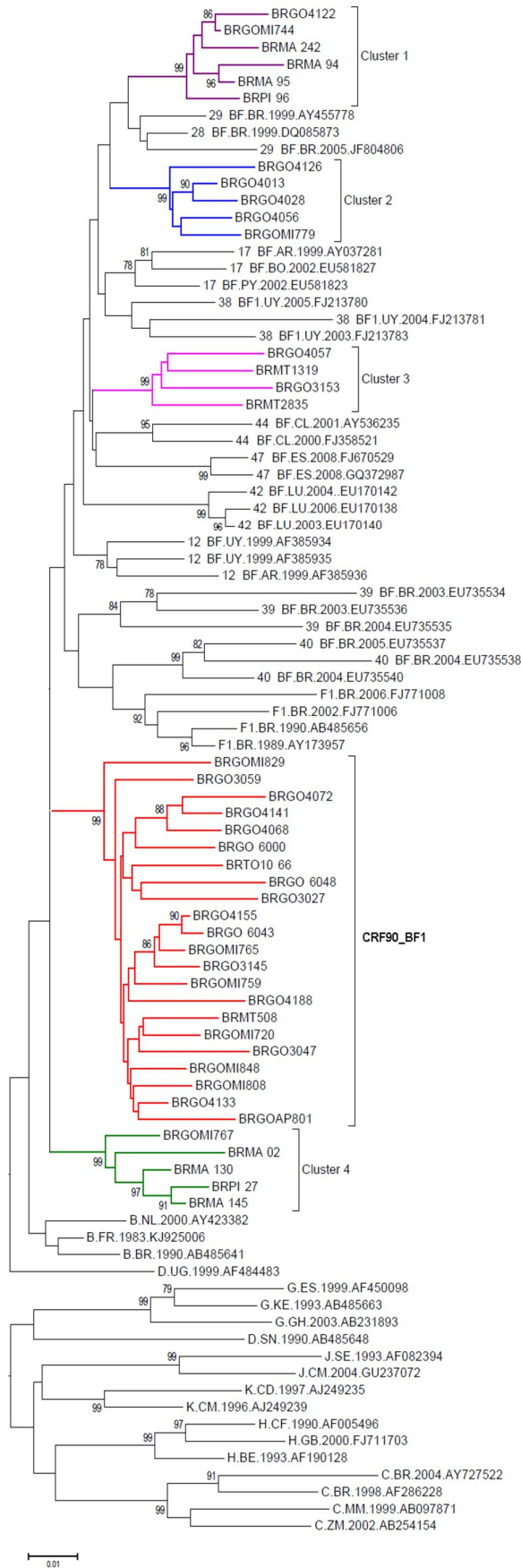


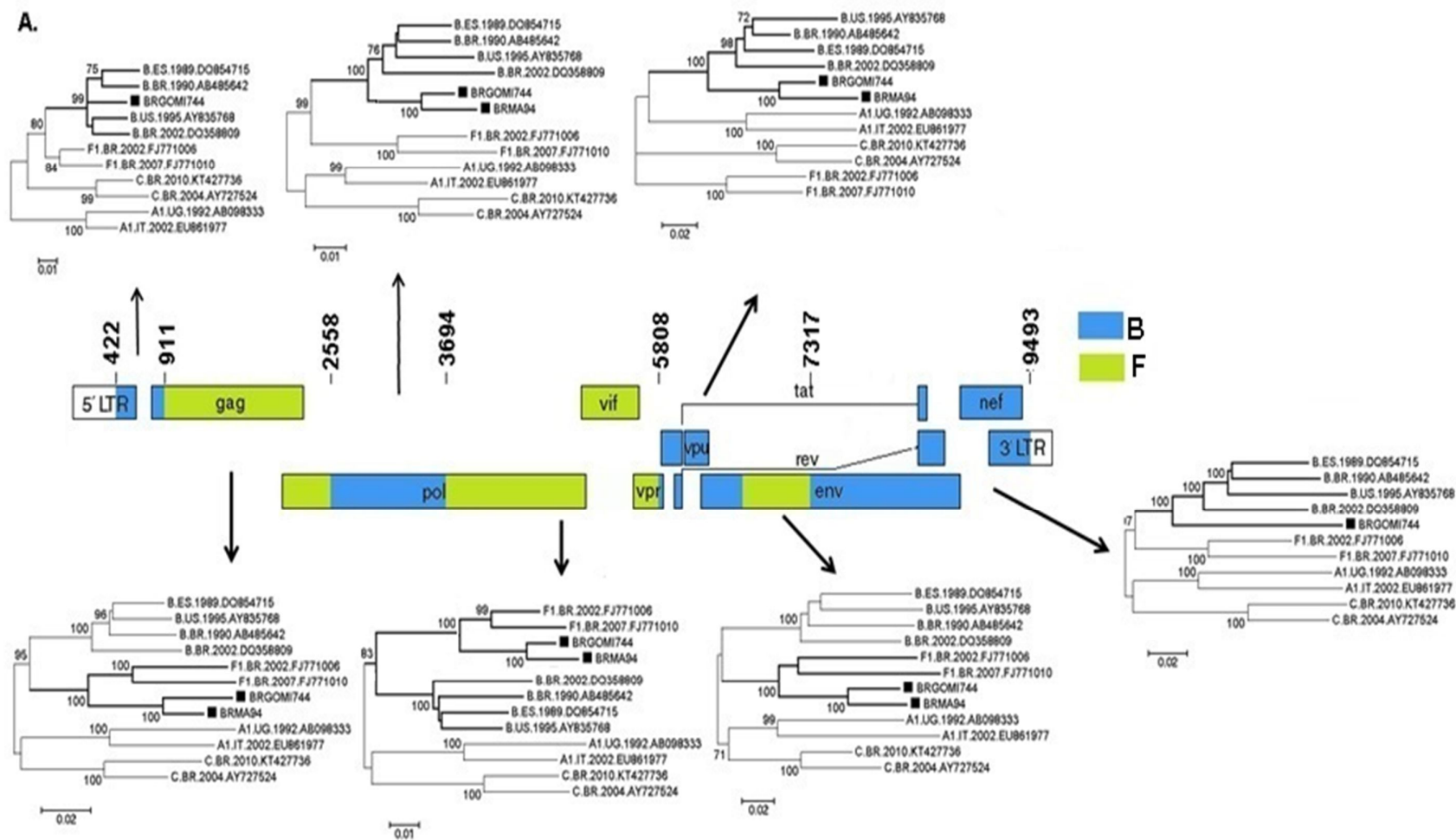
FIG. 1: Phylogenetic analysis of 42 BF isolates in the pol region of HIV-1 sampled from patients living in six Brazilian states (2003-2013). Neighbor-Joining and Kimura 2 parameters were used to construct the phylogenetic tree (MEGA v.6). Reference sequences from HIV-1 group M subtypes and CRFs_BF were obtained from the Los Alamos HIV sequence database. These 42 isolates grouped into 5 distinct clusters (#1-5) which are indicated by different colors: Cluster # 1: purple, Cluster #2: blue, Cluster #3: pink, Cluster #4: green and Cluster CRF90_BF1: red. Sequences described in cluster#1 were described in²⁰.

The previously described Cluster #3 (Fig. 1) contained four isolates from Goiás and Mato Grosso which origin was estimated in late 80's²⁰. BLAST searches identified 18 other HIV-1 isolates sharing the same recombination profile circulating in five other Brazilian States (Acre, Amazonas, Paraná, Rondônia and Roraima). Among four isolates from cluster #3, we have obtained one full length genome sequence (BRMT1319: 423-9423bp), one partial/half genome sequence (BRMT2835: 419-4791bp) and partial genome sequences of two isolates: BRGO3153, fragment #2 2265-4808bp and BRGO4057, fragment #4, 7011-9614bp.

The URF_BF/BRMT1319 was sampled from a 24 years old male, who referred homosexual exposure and who lived in a small interior city from Mato Grosso State (Várzea Grande city). This ARV naïve patient was diagnosed in 2002. The full genome sequence of this URF_BF showed a genome composed of mainly subtype B. The bootscanning analysis of this genome showed a complex recombination pattern with six recombination breakpoints, dividing the genome into 7 subregions as illustrated in Fig. 2C.

In the Cluster #4 (Fig. 1) among its 5 isolates from three States: one from Goiás, three from Maranhão and one from Piauí, we were able to sequence 3 fragments from the BRMA145 strain (465-8233bp), one fragment from the BRMA130 strain (2253-4780bp) and one fragment from the BRMA02 strain (2254-3619bp) (Fig. 2D). BLAST analysis identified two isolates from Amapá State, North region sharing the same recombination profile of isolates from Cluster #4. The phylogenetic analyses of these three URF_BF described in this study (Fig. 3) showed that none of them aligned to any CRF_BF or URF_BF already described in Brazil or elsewhere which are included at the Los Alamos [sequence list](https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/CRFs/CRFs.html) (<https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/CRFs/CRFs.html>).

A.



[illegible]

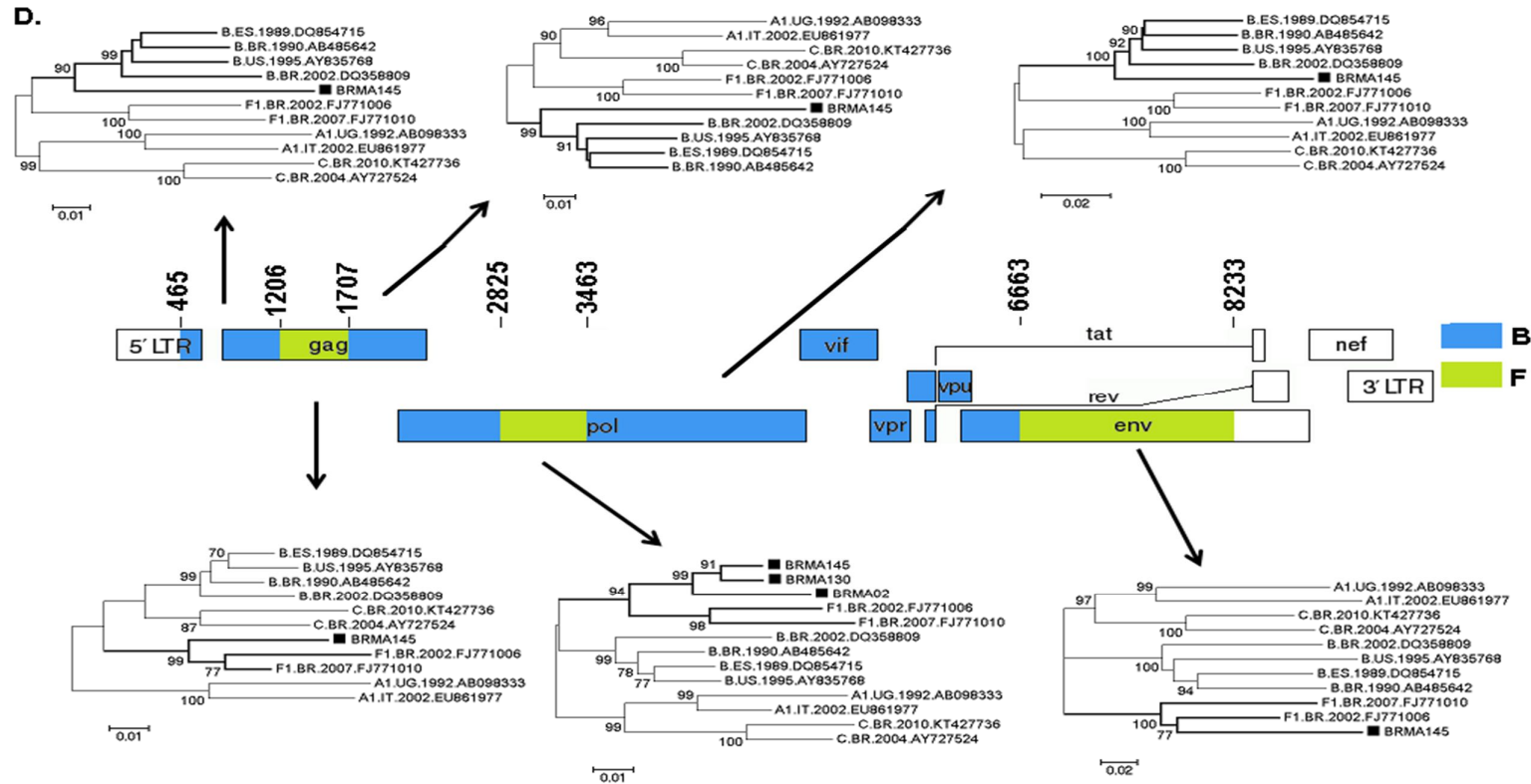


FIG. 2. Schematic representation of full length/near full length genomes and partial genomes of four distinct URFs_{BF} described in this study. Panel A: BRGOMI744 isolate; Panel B: BRGO4056 isolate; Panel C: BRMT1319 isolate; Panel D: BRMA145 isolate. The HIV-1 genomic structures were obtained using the Recombinant Draw Tool available at Los Alamos (https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/DRAW_CRF/recom_mapper.html). In this schematic representation HIV-1 subtype B is represented in blue and subtype F in green. Phylogenetic analyses were performed using MEGA v.6, with Neighbor-Joining, Kimura 2-parameters.

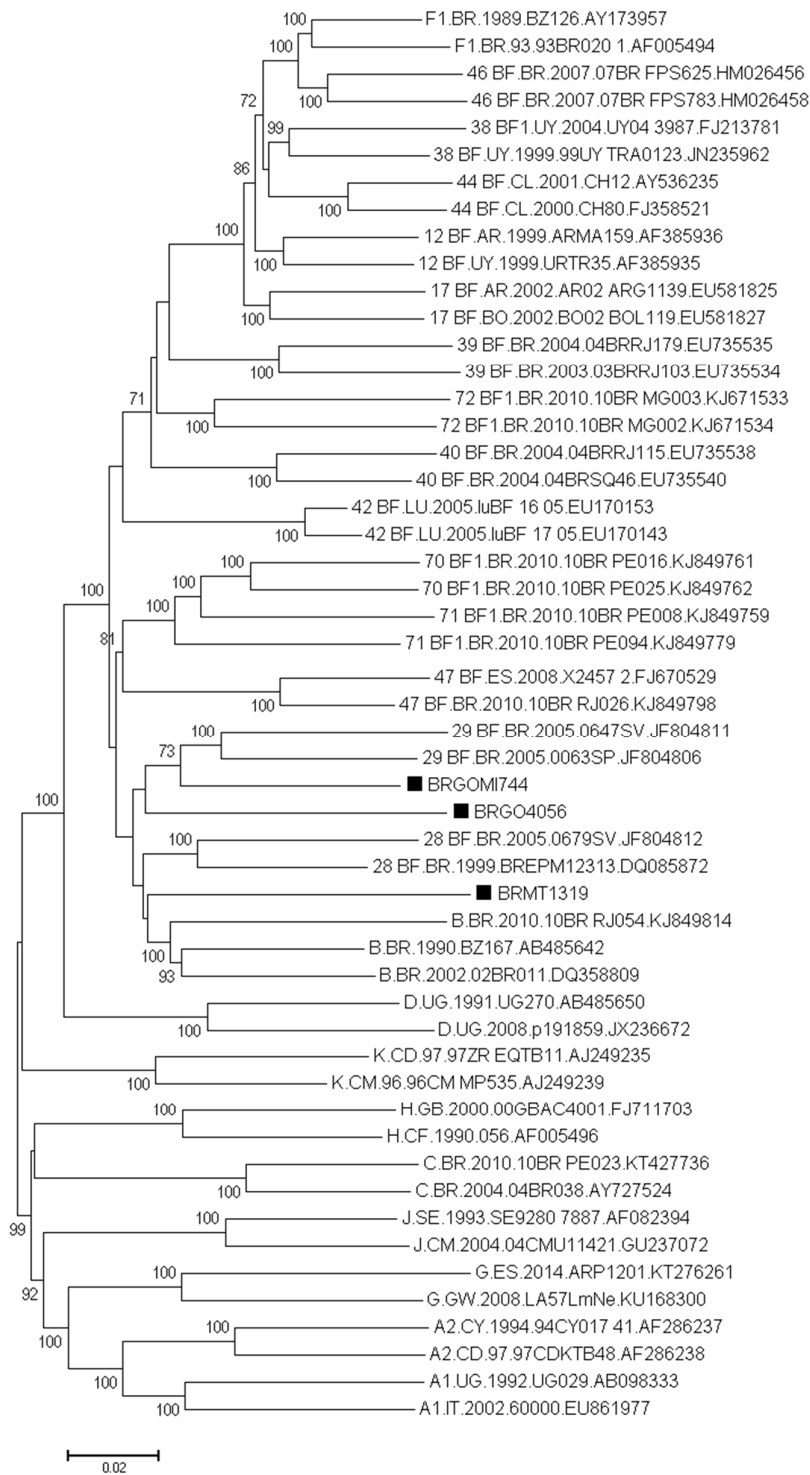


FIG. 3: Phylogenetic analyses of three new URFs_BF sampled from patients living in Central West Brazil. Reference sequences were obtained from the Los Alamos HIV sequence database. Phylogenetic tree was performed using MEGA v.6, with Neighbor-Joining, Kimura 2-parameters.

Our study describes near full length genomes of three URFs_BF with distinct breakpoints from all the BF mosaics described in Brazil or elsewhere^{19,33-35}. Additionally partial sequences were obtained from at least one fragment derived from 9 other recombinant BF isolates (Fig. 2). These BF isolates were sampled in the Central West (Goiás, Mato Grosso) and Northeast regions (Maranhão). Previous studies showed that NFLG and larger fragments usually increase the proportion and variety of recombinant strains, especially BF³⁶. Also misclassifications are known to easily arise from the characterization of small fragments of HIV-1, corroborating the importance of FLG/NFLG to completely reveal the genetic diversity of HIV-1 strains^{19,33-35}. However in this study the NFLG and partial genome sequences confirmed B and F1 subtypes originally identified by molecular analyses of the smaller pol region. cccc

Also, for one of the BF clusters (#3), previously characterized by Reis et al²⁰, which contained four isolates from the Central West region, one near full length genome sequence (BRMT1319) and partial genome sequences of three isolates were generated. BLAST searches against the NCBI nucleotide database revealed a significant number of sequences similar to the BRMT1319 sequence circulating in several States located in the North region (Acre, Amazonas, Rondônia and Roraima) and also in Paraná in the South region. Altogether these evidences suggest that this new URF may represent a new CRF_BF with a broad circulation in different Brazilian regions (Central West, North and South).

The Brazilian AIDS epidemic is complex and dynamic and characterized by the cocirculation of subtypes B, F1 and C and countless BF and BC recombinants^{26,33,36,37}. Our results from three Brazilian regions (Central West, North and Northeast) indicate the continued generation and dispersion of several BF recombinants in Brazil. The high frequency of recombinants identified indicate that coinfection with multiple viruses or sequential superinfection with several distinct transmission events is occurring at high rates in high risk behavior individuals from different transmission networks in Brazil³⁶. Surveillance of the generation and dissemination of these recombinants is important since they can eventually have improved fitness that may reflect in increased transmissibility. Overall, the results presented in this study contributes to the understanding of the diversity of HIV-1 and its recombinant forms in different Brazilian regions. Monitoring HIV-1 genetic diversity is crucial to assure sensitive screening and diagnostic tests, viral load assays and potential vaccine candidates that need to match the regional viral diversity.

Sequence Data

All HIV-1 sequences generated in this study will be deposited in the GenBank

Database.

References

- 1- Robertson DL, Anderson JP, Bradac JA, *et al.*: HIV-1 nomenclature proposal. *Science* 2000; 288(5463):55-56.
- 2- Hemelaar J, Gouws E, Ghys PD, *et al.*: Global trends in molecular epidemiology of HIV-1 during 2000-2007. *AIDS* 2011; 25(5):679-689.
- 3- Carr JK, Avila M, Gomez Carrillo M, *et al.*: Diverse BF recombinants have spread widely since the introduction of HIV-1 into South America. *AIDS* 2001;15(15):F41-7.
- 4- Sabino EC, Shpaer EG, Morgado MG, *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(10):6340-6.
- 5- Gao F, Robertson DL, Carruthers CD, *et al.*: A comprehensive panel of near-full-length clones and reference sequences for non-subtype B isolates of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 1998;72(7):5680-98.
- 6- Melo FL, Jamal LF, Zanotto PM. Characterization of primary isolates of HIV type 1 CRF28_BF, CRF29_BF, and unique BF recombinants circulating in Sao Paulo, Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2012;28(9):1082-8.
- 7- Sanabani SS, Pastena ER, Neto WK, *et al.*: Characterization and frequency of a newly identified HIV-1 BF1 intersubtype circulating recombinant form in São Paulo, Brazil. *Virol J* 2010;16(7):74.
- 8- Stefani MM, Pereira, GA, Lins JA, *et al.*: Molecular screening shows extensive HIV-1 genetic diversity in Central West Brazil. *J Clin Virol* 2007;39(3):205-9.
- 9- Cardoso LP, Stefani MM. High level of multidrug resistance mutations in HIV type 1 pol gene and resistance-associated mutations to enfuvirtide (T-20) among antiretroviral-experienced patients from central Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2009;25(10):943-50.
- 10- Cardoso LP, Queiroz BB, Stefani MM. HIV-1 pol phylogenetic diversity and antiretroviral resistance mutations in treatment naive patients from Central West Brazil *J Clin Virol* 2009;46(2):134-9.
- 11- Cardoso LP, Pereira GA, Viegas AA, *et al.*: HIV-1 primary and secondary antiretroviral drug resistance and genetic diversity among pregnant women from central Brazil. *J Med Virol* 2010;82(3):351-7.
- 12- Cardoso LP, da Silveira AA, Francisco RB, da Guarda Reis MN, Stefani MM. Molecular characteristics of HIV type 1 infection among prisoners from Central Western Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2011;27(12):1349-1353.

- 13- Ferreira AS, Cardoso LP, Stefani MM. 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(8):1301-1307.
- 14- da Silveira AA, Cardoso LP, Francisco RB, *et al.*: HIV type 1 molecular epidemiology in pol and gp41 genes among naïve patients from Mato Grosso do Sul State, central western Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2012;28(3):304-307.
- 15- Alcântara KC, Lins JB, Albuquerque M, *et al.*: HIV-1 mother-to-child transmission and drug resistance among Brazilian pregnant with high Access to diagnosis and prophylactic measures. *Journal of Clinical Virology* 2012;54:15– 20.
- 16- da Costa ZB, de Lima YA, Martelli CM, *et al.*: Transmitted HIV resistance among pregnant young women infected with HIV-1 in Brazil. *AIDS Patient Care STDS* 2013; 27(8):439-41.
- 17- Lima YA, Cardoso LP, Reis MN, *et al.*: Incident and long term HIV-1 infection among pregnant women in Brazil: Transmitted drug resistance and mother-to-child transmission. *J Med Virol* 2016;88(11):1936-43.
- 18- Pessôa R, Watanabe JT, Calabria P, *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(11):e112674.
- 19- Pessoa R, Loureiro P, Esther Lopes M, *et al.*: Ultra-Deep Sequencing of HIV-1 near Full-Length and Partial Proviral Genomes Reveals High Genetic Diversity among Brazilian Blood Donors. *PloS One* 2016;11(3):e0152499.
- 20- Reis MNDG, Bello G, Guimarães ML, *et al.*: Characterization of HIV-1 CRF90_BF1 and putative novel CRFs_BF1 in Central West, North and Northeast Brazilian regions. *PLoS One* 2017;12(6):e0178578.
- 21- Carvalho BC, Cardoso LP, Damasceno S, Stefani MM. (2011) 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*; 27(10):1081-1087.
- 22- Moura ME, Reis MN, Lima YA, Eulálio KD, Cardoso LP, Stefani MM. (2015a) Low rate of transmitted drug resistance may indicate low access to antiretroviral treatment in Maranhão State, northeast Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses*; 31(2):250-4.
- 23- Moura ME, da Guarda Reis MN, Lima YA, Eulálio KD, Cardoso LP, Stefani MM. (2015b) HIV-1 transmitted drug resistance and genetic diversity among patients from Piauí State, Northeast Brazil. *J Med Virol*; 87(5):798-806.

- 24- Delwart EL, Shpaer EG, Louwagie J, McCutchan FE, Grez M, Rubsamen-Waigmann H, et al. Genetic relationships determined by a DNA heteroduplex mobility assay: analysis of HIV-1 env genes. *Science*. 1993; 19;262(5137):1257-61.
- 25- Sierra M, Thomson MM, Rios M, Casado G, Castro RO, Delgado E, 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 CRF12_BF. *Infect. Genet. Evol.* 2005; 5,209–217.
- 26- Passaes CP, Bello G, Lorete RS, Matos Almeida SE, Junqueira DM, Veloso VG, et al. Genetic characterization of HIV-1 BC recombinants and evolutionary history of the CRF31_BC in Southern Brazil. *Infect Genet Evol.* 2009; 9(4):474-82.
- 27-Thompson JD, Higgins DS, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 1994; 22:4673-4680.
- 28- Nei M & Kumar S. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. Oxford University. 2002; 3:567-568
- 29- Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol.* 1980; 16:111-120.
- 30- Tamura K, Stecher G, Peterson D, et al.: MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol Biol Evol.* 2013; 30(12): 2725–2729.
- 31- Lole KS, Bollinger RC, Paranjape RS, 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(1):152-160.
- 32- Xia X, Xie Z. DAMBE: software package for data analysis in molecular biology and evolution. *J. Hered* 2001;92:371-373.
- 33- Sanabani S, Kleine Neto W, Kalmar EM, et al. Analysis of the near full length genomes of HIV-1 subtypes B, F and BF recombinant from a cohort of 14 patients in Sao Paulo, Brazil. *Infect Genet Evol* 2006;6:368-77.
- 34-Sanabani SS, Pastena ER, da Costa AC, et al. Characterization of partial and near full-length genomes of HIV-1 strains sampled from recently infected individuals in Sao Paulo, Brazil. *PLoS ONE* 2011;6:e25869
- 35- Sanabani SS, Pessoa R, Soares de Oliveira AC. et al.: Variability of HIV-1 genomes among children and adolescents from São Paulo, Brazil. *PLoS One* 2013;8(5): e62552.
- 36- Pessôa R, Watanabe JT, Calabria P, 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* 2015;55(5):980-90.

37- Barreto CC, Nishyia A, Araújo LV, *et al.*: Trends in antiretroviral drug resistance and clade distributions among HIV-1--infected blood donors in Sao Paulo, Brazil. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2006;41(3):338-41.

5.3 - Manuscrito II

HIV-1 subtype C and F1 infections and extensive variability of BC, BFC and CF mosaics in Central West, North and Northeast Brazil

Mônica Nogueira da Guarda Reis¹

Monick Lindenmeyer Guimarães²

Mariane Martins de Araújo Stefani^{1*}

1 Laboratório de Imunologia da AIDS e Hanseníase, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, UFG, Goiânia, Brazil

2 Laboratório de AIDS e Imunologia Molecular, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil

*** E-Mail Autor correspondente: mmastefani@gmail.com**

ABSTRACT

The HIV/AIDS epidemic in Brazil, the largest, most populous and affected country in Latin America, has recently shown an escalating prevalence of non-B subtypes, especially URFs_BF1, subtype C and URFs_BC. Previous studies from Goiás/GO, Mato Grosso/MT, Mato Grosso do Sul/MS, Tocantins/TO, Maranhão/MA and Piauí/PI States have shown the cocirculation of subtypes B, C and F1 and a considerable variability of recombinant patterns. This study describes the molecular characterization of BC, BFC and CF mosaic isolates circulating in these six Brazilian States. **Methods:** BC, BFC and CF recombinants identified among 828 HIV-1 infected patients recruited from 2003-2013 in six Brazilian States were reclassified based on *pol* gene sequences using phylogenetic analysis (neighbor-joining/NJ), bootscan (Simplot v3.5.1), and informative site analyses. Partial genome sequences of four overlapping fragments: fragment #1 (408-2594bp), fragment #2 (2253-4830bp), fragment #3 (4653-7811bp) and fragment #4 (6954-9625bp) related to HXB2 genome were generated and analyzed. **Results:** Overall moderate prevalence of “pure” subtype C (6.4%, 53/828) and low prevalence of subtype F1 (4.7%; 39/828) was observed. The rates of subtype C and F1 infections decreased northwards (from MS to PI). Additionally, 24 unique recombinant isolates that contained a subtype C fragment (2.9%; 24/828) were identified: 19 (2.3%, 19/828) BC recombinants, three BFC recombinants (0.4%, 3/828) and two CF recombinants (0.2%, 2/828). Among 23 ARV naïve patients infected with BC, BFC and CF recombinants 21.7% (5/23) presented mutations associated with transmitted drug resistance. Among the 24 recombinants, phylogenetic, bootscan and informative site analysis showed 79.2% (19/24) BC isolates while 20.8% (5/24) were FC recombinants. Nineteen isolates grouped into six clusters while five isolates (BRGO4156, BRMT2509, BRMT3086, BRMS43 and BRPI34) did not cluster with other samples. The largest clusters contained BC recombinants; the CRF31_BC-like cluster contained 5 isolates and two isolates were CRF60_BC-like. Two clusters contained 5 BFC and CF isolates. **Conclusions:** Overall our results indicate the extensive recombination patterns of BC, BFC and CF isolates circulating in central west, north and northeast contributing to the knowledge on recombination profiles of HIV-1 in Brazilian regions away from the epicenter of the epidemics.

INTRODUCTION

Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) can be categorized into four phylogenetically distinct groups M, N, O and P and the pandemic group M presents nine subtypes (A-D F-H, J, K), six sub-subtypes (A1-A4, F1-F2), circulating recombinant forms (CRFs) and unique recombinant forms (URFs) (Robertson et al. 2000). HIV-1 is a highly polymorphic, rapidly evolving virus that accumulates and fixes advantageous mutations in the viral population. This extensive diversity results mainly from error-prone nature of the viral reverse transcriptase (3×10^{-5} mutations/nucleotide/replication cycle), a high mutation rate and rapid in vivo turn over (10.3×10^9 particles/day) (Mansky et al. 1996; Perelson et al. 1996). Additionally, recombination represents one of the most important mechanisms driving HIV-1 genetic diversity (Worobey & Holmes 1999). The cocirculation of distinct subtypes within a population is known to favor coinfection and recombination, which can generate intrasubtype or intersubtype mosaic viruses. HIV-1 CRFs refer to mosaic viruses, containing the same recombinant pattern in the entire genome, able to cause microepidemics in individuals without epidemiologic link. HIV-1 URFs are mosaic viral structures detected in one individual or in individuals with epidemiological link (Robertson et al. 2000; Nájera et al. 2002). So far, 90 HIV-1 CRFs have been published and countless distinct URFs have been described (<http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/CRFs/CRFs.html>). Globally, HIV-1 CRFs and URFs account for almost 20% of new infections (Tebit & Arts 2011).

Worldwide the distribution of HIV-1 subtypes is dynamic and complex across geographical regions and subtype C represents the predominant genetic form accounting for almost half of the pandemic group M subtypes (Hemelaar et al. 2011). Brazil, the largest, most populous and affected country in Latin America has a diverse and complex HIV-1 molecular epidemiology. Overall subtype B prevails, except in the South region where subtype C and numerous BC URFs are major variants, with a high prevalence of CRF31_BC, mostly in Porto Alegre, Rio Grande do Sul State (Passaes et al. 2009; Medeiros et al. 2011; Gräf et al. 2016). Previous studies from six Brazilian States (Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul from Central West region; Tocantins from North region; Maranhão and Piauí from Northeast region) have shown low to high rates of subtypes C and F1 and the preponderance of subtype B (Cardoso et al. 2009; Cardoso & Stefani 2009; Cardoso et al. 2010; Cardoso et al. 2011; Carvalho et al. 2011; Ferreira et al. 2011; da Silveira et al. 2012; Alcântara et al. 2012; da Costa et al. 2013; Moura et al. 2015a; Moura et al. 2015b; Lima et al. 2016b). Recent studies have shown an increasing prevalence of subtype C infections in South Brazil and its dispersion throughout the continent (Gräf & Pinto 2013; Delatorre et al. 2013; Gräf et

al. 2015). A rising trend in subtype C prevalence (13.3%) was reported in young pregnant women from Central West suggesting that its interiorization can potentially impact the molecular epidemiology of HIV-1 in inland Brazil (Alcântara et al. 2013; Lima et al. 2016a). Also, an escalating prevalence of non-B subtypes, especially URFs_BF, subtype C and URFs_BC has been reported lately in Brazil (Librelotto et al. 2015; da Costa et al. 2016; Pessoa et al. 2016; Delatorre et al. 2017).

The cocirculation of subtypes B, C and F1 in our study area (Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Tocantins, Maranhão and Piauí) increases the chances of coinfection and of the generation of intersubtype recombinant viruses. In fact, a recent study from our group has identified the CRF90_BF1 and several new URFs_BF in these States (Reis et al. 2017). Additionally, partial *pol* genome sequences have shown considerable variability of recombinant patterns including the less prevalent circulating subtypes C and F1. In this regard, this study reports rates of subtype C and F1 infections and describes the molecular characterization of BC, BFC and CF mosaic isolates circulating in these six Brazilian States.

METHODS

Study Population

Our study population included 828 HIV-1 infected patients recruited from 2003-2013 in six Brazilian States (Goiás/GO, Mato Grosso/MT, Mato Grosso do Sul/MS, Tocantins/TO, Maranhão/MA and Piauí/PI). Study Population included individuals from the following groups: recently diagnosed antiretroviral (ARV) naïve, therapeutic failure of ARV treatment, inmates and pregnant women. These studies were approved by the local Institutional Ethics Committee and all participants signed an informed consent form before blood collection (Goiás: protocols #073/05, #003/2008, #163/2010 at CEPMHA/HC/UFG, Mato Grosso: protocol #435/07 at Universidade Federal do Mato Grosso/UFMT, Mato Grosso do Sul: protocol #1143 at Universidade Federal do Mato Grosso do Sul/UFMS, Piauí: protocol #022/2011 at Universidade Estadual do Piauí/UESPI, Maranhão: protocol #16/2011 at Hospital de Doenças Tropicais Dr Natan Portela).

Classification of HIV-1 subtype according to PR/RT

RNA extraction from plasma, reverse transcription into complementary DNA (cDNA) and amplification by nested polymerase chain reaction (nested-PCR) of the protease-reverse transcriptase (PR/RT) regions in the *pol* gene and phylogenetic analyses were

previously described (Cardoso et al. 2009; Cardoso & Stefani 2009; Cardoso et al. 2010; Carvalho et al. 2011; Ferreira et al. 2011; Cardoso et al. 2011; da Silveira et al. 2011; Alcântara et al. 2012; da Costa et al. 2013; Moura et al. 2015a; Moura et al. 2015b; Lima et al. 2016b).

Partial HIV-1 genomes

Genomic DNA was extracted from whole blood samples (QIAamp® DNA Blood Mini Kit/QIAGEN, Qiagen, Hilden, Germany). The HIV-1 genome was amplified by nested-PCR employing Platinum Taq DNA polymerase enzyme (Invitrogen, Carlsbad, CA) into four overlapping fragments composing the whole genome sequence of HIV-1 that regarding the HXB2 genome contained: fragment #1 (408-2594bp), fragment #2 (2253-4830bp), fragment #3 (4653-7811bp) and fragment #4 (6954-9625bp) using HIV-1 specific primers, as previously described Reis et al. 2017). The amplified DNA fragments from the nested-PCR products were separated by gel electrophoresis, purified (kit QIAquick® PCR Purification Kit/QIAGEN, Qiagen, Hilden, Germany) and sequenced (*Big Dye Terminator Sequencing Kit v. 3.1*, Applied Biosystems, Foster City, CA; ABI Prism 3100 Genetic Analyzer, Applied Biosystems, USA).

Phylogenetic and Recombination Analyses

All *pol* (PR/RT) sequences from this study were realigned using Clustal X 2.0 implemented in BioEdit 7.2.0 program (Thompson et al. 1994). Reference sequences of HIV-1 group M subtypes (B, C and F1) and CRFs_BC (CRF07_BC, CRF08_BC, CRF31_BC, CRF57_BC, CRF60_BC, CRF61_BC, CRF62_BC, CRF64_BC, CRF85_BC, CRF86_BC and CRF88_BC) were obtained from the Los Alamos HIV database (<https://www.hiv.lanl.gov/components/sequence/HIV/search/search.html>). Phylogenetic trees were generated using the Neighbor-Joining (NJ) method (Nei & Kumar, 2002) under the Kimura two-parameter model (Kimura, 1980) using MEGA 6.0 software (Tamura et al. 2013). Bootstrap values (BP, 1.000 replicates) above 70% were considered significant. Recombination analyses were performed in all viral isolates using bootscan implemented in Simplot v3.5.1 software with the following parameters: 300nt window, 20nt increments, NJ method under Kimura's two-parameter correction with 100 bootstrap replicates (Lole et al. 1999). For this purpose, consensus sequences from Brazilian HIV-1 subtypes B, C and F1 were generated in the DAMBE program (Xia & Xie, 2001). Fragments of our study sequences assigned to specific HIV-1 subtypes were finally confirmed by separate NJ phylogenetic analysis and by informative site analyses as described above.

Representative samples from the HIV-1 BC, BFC and CF Brazilian clusters herein identified were submitted to a Basic Local Alignment Search Tool (BLAST-https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/BASIC_BLAST/basic_blast.html) analysis in order to recover other sequences with high similarity (>95%) and probably similar recombination profiles.

To confirm the breakpoints we checked effective informative sites between subtypes around each breakpoint. The sites in the middle of two effective sites that refer to the reference sequences of subtypes B, C or F1 were defined as the recombination breakpoints.

Drug resistance analysis

Transmitted drug resistance (TDR) rate was analyzed using the Calibrated Population Resistance (CPR) tool (Stanford Surveillance Drug Resistance Mutation-SDRM) and the IAS-USA major mutation lists (Gifford et al. 2009; Wensing et al. 2017). Susceptibility profiles of ARV mutations were analyzed by the SDRM-2009 (Accessed: June 2017).

Data Analysis and Data Availability

Descriptive analyses (frequency, median, mean) were calculated when appropriate (the GraphPad Prism® version 5). All HIV-1 sequences generated in this study will be deposited in the GenBank database.

RESULTS

Prevalence of “pure” HIV-1 Subtypes C and F1 and recombinants BC, BFC and CF in six Brazilian States

The phylogenetic analyses of the partial HIV-1 *pol* region obtained from 828 patients recruited in six Brazilian States showed a moderate prevalence of “pure” subtype C (6.4%, 53/828). The highest rate of “pure” subtype C was found in Mato Grosso do Sul (10.2%, 5/49) followed by Goiás (8.6%, 36/420), Tocantins (5.8%, 3/52), Mato Grosso (5.4%, 5/92), Maranhão (2.8%, 3/106) and Piauí (1.1%, 1/89). The overall prevalence of “pure” subtype F1 in these States was 4.7% (39/828): 8.2%: (4/49) in Mato Grosso do Sul; 6.7%, (28/420) in Goiás; 3.3%, (3/92) in Mato Grosso; 1.9%, (1/52) in Tocantins; 1.9%, (2/106) in Maranhão and 1.1%, (1/89) in Piauí.

Besides the 53 “pure” subtype C isolates identified in *pol*, phylogenetic, bootscan and informative site analyses showed 24 unique recombinant isolates that contained a subtype C fragment (2.9%; 24/828) (Figure 1). Among these 24 isolates, 19 (2.3%,

19/828) were BC recombinants while five isolates were BFC and CF recombinants (0.6%, 5/828). The summary of these results are depicted in Figure 1.

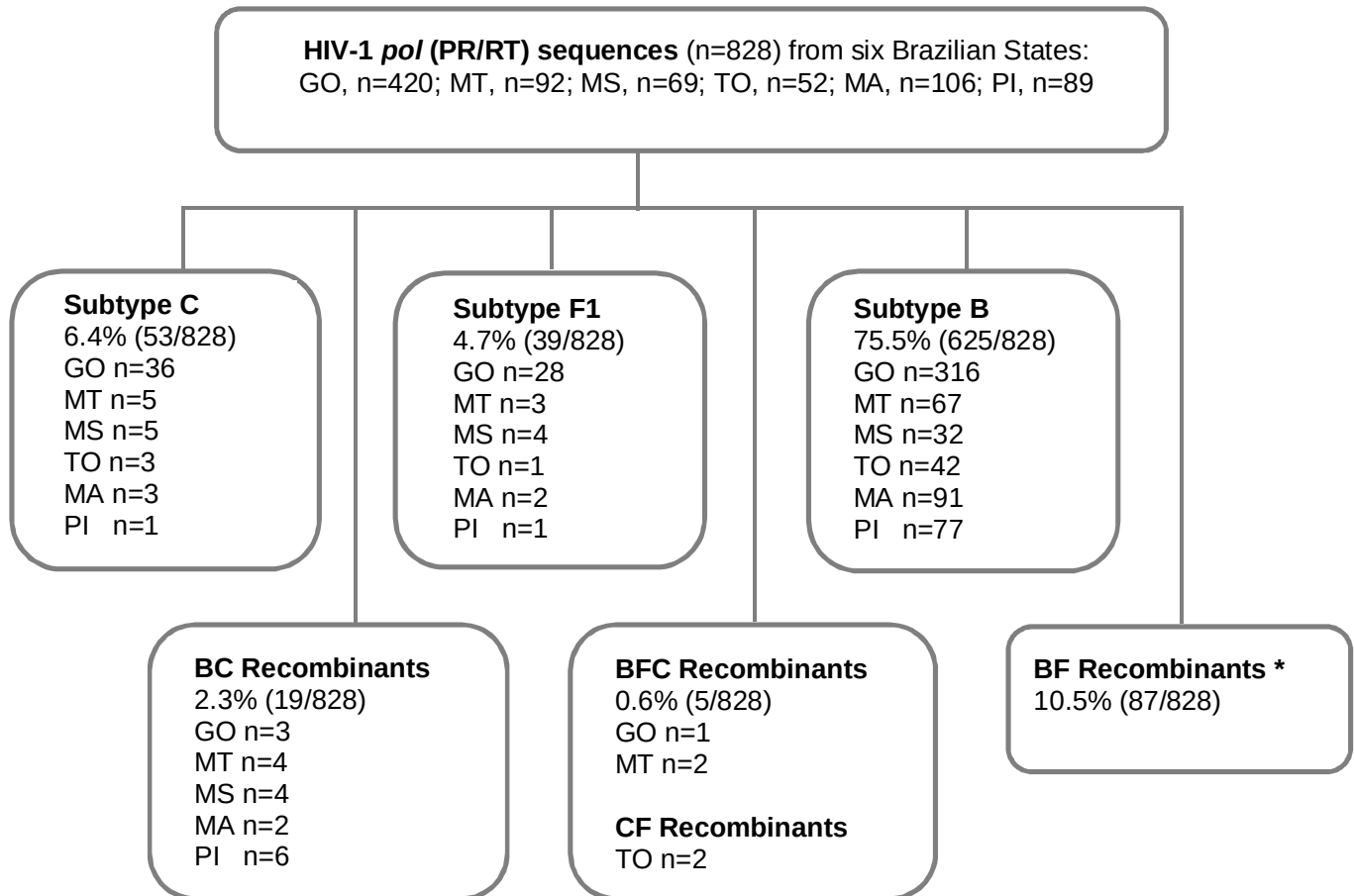


Figure 1: HIV-1 *pol* (PR/RT) diversity in patients recruited in six Brazilian States: Goiás/GO, Mato Grosso/MT and Mato Grosso do Sul/MS from Central West region, Tocantins/TO from North region, Maranhão/MA and Piauí/PI from Northeast region. The numbers and proportions of “pure” subtype B, C and F1 isolates and of BC, FC, BF intersubtype recombinants are also depicted. * The characterization of BF1 recombinants including the new CRF90_BF1 and several BF1 URFs is out of the scope of this study and has been previously reported (Reis et al. 2017).

Main features of patients harboring BC and FC recombinants

The main sociodemographic, clinical and laboratory characteristics of 24 patients infected with BC, BFC and CF recombinants are depicted in Table 1. Patients' samples representing subtype C recombinants were collected in all six Brazilian States from 2007-2012. Mosaic BC recombinants were detected in Mato Grosso do Sul (n=4), Mato Grosso (n=4), Goiás (n=3), Maranhão (n=2) and Piauí (n=6). BFC recombinants were detected in Goiás (n=1), Mato Grosso (n=2) and CF recombinants were detected in Tocantins (n=2). The majority of patients was young adult females (7:17 male female rate), from 21-50 years (median age= 33.5 years) including a 17 years old pregnant teenager. Heterosexual exposure predominated among these patients (83.3%, 20/24). Most patients was ARV naïve (95.8%, 23/24) with a median of CD4 counts= 455 cells/mm² (76-1.246 cells/mm² range) and the median of viral loads was 8.780 copies/mL (127-500.000 copies/mL range).

Among 23 ARV naïve patients infected with BC, BFC and CF recombinants, 21.7% (5/23) presented mutations associated with transmitted drug resistance (Table 1, isolates identified by *). The following single class mutations were identified: the D67N resistance mutation to nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTI), the L10I/V resistance mutation to protease inhibitor (PI), the K103N resistance mutation to non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTI). One isolate harbored mutations to both PI (L10V) and to NNRTI (V179E).

Table 1: Main sociodemographic, clinical and laboratory characteristics of study subjects infected with HIV-1 subtype C recombinants from six Brazilian States.

Patient ID	Sampling year/ recombination profile	Exposure category	Age/ years	Gender	ARV Status	CD4 cells/mm ²	Viral load copies/mL	City/State
BRMT2526*	2008/BFC	Heterosexual	34	M	naïve	155	78.963	Rondonópolis/MT
BRGO3001	2007/BFC	NA	33	F	naïve	76	500.000	Alexânia/GO
BRMT722*	2009/BFC	Homosexual	46	M	naïve	546	2.271	Cuiabá/MT/MT
BRPI75	2012/BC	Heterosexual	32	F	naïve	389	143.883	José de Freitas/PI
BRMA188	2012/BC	Heterosexual	50	M	naïve	298	18.851	São Luís/MA
BRMS43	2008/BC	Heterosexual	42	M	naïve	430	268.674	Campo Grande/MS
BRPI34*	2011/BC	Heterosexual	46	F	naïve	436	48.846	Teresina/PI
BRMT2509	2009/BC	Heterosexual	25	F	naïve	271	14.012	Nova Mutum/MT
BRGO4094	2009/BC	Heterosexual	21	F	naïve	NA	2.584	Formosa/GO
BRMT3104	2008/BC	Heterosexual	29	F	naïve	1.111	1.365	São José do Rio Claro/MT
BRPI13	2011/BC	Heterosexual	29	F	naïve	683	1.953	Teresina/PI
BRPI22	2011/BC	Heterosexual	45	F	naïve	613	13.460	Teresina/PI
BRGO4156	2010/BC	Heterosexual	17	F	prophylaxis	399	33.658	Trindade/GO
BRPI115	2012/BC	Heterosexual	36	F	naïve	595	2.490	Teresina/PI
BRMT3086	2008/BC	Heterosexual	36	F	naïve	142	7.229	Nobres/MT
BRMT848*	2009/CRF31_BC	Heterosexual	41	F	naïve	501	7.842	Cuiabá/MT
BRMS03	2008/CRF31_BC	Heterosexual	37	F	naïve	536	3.729	Campo Grande/MS
BRGO4179	2010/CRF31_BC	Heterosexual	21	F	naïve	NA	166.000	Formosa/GO
BRPI71	2012/CRF31_BC	Heterosexual	34	F	naïve	952	127	Teresina/PI
BRMS1310	2010/CRF31_BC	Homosexual	29	M	naïve	1.246	3.488	Campo Grande/MS
BRMS47*	2008/CRF60_BC	Homosexual	36	M	naïve	308	15.248	Campo Grande/MS
BRMA216	2011/CRF60_BC	Heterosexual	26	M	naïve	474	5.892	São Luís/MA
BRT00543	2008/CF	Heterosexual	21	F	naïve	397	9.717	Palmas/TO
BRT00966	2007/CF	Heterosexual	30	F	naïve	793	5.361	Dianópolis/TO

F= female; M=male; NA=not available; GO: Goiás; MT: Mato Grosso; MS: Mato Grosso do Sul; TO: Tocantins; MA: Maranhão, PI: Piauí.

* Isolates with mutations associated with ARV drug resistance in the protease or reverse transcriptase regions.

Phylogenetic analysis and recombination profiles of BC, BFC and CF recombinants

The phylogenetic analysis of these 24 BC, BFC and CF mosaics showed six clusters with distinct recombination profiles (Figure 2) containing 19 isolates; five isolates (BRGO4156, BRMT2509, BRMT3086, BRMS43 and BRPI34) did not cluster with other samples. The BRGO4156 and BRMT3086 isolates initially grouped into cluster #4, however with 67% bootstrap and not sharing the same recombination profile. When these isolates were removed from the analysis, a bootstrap >80 % was observed. The Cluster #1 contained five BC isolates (Goiás n=1, Mato Grosso n=1, Piauí n=3), the Cluster #2 had two BC isolates (Maranhão n=1, Piauí n=1). The Cluster #3 was composed by three BFC recombinant isolates (Goiás n=1, Mato Grosso n=2). The Cluster #4 contained five CRF31_BC-like isolates (Goiás n=1, Mato Grosso do Sul n=2, Mato Grosso n=1, Piauí n=1). The Cluster #5 contained two CRF60_BC-like isolates (Maranhão n=1, Mato Grosso do Sul n=1) while Cluster # 6 contained two CF isolates from Tocantins.

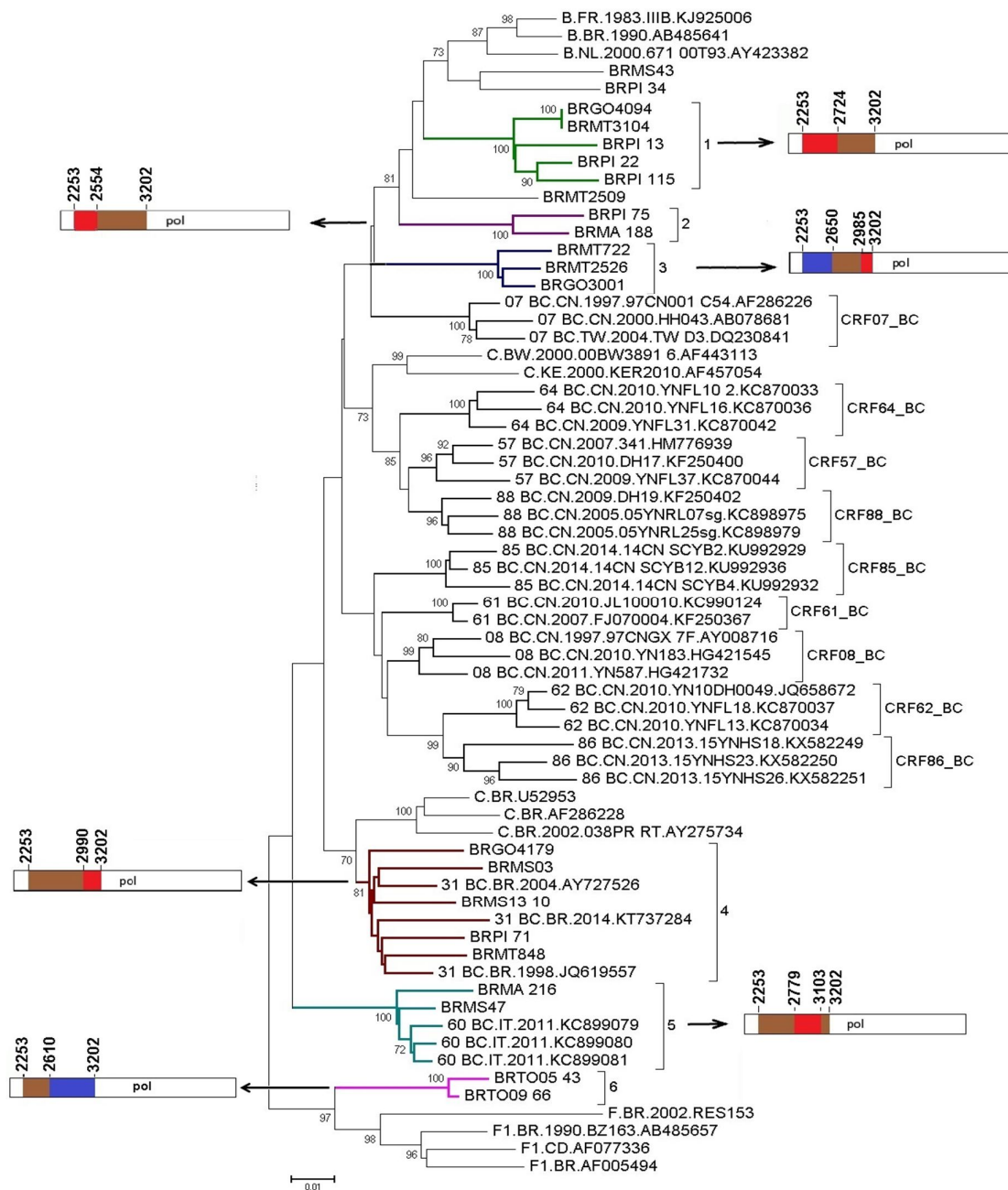


Figure 2: Phylogenetic tree of partial of the *pol* gene sequences among BC, BFC and CF recombinant HIV-1 isolates from Central West, North and Northeast Brazil. The mosaic pattern of: CRF60_BC-like, CRF31_BC-like, BC, BFC and CF isolates is depicted on the right and left sides. The tree was constructed using MEGA using neighbor-joining method and was based on Kimura's two-parameter distances. Only bootstrap values > 70% were considered. For Clusters #4, high support (>80%) was obtained after the exclusion of BRGO4156 and BRMT3086 sequences. The subtypes were represented by different colors: subtype B: red, subtype C: brown and subtype F: blue.

Analysis of partial genome sequences

The deduced mosaic structures of the BC recombinant strains were carefully compared and the patterns of recombination breakpoints are summarized in Figure 3. Attempts to amplify four HIV-1 fragments that compose the whole genome sequences of these recombinant isolates were only partially achieved. For twelve out of 24 BC, BFC and CF recombinant isolates we were able to amplify additional partial sequences (Figure 3). For five BC recombinant isolates from Cluster #1, additional partial sequences of three isolates were obtained: BRGO4094 (2266-4783bp; 4953-6624bp); BRPI115 (2263-4816bp; 7186-8455bp; 8746-9574bp) and BRMT3104 (2252-4672bp). These isolates were predominantly composed of subtype B, except for the 2724-3214bp fragment which belonged to subtype C. Among the three BFC isolates from Cluster #3, partial sequences were obtained: BRMT2526 (1149-9615bp); BRGO3001 (421-5610bp; 6011-9615bp) and BRMT722 (2263-4822bp). In these sequences the subtype F1 corresponded to the 1131-2650bp and 3550-5051bp fragments. Among the five CRF31_BC-like isolates from Cluster #4, three isolates amplified partial sequences: BRGO4179 (421-4793bp), BRPI71 (2253-3202bp; 6009-9623bp) and BRMS03 (421-3202bp). These isolates were mainly subtype C, except for the 220bp fragment (2996-3216bp), which belonged to subtype B. Additional partial sequences were obtained for two isolates from Cluster #6: BRTO05_43 (419-4735bp; 7112-9621bp) and BRTO09_66 (2253-3202bp). Partial sequence of BRTO05_43 isolate showed that subtype C prevailed except for two small fragment F1 portions (2614-3116bp and 3679-4055bp) (Figure 3).

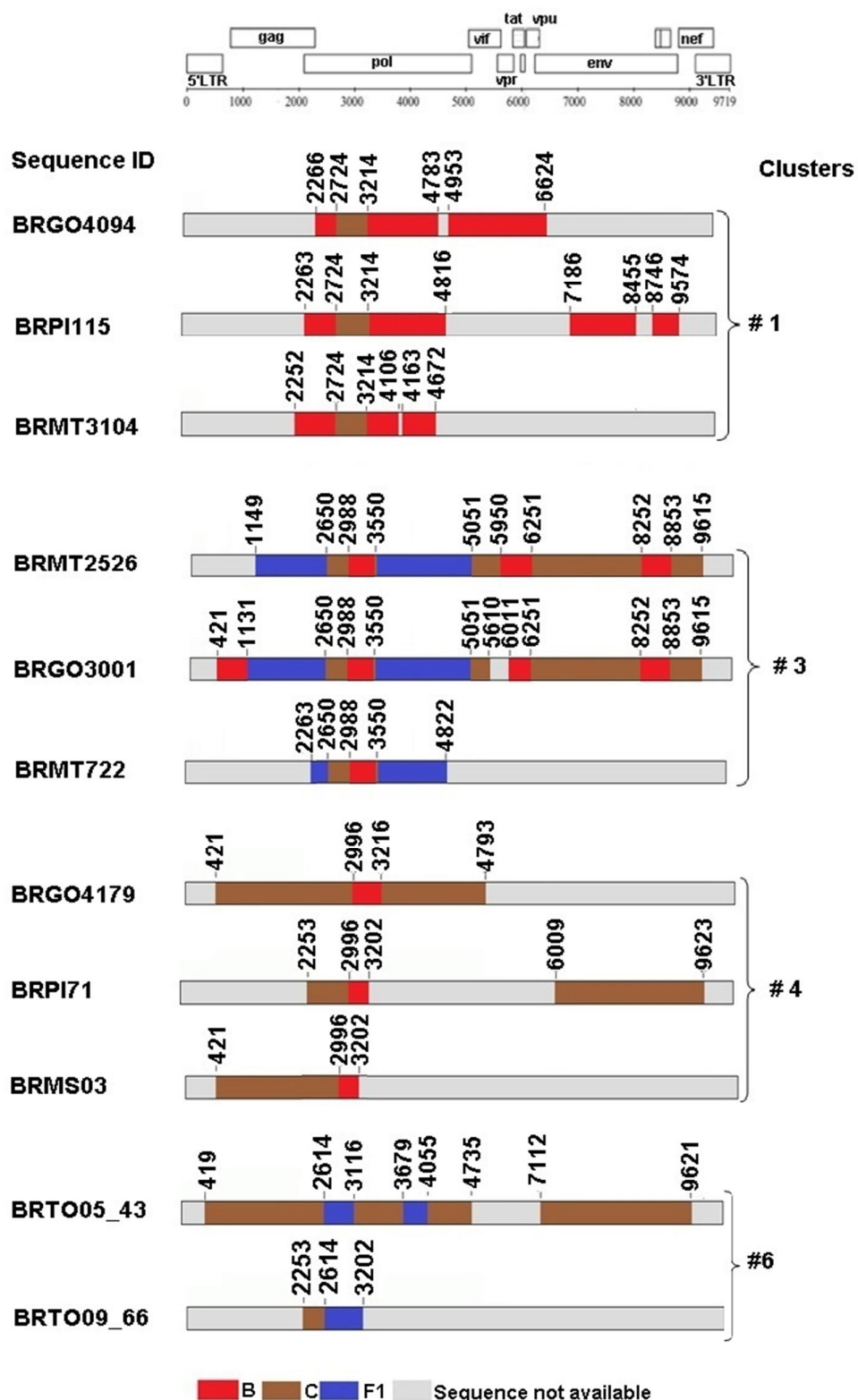


Figure 3. Schematic representation of the partial genome sequences and breakpoint profiles of the BC isolates (Cluster #1), BFC isolates (Cluster # 3), CRF31_BC-like isolates (Cluster #4), and CF (Cluster #6) isolates identified in this study. Red, subtype B; brown, subtype C and blue, subtype F1.

DISCUSSION

Our analyses of 828 HIV-1 isolates collected in six Brazilian States (Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Maranhão and Piauí) showed BC and FC recombinant isolates with remarkable genetic diversity. In these States, “pure” subtype C was detected at different rates (from low to high) while “pure” subtype F1 showed low to moderate rates. A recent study from our group reported the identification of the new CRF90_BF1 and an extensive genetic variation of BF URFs circulating in these States (Reis et al. 2017). Overall our data point out the great diversity of HIV-1 recombination patterns in Brazil, including recombination events between subtype C and the major subtype B and between subtype C and the less prevalent subtype F1. BC, BFC and CF recombinants were detected in all six Brazilian States investigated. However, the recombination rates in these States are probably underestimated since scarce, HIV-1 sequences are available for most States, especially Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Maranhão and Piauí. Nevertheless if recombination events were found in small sample size, the chances of finding these events in larger populations also increase.

Previous studies in different subpopulation groups from our study area, located away from the epicenter of the epidemics in the Southeast region, have shown the preponderance of subtype B, ranging from 59% to 86.5%. Subtype C and subtype F1 infections have been detected at low to high rates (Cardoso et al. 2009; Cardoso & Stefani 2009; Cardoso et al. 2010; Cardoso et al. 2011; Carvalho et al. 2011; Ferreira et al. 2011; da Silveira et al. 2012; Alcântara et al. 2012; da Costa et al. 2013; Moura et al. 2015a; Moura et al. 2015b; Lima et al. 2016b). In Brazil, the prevalence of subtype F1 has shown significant regional variance: 34.6% in the Northeast and 6.6% in the South region (Cavalcanti et al. 2012; Silveira et al. 2012; Grinberg et al 2015; Lima et al. 2016a; Gräf et al 2016). Studies indicate that the epicenter of the Brazilian subtype C epidemic is the South region, either Paraná or Rio Grande do Sul States (Bello et al. 2012; Delatorre et al. 2013; Gräf et al. 2015). Interestingly, our results showed that the proportion of “pure” subtype C decreased as the geographical area of study was further away from the South region. Considering the distance from Curitiba/capital of Paraná, the following rates of “pure” subtype C were identified: 10.2% in Campo Grande/Mato Grosso do Sul (distance: 999,4 km), 8.6% in Goiânia/Goiás (distance: 1285km), similar rates in Palmas/Tocantins (5.8%, distance: 2129km), and in Cuiabá/Mato Grosso (5.4%, distance: 1701km). The lowest rates of “pure” subtype C were found in the most distant capitals 2.8% in Sao Luis/Maranhão (distance: 3311km) and 1.1% in Teresina/Piauí (distance: 3049km). Intriguingly, in PI where the lowest rate of “pure” subtype C was detected, showed a moderate rate of BC recombinants (6.7%, 6/89). These results suggest that BC recombinants were probably imported from other States

and not generated locally. Corroborating this hypothesis, we have identified in Piauí one CRF31_BC-like genome, which originated in Porto Alegre, South Brazil. In our study sample, the prevalence of “pure” subtype F1 also showed the same trend decreasing northwards. So far, in Brazil the highest prevalence of subtype F1 infections (around 30%), has been reported in Pernambuco, Northeast region (Cavalcanti et al. 2012; Lima et al. 2016a). Nevertheless, an increasing amount of data indicates that subtype F1 has disseminated in Brazil as recombinants with subtype B (Alencar et al. 2013; da Costa et al. 2016). Overall our results confirm the dissemination of subtype C in inland Brazil while a limited geographic dissemination of “pure” subtype F1 was seen (Reis et al. 2017).

Currently eleven different CRF_BC (CRF07, CRF08, CRF31, CRF57, CRF60, CRF61, CRF62, CRF64, CRF85, CRF86 and CRF88) were reported at Los Alamos, the majority of them originated in China, where they represent one of the most prevalent and characteristic variant. The first CRF07_BC was reported in China in 2000 (Su et al. 2000; Rodenburg et al. 2001). The CRF31_BC is the first and the only CRF_BC reported in Brazil (Santos et al. 2006) and its description was based on three complete genomes from south Brazil. Remarkably, in our study, around 20.1% (5/24) of BC genomes identified were CRF31_BC-like. These genomes were identified in four Brazilian States, mostly in the Central West States, which are closer to Curitiba/South while just one, was from the Northeast. In our study, two CRF60_BC-like genomes were identified, one in Mato Grosso and one in Maranhão State. The characterization of CRF60_BC was based on three genome sequences from two unlinked homosexual males and one heterosexual female patient from Italy (Simonetti et al. 2013). The phylogenetic analyses of CRF60_BC indicated that part of subtype C sequences clustered with subtype C from South America suggesting that it originated in South America. This study assumption is corroborated by the homosexual tourism links between Brazil and Italy. In this regard, one of our CRF60_BC-like isolates was identified in a homosexual male patient. A previous study reported a robust subtype C cluster among isolates from homosexual men from Brazil and the United Kingdom (de Oliveira et al. 2010). Overall these results corroborate the link between CRF60_BC origin and homosexual Brazilian men patients.

In conclusion, our results show the evolution of HIV-1 strains outside the epicenter and provide evidences on the pattern of genetic divergence into new strains overtime. Our study indicates extensive recombination patterns of BC, BFC and CF isolates circulating in Central West, north and northeast Brazil. We acknowledge that the lack of full nor near full genome sequences of our BC and FC recombinant viruses represents

a limitation of our study. However, we cannot exclude the possibility that other new yet unidentified CRF_cpx or already identified CRF_BC may be included among these viruses. In general, our data contribute to the knowledge on the diversity of recombination patterns of HIV-1 in Brazilian regions away from the epicenter of the epidemics.

REFERENCES

Alcântara KC, Reis MN, Cardoso LP, Bello G, Stefani MM. Increasing heterosexual transmission of HIV-1 subtype C in Inland Central Western Brazil. *J Med Virol.* 2013;85(3):396-404.

Alcântara KC, Lins JB, Albuquerque M, Aires LM, Cardoso LP, Minuzzi AL, et al. HIV-1 mother-to-child transmission and drug resistance among Brazilian pregnant with high Access to diagnosis and prophylactic measures. *Journal of Clinical Virology.* 2012; 54:15-20.

Alencar C, Sabino E, Carvalho S.; Leão S, Carneiro-Proietti A. 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(3):387-92.

Bello G, Zanotto PM, Iamarino A, Gräf T, Pinto AR, Couto-Fernandez JC, Morgado MG. Phylogeographic analysis of HIV-1 subtype C dissemination in Southern Brazil. *PLoS One.* 2012;7(4):e35649.

Cardoso LP, Queiroz BB, Stefani MM. HIV-1 pol phylogenetic diversity and antiretroviral resistance mutations in treatment naïve patients from Central West Brazil. *J Clin Virol.* 2009; 46(2):134-139.

Cardoso LPV, Stefani MMA. High level of multidrug resistance mutations in HIV type 1 pol gene and resistance-associated mutations to enfuvirtide (T-20) among antiretroviral-experienced patients from central Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2009; 25:943-950.

Cardoso LPV, Pereira GAS, Viegas AA, Schmaltz LEPR, Stefani MMA. HIV-1 primary and secondary antiretroviral drug resistance and genetic diversity among pregnant women from Central Brazil. *Journal of Medical Virology.* 2010; 82:351-357.

Cardoso LP, da Silveira AA, Francisco RB, da Guarda Reis MN, Stefani MM. Molecular characteristics of HIV type 1 infection among prisoners from Central Western Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2011; 27(12):1349-1353.

Cavalcanti AM, Brito AM, Salustiano DM, Lima KO, Silva SP et al. Primary resistance of HIV to antiretrovirals among individuals recently diagnosed at voluntary counseling and testing centres in the metropolitan region of Recife, Pernambuco. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2012; 107(4):450-7.

Carvalho BC, Cardoso LP, Damasceno S, Stefani MM. 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*. 2011; 27(10):1081-1087.

da Costa CM, Costa de Oliveira CM, Cheuan de Melo YF, Delatorre E, Bello G. et al. High HIV-1 Genetic Diversity in Patients from Northern Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2016; 32(9): 918-22.

da Costa ZB, de Lima YA, Martelli CM, Stefani MM. Transmitted HIV resistance among pregnant young women infected with HIV-1 in Brazil. *AIDS Patient Care STDS*. 2013; 27(8):439-41.

de Oliveira T, Pillay D, Gifford RJ, UK Collaborative Group on HIV Drug Resistance. The HIV-1 subtype C epidemic in South America is linked to the United Kingdom. *PLoS One*. 2010; 5(2): e9311.

da Silveira AA, Cardoso LP, Francisco RB, de Araújo Stefani MM. HIV type 1 molecular epidemiology in pol and gp41 genes among naïve patients from Mato Grosso do Sul State, central western Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2012; 28(3):304-307.

Delatorre E, Couto-Fernandez JC, Bello G. HIV-1 Genetic Diversity in Northeastern Brazil: High Prevalence of Non-B Subtypes. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2017. [Epub ahead of print]

Delatorre E, Couto-Fernandez JC, Guimarães ML, Vaz Cardoso LP, DE Alcantara KC et al. Tracing the origin and northward dissemination dynamics of HIV-1 subtype C in Brazil. *PLoS One*. 2013; 8(9): e74072.

Ferreira AS, Cardoso LP, Stefani MM. 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(8):1301-1307.

Gifford RJ, Liu TF, Rhee SY, Kiuchi M, Hue S, Pillay D, et al. The calibrated population resistance tool: standardized genotypic estimation of transmitted HIV-1 drug resistance. *Bioinformatics* 2009; 25(9):1197-98.

Gräf T, Machado Fritsch H, de Medeiros RM, Maletich Junqueira D, Esteves de Matos Almeida S, Pinto AR. Comprehensive Characterization of HIV-1 Molecular Epidemiology and Demographic History in the Brazilian Region Most Heavily Affected by AIDS. *J Virol*. 2016;90(18):8160-8.

Gräf T, Vrancken B, Maletich Junqueira D, de Medeiros RM, Suchard MA, Lemey P, Esteves de Matos Almeida S, Pinto AR. Contribution of Epidemiological Predictors in Unraveling the Phylogeographic History of HIV-1 Subtype C in Brazil. *J. Virol*. 2015;89(24):12341-8.

Gräf T, Pinto AR. The increasing prevalence of HIV-1 subtype C in Southern Brazil and its dispersion through the continent. *Virology*. 2013 Jan 5;435(1):170-8.

Grinberg G, Giron LB, Knoll RK, Galinskas J, Camargo M. et al. High prevalence and incidence of HIV-1 in a counseling and testing center in the city of Itajaí, Brazil. *Braz J Infect Dis*. 2015;19(6): 631-5.

Hemelaar J, Gouws E, Ghys PD, Osmanov S. WHO-UNAIDS Network for HIV Isolation and Characterization. Global trends in molecular epidemiology of HIV-1 during 2000-2007. *AIDS*. 2011; 25(5):679-689.

Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol*. 1980; 16:111-120.

Lole KS, Bollinger RC, Paranjape RS, Gadkari D, Kulkarni SS, Novak NG, 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(1):152-160.

Librelotto CS, Gräf T, Simon D, de Almeida SE, Lunge VR. HIV-1 epidemiology and circulating subtypes in the countryside of South Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2015; 48(3):249-57.

Lima K, de Souza Leal É, Cavalcanti AM, Salustiano DM, de Medeiros LB. et al. Correction: Epidemiological, Clinical and Antiretroviral Susceptibility Characterization of Human Immunodeficiency Virus Subtypes B and Non-B in Pernambuco, Northeast Brazil. PLoS One. 2016a;11(6):e0158192.

Lima YA, Cardoso LP, Reis MN, Stefani MM. Incident and long term HIV-1 infection among pregnant women in Brazil: Transmitted drug resistance and mother-to-child transmission. J Med Virol. 2016b; 88(11):1936-43.

Mansky LM. The mutation rate of human immunodeficiency virus type 1 is influenced by the vpr gene. Virology. 1996; 222(2): 391-400.

Moura ME, Reis MN, Lima YA, Eulálio KD, Cardoso LP, Stefani MM. Low rate of transmitted drug resistance may indicate low access to antiretroviral treatment in Maranhão State, northeast Brazil. AIDS Res Hum Retroviruses. 2015a; 31(2):250-4.

Moura ME, da Guarda Reis MN, Lima YA, Eulálio KD, Cardoso LP, Stefani MM. HIV-1 transmitted drug resistance and genetic diversity among patients from Piauí State, Northeast Brazil. J Med Virol. 2015b; 87(5):798-806.

Nájera R, Delgado E, Pérez-Alvarez L, Thomson MM. Genetic recombination and its role in the development of the HIV-1 pandemic. AIDS. 2002; Suppl 4:S3-16.

Nei M & Kumar S. Molecular Phylogenetics and Evolution. Oxford University. 2002; 3:567-568.

Perelson AS, Neumann AU, Markowitz M, Leonard JM, Ho DD. HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time. Science. 1996;271(5255):1582-6.

Passaes CP, Bello G, Lorete RS, Matos Almeida SE, Junqueira DM, Veloso VG, et al. Genetic characterization of HIV-1 BC recombinants and evolutionary history of the CRF31_BC in Southern Brazil. Infect Genet Evol. 2009; 9(4):474-82.

Pessoa R, Loureiro P, Esther Lopes M, Carneiro-Proietti AB, Sabino EC et al. Ultra-Deep Sequencing of HIV-1 near Full-Length and Partial Proviral Genomes Reveals High Genetic Diversity among Brazilian Blood Donors. PLoS One. 2016; 11(3):e0152499.

Reis MNDG, Bello G, Guimarães ML, Stefani MMA. Characterization of HIV-1 CRF90_BF1 and putative novel CRFs_BF1 in Central West, North and Northeast Brazilian regions. PLoS One. 2017;12(6):e0178578.

Robertson DL, Anderson JP, Bradac JA, Carr JK, Foley B, Funkhouser RK, et al. HIV-1 nomenclature proposal. Science. 2000; 288(5463):55-56.

Rodenburg CM, Li Y, Trask SA, Chen Y, Decker J., et al. Near full-length clones and reference sequences for subtype C isolates of HIV type 1 from three different continents. AIDS Res Hum Retroviruses. 2001;20;17(2):161-8.

Santos AF, Souza TM, Soares EA, Sanabani S, Martinez AM. et al. Characterization of a new circulating recombinant form comprising HIV-1 subtypes C and B in southern Brazil. Aids,2006;20(16):2011-9.

Silveira J, Santos AF, Martinez AM, Góes LR, Mendonza-Sassi R. et al. Heterosexual transmission of human immunodeficiency virus type 1 subtype C in southernBrazil. J Clin Virol.2012;54(1):36-41.

Simonetti FR, Lai A, Monno L, Binda F, Brindicci G. et al. Identification of a new HIV-1 BC circulating recombinant form (CRF60_BC) in Italian young men having sex with men. Infect Genet Evol. 2014;23:176-81.

Su L, Graf M, Zhang Y, Von Briesen H, Xing H. et al. Characterization of a virtually full-length human immunodeficiency virus type 1 genome of a prevalent intersubtype (C/B') recombinant strain in China. J Virol. 2000;74(23):11367-76.

Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. Mol Biol Evol. 2013; 30(12): 2725–2729.

Tebit DM, Arts EJ. Tracking a century of global expansion and evolution of HIV to drive understanding and to combat disease. Lancet Infect Dis. 2011;11(1):45-56.

Thompson JD, Higgins DS, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res. 1994; 22:4673-4680.

Xia, X., Xie, Z. DAMBE: software package for data analysis in molecular biology and evolution. J. Hered. 2001; 92,371–373.

Wensing AM, Calvez V, Günthard HF, Johnson VA, Paredes R, Pillay D, Shafer RW, Richman DD. 2017 Update of the Drug Resistance Mutations in HIV-1. *Top Antivir Med.* 2017;24(4):132-133.

Worobey M, Holmes EC. Evolutionary aspects of recombination in RNA viruses. *J Gen Virol.* 1999;80(Pt 10):2535-43. Review

6. DISCUSSÃO

Os resultados apresentados nesta Tese se basearam em sequências *pol* e em dados de genoma completo/quase completo/parcial de 111 (13,4%, 111/828) isolados recombinantes intersubtipos BF, BC, BFC e CF identificados entre 828 pacientes oriundos de seis estados Brasileiros: Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Tocantins, Maranhão e Piauí. Apresentamos o genoma completo do HIV-1 de nove isolados, o genoma quase completo de oito isolados e os fragmentos parciais do genoma de dezessete isolados. Essas sequências pertenciam a pacientes de diversos subgrupos populacionais incluindo indivíduos recém-diagnosticados e virgens de tratamento, gestantes, presidiários e pacientes com infecção crônica em falha terapêutica, coletados num período de 2003-2013. Em conjunto os resultados deste estudo corroboram estudos realizados em outras regiões Brasileiras que apontam uma extensa variabilidade genética de isolados intersubtipos no país (SANTOS *et al.*, 2007; PASSAES *et al.*, 2009; PESSOA *et al.*, 2015; da COSTA *et al.*, 2016; PESSOA *et al.*, 2016; DELATORRE *et al.*, 2017).

O primeiro artigo reporta pela primeira vez a circulação de uma nova CRF_BF denominada pelo Los Alamos Laboratory, CRF90_BF1 nas regiões Centro-Oeste e Norte do Brasil. Esta nova CRF identificada em indivíduos sem vínculo epidemiológico confirma sua capacidade de causar microepidemias nos estados de Goiás, Mato Grosso e Tocantins. Além da ampla amostragem (828 sequências) de vários municípios de seis estados Brasileiros, ampliamos a busca de isolados com perfis semelhantes de recombinação além das regiões geográficas de estudo mediante pesquisa por BLAST em bancos de dados públicos. Estas buscas indicaram que algumas URFs podem ser na verdade CRFs, pois isolados com alto grau de similaridade foram identificados em outras regiões geográficas do país. A CRF90_BF1 é a nona CRF Brasileira descrita envolvendo os subtipos B e F1 e sua prevalência em nosso estudo foi de 1,3% (11/828). Análises da mediana do tempo do ancestral comum mais recente (T_{MRCA}) estimaram que a CRF90_BF1 esteja circulando desde 1986, ou seja, por três a quatro décadas. Os pacientes desse estudo infectados pela CRF90_BF1 foram diagnosticados entre 2002-2011. É possível que as CRFs identificadas no Brasil estejam circulando por décadas antes de serem identificadas, como a CRF29_BF se originou no início da epidemia Brasileira, mas só foi descrita vinte anos depois (De SÁ-FILHO *et al.*, 2006; MELO *et*

al., 2012). Apesar de não ter sido estimada o T_{MRCA} das CRF70/71_BF, acredita-se que isolados apresentando o mesmo perfil de recombinação em *pol* estejam circulando desde 2002 (SANABANI *et al.*, 2006; PESSOA *et al.*, 2014b).

Além disso, nosso estudo mostra evidência, como demonstrado pelas análises de busca por BLAST, de que a CRF90_BF1 têm uma circulação geográfica mais ampla no território nacional. Além do Centro-Oeste e Tocantins, a CRF90_BF1 provavelmente circula também no estado de Rondônia, que faz fronteira com a Bolívia. Em geral, nossos dados de recombinantes BF corroboram estudos recentes realizados na região Norte, que mostram que a prevalência de recombinantes BF tem aumentado consideravelmente (da COSTA *et al.*, 2016; Dos ANJOS SILVA *et al.*, 2016; ANDRADE *et al.*, 2017). Entretanto a prevalência real dessa CRF pode estar subestimada devido a escassez de dados moleculares do HIV-1 em vários estados Brasileiros como em Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Tocantins e Rondônia. Estes dados mostram que, salvo raras exceções como observada em Pernambuco, o subtipo F1 no Brasil se disseminou pelo território nacional majoritariamente na forma de recombinantes com o subtipo B e não como subtipo F1 “puro” sugerindo uma vantagem adaptativa/evolutiva dos recombinantes (TURK *et al.*, 2006). De fato, apesar da predominância do subtipo B na maioria das regiões geográficas Brasileiras, exceto no Sul onde prevalece o subtipo C, estudos mostraram que a prevalência de subtipos “não B”, particularmente URFs_BF e URFs_BC aumentou na última década (PASSAES *et al.*, 2009; SANABANI *et al.*, 2013; PRELLWITZ *et al.*, 2013; da COSTA *et al.*, 2016; PESSOA *et al.*, 2015; GRÄF *et al.*, 2016). Nossos estudos mostraram uma porcentagem significativa de formas recombinantes de BF (4,4-29%) nas regiões Centro-Oeste, Norte e Nordeste (CARDOSO *et al.*, 2009; CARDOSO & STEFANI, 2009; CARDOSO *et al.*, 2010; CARDOSO *et al.*, 2011; FERREIRA *et al.*, 2011; CARVALHO *et al.*, 2011; SILVEIRA *et al.*, 2012, ALCÂNTARA *et al.*, 2012; da COSTA *et al.*, 2013; MOURA *et al.*, 2015a; MOURA *et al.*, 2015b; LIMA *et al.*, 2016b). Nossos resultados confirmam esta tendência de expansão de subtipos “nao B” notadamente recombinantes BF no país que desempenham de forma cada vez mais marcante um papel relevante na epidemia Brasileira de AIDS.

As CRFs_BF Brasileiras mais recentemente descritas (CRF70_BF e CRF71_BF) foram identificadas entre doadores de sangue do estado de Pernambuco, região Nordeste (PESSOA *et al.*, 2014b). O CRF72_BF1 foi identificado entre doadores de sangue de

cinco bancos de sangue públicos em Minas Gerais, região Sudeste (PESSOA *et al.*, 2014a). As três últimas CRFs_BF Brasileiras foram obtidas a partir do sequenciamento de próxima geração, uma tecnologia nova e altamente eficaz que gera informação mais precisa que o sequenciamento de Sanger e tem o potencial de aumentar a diversidade viral pois pode identificar populações virais minoritárias enquanto sequenciamento Sanger só identifica populações virais que representem pelo menos 20% dos vírus circulantes. Esse método traz uma grande economia de tempo, porém ainda continua cara e inacessível para centros de pesquisa menores que não possuem uma grande demanda na rotina. Diversos artigos foram publicados nos últimos anos por equipes Brasileiras empregando sequenciamento de próxima geração principalmente para avaliar diversidade viral em doadores de bancos de sangue Brasileiros.

Esse grupo de pesquisa descreveu as três últimas CRFs Brasileiras, além de inúmeras URFs. Esses dados recentes apontam para o aumento de detecção de CRFs circulantes em diferentes regiões geográficas e que apresentam potencial de disseminação pelo país. No entanto, o número de sequências completas do genoma completo/quase completo de HIV-1 disponíveis ainda é limitado, especialmente as sequências de isolados de áreas mais afastadas do epicentro da epidemia, como nossa área de estudo (Centro-Oeste, Norte e Nordeste). Nossos resultados sugerem que a proporção real de formas recombinantes BF e outras na pandemia Brasileira provavelmente é subestimada. Além disso, nosso estudo reforça a necessidade de continuidade de estudos moleculares do HIV, preferencialmente envolvendo genoma completo para monitorar a evolução da diversidade viral no país.

As CRF28_BF e CRF29_BF foram descritas no Sudeste em 2006 (Santos, estado de São Paulo) representam as primeiras CRFs Brasileiros e admite-se que tiveram sua data de origem em 1988-1989 (RISTIC *et al.*, 2011). Entre todos os isolados BF identificados em nosso estudo, encontramos uma taxa moderada de isolados recombinantes com perfis de recombinação semelhantes a CRF28_BF e CRF29_BF (16,1%, 14/87). Identificamos CRF28/29_BF-like nos estados de Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul. Estudo realizado no estado da Bahia identificou taxas semelhantes as nossas de CRF28/29_BF (10-21%) (MONTEIRO-CUNHA *et al.*, 2011, SANTOS *et al.*, 2011). Desta forma nossos resultados representam uma das maiores frequências de CRF28/29_BF identificadas fora do estado de São Paulo,

confirmando o potencial de interiorização e disseminação destas CRFs em outras regiões distantes do Sudeste.

O Manuscrito I caracteriza o genoma quase completo do HIV-1 de três URFs_BF circulantes na região Centro-Oeste e fragmentos parciais de 9 isolados de três estados Brasileiros (Goiás, Mato Grosso e Maranhão). Esses pacientes foram diagnosticados num período 2002-2013 e incluíam, pacientes virgens de tratamento ARV, gestantes diagnosticadas durante o pré-natal e pacientes em falha terapêutica. Com relação as três URFs caracterizadas, os isolados (BRGOMI744 e BRGO4056) eram de gestantes, diagnosticadas durante o pré-natal, ambas não haviam feito uso de ARV e relataram sua exposição heterossexual. O isolado BRMT1319 pertencia a um paciente cujo diagnóstico ocorreu em 2002, nove anos após o diagnóstico continuava sem usar ARV. Ele relatou exposição homossexual. As três URFs tem perfil de recombinação na região *pol*, distintas entre si, mas semelhantes com outras sequências do banco de dados com Los Alamos.

Após a caracterização da primeira URF_BF no Brasil em 1998, outros estudos analisaram sequências do genoma completo do HIV-1 em pacientes da região Sudeste. Muitas sequências foram classificadas como URFs_BF em sequências originalmente classificadas como subtipos B ou F1. Estes estudos mostraram que a prevalência das URFs sempre foram subestimadas devido o sequenciamento de fragmentos menores dos isolados (GAO *et al.*, 1998; THOMSON *et al.*, 2004; DE SA FILHO *et al.*, 2005). A cocirculação dos subtipos B e F1 em diversas regiões do Brasil propicia coinfeção e ou superinfecção promovendo a formação de recombinantes tipo URFs_BF ou CRF_BF ou até recombinação entre URFs e CRFs ou entre as CRFs existentes (recombinantes inter CRFs). Estes vírus representam formas recombinantes de segunda e terceira geração que por sua vez podem gerar outras variantes com *fitness* melhorado para influenciar a transmissão viral (THOMSON *et al.*, 2002; KONINGS *et al.*, 2006).

Apesar das URFs representarem apenas 4% das infecções por HIV-1 em todo mundo, essa prevalência tem aumentado de forma significativa, devido a identificação de novas URFs a cada dia, esse fenômeno tem sido evidenciado no Brasil e em todo o mundo (FERNADEZ-GARCIA *et al.*, 2016; OGAWA *et al.*, 2016; LEE *et al.*, 2016; XU *et al.*, 2017). Estudos Brasileiros envolvendo o sequenciamento do genoma completo/quase completo também tem identificado uma alta prevalência das formas recombinantes, particularmente URFs_BF (BARRETO *et al.*, 2006; SANABANI *et al.*,

2006a; SANABANI *et al.*, 2006b; PESSOA *et al.*, 2016). Diversas URFs descritas continuam se espalhando na população, dando origem a novas CRFs, especialmente no Brasil, onde muitas CRFs tiveram origem a partir de URFs derivadas da recombinação entre os subtipos B e F1 (CRF28_BF, CRF29_BF, CRF39_BF, CRF40_BF, CRF46_BF, CRF70_BF, CRF71_BF e CRF72_BF) ou entre os subtipos B e C (CRF31_BC) (SANTOS *et al.*, 2006; SANABANI *et al.*, 2006a; SANABANI *et al.*, 2006b; GUIMARAES *et al.*, 2008; PESSOA *et al.*, 2014a; PESSOA *et al.*, 2014b). Estes dados chamam a atenção para o aumento crescente e disseminação dos CRFs e URFs que passam a desempenhar um papel cada vez mais importante na pandemia de HIV-1. Entretanto, é possível que a proporção geral de recombinantes do HIV-1 na pandemia global ainda esteja subestimada devido ao número ainda restrito de sequências de genomas completos disponíveis, especialmente em várias regiões do Brasil, pois essa distribuição global e regional tem se mostrado extremamente complexa e dinâmica.

No estudo realizado por Sanabani e colaboradores em 2010 foram caracterizadas 34 URFs_BF circulantes em SP, além da CRF46_BF. Em 2016, Pessoa e colaboradores ao pesquisar isolados de doadores de sangue (cidades de São Paulo, Minas Gerais, Pernambuco e Rio de Janeiro) descreveram outras 32 novas URFs_BF. Os dados do nosso estudo corroboram o crescimento exponencial de novas URFs_BF não só na região Sudeste e Nordeste, mas também na região Centro-Oeste e Norte, pois além de identificarmos a CRF90_BF1, outras sequências com o mesmo perfil de recombinação dessas três URFs_BF foram identificadas indicando que possam ser potenciais novas CRFs_BF. O sequenciamento do genoma completo dessas sequências é necessário para esclarecer esta hipótese.

A caracterização da grande variabilidade das formas recombinantes BC e FC do HIV-1 circulantes na nossa área de estudo foi também investigada (manuscrito II). Outros estudos Brasileiros descreveram taxas variáveis de recombinantes BC: 8% em Rondônia, 1% no Amazonas e Amapá (da COSTA *et al.*, 2016); 2% em Santa Catarina, 10% no Rio Grande do Sul (GRÄF *et al.*, 2016); 6,7% no Piauí (MOURA *et al.*, 2015b), 1% Rio de Janeiro (PILOTTO *et al.*, 2013), 4,3% em Mato Grosso (FERREIRA *et al.*, 2011), 8,2% em Mato Grosso do Sul (da SILVEIRA *et al.*, 2012), 4,4% em Goiás (LIMA *et al.*, 2016b). Nos estados de Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Tocantins, Maranhão e Piauí, o subtipo C "puro" foi detectado em taxas diferentes variando de baixa a alta. Estudos em estados na região Sul e fora dela indicam taxa variável de subtipo C no país: 1% no Amapá, 6% em Tocantins

(CARVALHO *et al.*, 2011; da COSTA *et al.*, 2016), 1% em Pernambuco e Piauí, 14% em Alagoas (Moura *et al.*, 2015b; LIMA *et al.*, 2016a; DELATORRE *et al.*, 2017), 2% no Rio de Janeiro, 7% em Minas Gerais (PIMENTEL *et al.*, 2013; PESSOA *et al.*, 2016) e 21,5% no Paraná, 44% no Rio Grande do Sul e 66% em Santa Catarina (SILVA *et al.*, 2010; GRÄF *et al.*, 2016), 5,4% em Mato Grosso (FERREIRA *et al.*, 2011), 10,2% em Mato Grosso do Sul (da SILVEIRA *et al.*, 2012) e 2,1-16,6% em Goiás (CARDOSO e STEFANI, 2009; ALCANTARA *et al.*, 2012; da COSTA *et al.*, 2013). Já o subtipo F1 "puro" apresentou taxa entre baixa a moderadas (da SILVEIRA *et al.*, 2012; GUIMARÃES *et al.*, 2015; da COSTA *et al.*, 2016; DELATORRE *et al.*, 2017). Em geral, estudos de diferentes regiões Brasileiras tem mostrado prevalência variável de subtipo F "puro": 3,4% em Manaus, 5,7% no Pará e 14% no Amapá (LOPES *et al.*, 2015; Dos ANJOS SILVA *et al.*, 2016; ANDRADE *et al.*, 2017), 9% no Rio de Janeiro, 10% em São Paulo e 17,2% em Minas Gerais (ALENCAR *et al.*, 2013; TUPINAMBÁS *et al.*, 2013; GUIMARÃES *et al.*, 2015). 1,9% no Maranhão, 2% no Ceará, 4% em Alagoas, 31,5% em Pernambuco (MOURA *et al.*, 2015a; LIMA *et al.*, 2016a; DELATORRE *et al.*, 2017), 3,3% em Mato Grosso (FERREIRA *et al.*, 2011), 8,2% em Mato Grosso do Sul (da SILVEIRA *et al.*, 2012), 4,2-6,6% em Goiás (CARDOSO e STEFANI, 2009; da COSTA *et al.*, 2013; LIMA *et al.*, 2016b). Em geral, nossos dados demonstram a grande diversidade de padrões de recombinação de HIV-1 no Brasil, incluindo eventos de recombinação entre os subtipos C e B e entre os subtipos C e F1, que são menos prevalentes. As formas recombinantes BC, BFC e CF foram detectadas em todos seis estados Brasileiros investigados. Estudos de monitoramento da diversidade genética do HIV-1 permitirão definir se nestes estados ocorrem tendência preferencial de disseminação de subtipos C recombinantes quando comparados com subtipo C puro. Além disso estudos de monitoramento permitirão identificar o potencial de disseminação dos subtipos C e F1 "puros" no território Brasileiro bem como o potencial de geração e disseminação de recombinantes entre estes dois subtipos minoritários.

No nosso estudo o Cluster BFC foi composto de três isolados dos estados de Goiás (isolado BRGO3001 pertencente a uma artesã) e Mato Grosso (isolado BRMT2526, pertencente a um caminhoneiro e isolado BRGO722 obtido de um cabelereiro). Além disso, temos evidências mediante busca pelo BLAST no site de Los Alamos da existência de mais seis isolados todos compartilhando o mesmo perfil de recombinação em *pol* em outros estados. Estas amostras identificadas por BLAST

foram coletados entre 2006-2015, sendo cinco isolados do Brasil (3 do Paraná e 2 do Mato Grosso) e um isolado da Itália. A paciente (BRGO3001) era proveniente do estado do Mato Grosso e relatou que havia se mudado há pouco tempo para o estado de Goiás. Embora não tenhamos a data nem local de infecção e diagnóstico desta paciente, não podemos descartar a possibilidade de que esta provável CRF_cpx tenha sido originada no Mato Grosso ou Paraná. Além disso, a existência de outros isolados com perfil idêntico de recombinação sugere que estes isolados possam compor uma nova CRF ainda não identificada e que esteja circulando no território Brasileiro nos estados de Goiás, Mato Grosso, Paraná e na Itália. Esses dados sugerem a existência de uma nova CRF que de forma semelhante a CRF60_BF, esteja circulando em dois países. Somente a continuidade de estudos moleculares destes e outros isolados permitirão esclarecer esta hipótese.

Com relação as URFs_BC Brasileiras há poucos dados disponíveis. Em 2009 foram publicadas 4 URFs_BC provenientes de Porto Alegre (PASSAES *et al.*, 2009), posteriormente outras quatro URFs_BC foram publicadas por grupo de pesquisa de São Paulo, sendo 2 isolados de São Paulo coletados em 2002 e 2006, um isolado de Pernambuco e outro do Rio de Janeiro ambas amostras foram colhidas em 2010. Em nosso estudo observamos uma dificuldade maior em sequenciar isolados BC e FC do que isolados BF requerendo o desenho primers alternativos para as regiões do genoma que não conseguimos ter êxito no sequenciamento (LOS ALAMOS HIV DATABASE, 2017).

No Brasil, embora o subtipo B predomine na maioria dos estados Brasileiros, com o passar do tempo, temos observado mediante alguns estudos uma tendência de declínio do subtipo B junto com aumento da prevalência das formas recombinantes, principalmente envolvendo os subtipos B e F1 e os subtipos B e C (PESSOA *et al.*, 2014b, PESSOA *et al.*, 2015, da COSTA *et al.*, 2016) . Os estudos do nosso grupo de pesquisa na região Centro-Oeste mostraram prevalência do subtipo B (~71%) seguido de um percentual significativo e formas recombinantes BF1 (~13%) sendo que as e formas não-B somaram ~5% (CARDOSO *et al.*, 2009, ALCANTARA *et al.*, 2012, LIMA *et al.*, 2016b). No Brasil, a epidemiologia molecular do HIV-1 tem se caracterizado por significativa taxa de recombinação entre os subtipos B e F1, em algumas regiões as formas recombinantes BF tem sido apresentadas como a segunda mais prevalente. Apesar do subtipo B “puro” ser encontrado em abundância em nosso país, o mesmo não acontece com o subtipo F1 que não se disseminou de modo

expressivo na sua forma pura. O primeiro recombinante BF foi identificado no gene *env* em 1994 entre dois indivíduos Brasileiros com vínculo epidemiológico (SABINO *et al.*, 1994). A partir deste relato, observa-se um crescimento da frequência dessas formas recombinantes BF (GUIMARAES *et al.*, 2002). Estudos de genoma completo do HIV-1 indicam a possibilidade de que muitos isolados originalmente classificados como subtipo F1, sejam na verdade formas recombinantes BF (SANABANI *et al.*, 2010; PESSOA *et al.*, 2014a). Por outro lado, discute-se também a possibilidade de que a alta prevalência de subtipo B possa estar superestimada, pois muitos isolados classificados como B “puros” podem ser na verdade recombinantes BF ou BC. Estudo que identificou a CRF46_BF mostrou entre 36 isolados BF, seis isolados com uma pequena porção recombinante (61pb) de subtipo F1 em sequências que foram anteriormente classificadas como subtipo B (SANABANI *et al.*, 2010). Nosso estudo não incluiu análises em geração de genomas completos dos isolados classificados como B ‘puro’ portanto, não podemos excluir a possibilidade de que as taxas deste subtipo possam estar superestimadas e que estes possam ser recombinantes em outras regiões do genoma viral.

Em conclusão, Nossos dados revelam o aumento crescente e disseminação dos CRFs e URFs que passam a desempenhar um papel cada vez mais importante na pandemia de HIV-1. Entretanto, é possível que a proporção geral de recombinantes do HIV-1 na pandemia Brasileira e global ainda esteja subestimada devido ao número ainda restrito de sequências de genomas completos disponíveis, especialmente de várias regiões do Brasil.

7. CONCLUSÕES

-Nas regiões Centro-Oeste, Norte e Nordeste circulam uma significativa porcentagem de CRFs_BFs, algumas já descritas quando comparado a circulação de URFs BF;

-A CRF90_BF1, nona CRF_BF Brasileira foi descrita neste estudo e está circulando entre indivíduos majoritariamente heterossexuais que vivem em duas regiões do Brasil (Centro-Oeste e Norte);

-Nossos resultados trazem fortes evidências da existência de outras novas CRFs_BF que circulam nas regiões Centro-Oeste, Norte, Nordeste e Sul, uma vez que, em varios estados Brasileiros, mediante a busca por BLAST identificamos, na região *pol*, diversos isolados com perfis de recombinação idênticos aos isolados descritos no nosso estudo;

-Descrevemos uma alta circulação de CRF28_BF e CRF29_BF fora da região Sudeste;

-As taxas de infecções pelos subtipos C e F1 diminuíram do Centro-Oeste em direção ao norte do Brasil (de MS para PI).

-Existe uma alta diversidade genética entre os recombinantes BC, BFC, CF especialmente as CRF31_BC-like e CRF60_BC-like.

8. REFERÊNCIAS

ADOJAAN, M.; KIVISILD, T.; MANNIK, A.; KRISPIN, T.; USTINA, V. et al. Predominance of a rare type of HIV-1 in Estonia. **J Acquir Immune Defic Syndr**, v. 39, n. 5, p. 598-605, Aug 15 2005.

ALCANTARA, K. C.; REIS, M. N.; CARDOSO, L. P.; BELLO, G.; STEFANI, M. M. Increasing heterosexual transmission of HIV-1 subtype C in Inland Central Western Brazil. **J Med Virol**, v. 85, n. 3, p. 396-404, Mar 2013.

ALCANTARA, K. C.; LINS, J. B.; ALBUQUERQUE, M.; AIRES, L. M.; CARDOSO, L. P. et al. HIV-1 mother-to-child transmission and drug resistance among Brazilian pregnant women with high access to diagnosis and prophylactic measures. **J Clin Virol**, v. 54, n. 1, p. 15-20, May 2012.

ALCANTARA, K. C.; PEREIRA, G. A.; ALBUQUERQUE, M.; STEFANI, M. M. Seroreversion in children born to HIV-positive and AIDS mothers from Central West Brazil. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 103, n. 6, p. 620-6, Jun 2009.

ALENCAR, C.; SABINO, E.; CARVALHO, S.; LEAO, S.; CARNEIRO-PROIETTI, A. 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**, Mar 15 2013.

ANDRADE, S. D.; SABIDÓ, M.; MONTEIRO, W. M.; BENZAKEN, A. S.; TANURI, A. Drug resistance in antiretroviral-naive children newly diagnosed with HIV-1 in Manaus, Amazonas. **J Antimicrob Chemother**, v.72, n.6, p. 1774-83, Jun 2017.

ARRUDA, E.; SIMÕES, L.; SUCUPIRA, C.; MEDEIROS, M.; ARRUDA, E. et al. Short communication: intermediate prevalence of HIV type 1 primary antiretroviral resistance in Ceará State, Northeast Brazil. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v.27, n. 2, p.153-6, Feb 2011.

AVILA-RIOS, S.; SUED, O.; RHEE, S.Y.; SHAFER, R.W.; REYES-TERAN, G.
et al.

Surveillance of HIV Transmitted Drug Resistance in Latin America and the Caribbean: A Systematic Review and Meta-Analysis. **PLoS One**, v. 11, n. 6, p. e0158560, Jun 2016.

BARRE-SINOUSSE, F. HIV as the cause of AIDS. **Lancet**, v. 348, n. 9019, p. 31-5, Jul 6 1996.

BARRE-SINOUSSE, F.; CHERMANN, J. C.; REY, F.; NUGEYRE, M. T.; CHAMARET, S. et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). **Science**, v. 220, n. 4599, p. 868-71, May 20 1983.

BARRETO, C. C.; NISHYIA, A.; ARAUJO, L. V.; FERREIRA, J. E.; BUSCH, M. P. et al. Trends in antiretroviral drug resistance and clade distributions among HIV-1--infected blood donors in Sao Paulo, Brazil. **J Acquir Immune Defic Syndr**, v. 41, n. 3, p. 338-41, Mar 2006.

BARYSHEV, P. B.; BOGACHEV, V. V.; GASHNIKOVA, N. M. HIV-1 genetic diversity in Russia: CRF63_02A1, a new HIV type 1 genetic variant spreading in Siberia. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 30, n. 6, p. 592-7, Jun 2014.

BELL, C. M.; CONNELL, B. J.; CAPOVILLA, A.; VENTER, W. D.; STEVENS, W. S. et al. Molecular characterization of the HIV type 1 subtype C accessory genes vif, vpr, and vpu. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 23, n. 2, p. 322-30, Feb 2007.

BELLO, G.; AFONSO, J. M.; MORGADO, M. G. Phylodynamics of HIV-1 subtype F1 in Angola, Brazil and Romania. **Infect Genet Evol**, v. 12, n. 5, p. 1079-86, Jul 2012.

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**, v. 2011, p. 154945, 2011.

BELLO, G.; PASSAES, C. P.; GUIMARAES, M. L.; LORETE, R. S.; MATOS ALMEIDA, S. E. et al. Origin and evolutionary history of HIV-1 subtype C in Brazil. **Aids**, v. 22, n. 15, p. 1993-2000, Oct 1 2008.

BENNETT, D. E.; CAMACHO, R. J.; OTELEA, D.; KURITZKES, D. R.; FLEURY, H. et al. Drug resistance mutations for surveillance of transmitted HIV-1 drug-resistance: 2009 update. **PLoS One**, v. 4, n. 3, p. e4724, Mar 6 2009.

BERGER, E. A.; MURPHY, P. M.; FARBER, J. M. Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. **Annu Rev Immunol**, v. 17, p. 657-700, 1999.

BERGER, E. A.; DOMS, R. W.; FENYO, E. M.; KORBER, B. T.; LITTMAN, D. R. et al. A new classification for HIV-1. **Nature**, v. 391, n. 6664, p. 240, Jan 15 1998.

BILLINGS, E.; SANDERS-BUELL, E.; BOSE, M.; KIJAK, G. H.; BRADFIELD, A. et al. HIV-1 Genetic Diversity Among Incident Infections in Mbeya, Tanzania. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 33, n. 4, p. 373-381, Apr 2017.

BRASIL. Nota Normativa Nº 007/2017, de 7 de fevereiro de 2017. **Retifica a Nota Informativa Nº096, de 2016/DDAHV/SVS/MS, que atualiza os esquemas antiretrovirais para pessoas vivendo com HIV/aids (PVHA) e indicações de uso ampliado de dolutegravir (DTG) e darunavir (DRV) a partir de 2017.** Ministério da Saúde, Brasília, DF, 7 fev. 2017. Disponível em: http://www.aids.gov.br/sites/default/files/anexos/legislacao/2017/59412/nota_informativa_007_protocolo_de_uso_arv_2017_29907.pdf. Acesso em: 26.06.2017.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de DST e Aids. **Boletim Epidemiológico HIV/AIDS**. Brasília. Ano VI - nº 01 27ª a 53ª semanas epidemiológicas - julho a dezembro de 2015, 01ª a 26ª semanas epidemiológicas - janeiro a junho de 2016, 2016.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. **Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para manejo da infecção pelo HIV em adultos**. Brasília: Ministério da Saúde, 2015. 227p.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. **Manual técnico para o diagnóstico da infecção pelo HIV**. Ministério da Saúde. Brasília: Ministério da Saúde, 2013a. 56p.

BRIGGS, J. A.; KRAUSSLICH, H. G. The molecular architecture of HIV. **J Mol Biol**, v. 410, n. 4, p. 491-500, Jul 22 2011.

BRIGIDO, L.F. On the origin of South America HIV-1 C epidemic. **AIDS**. v.23, n. 4, p. 543-4, Feb 2009.

CARDOSO, L. P.; da SILVEIRA, A. A.; FRANCISCO, R. B.; DA GUARDA REIS, M. N.; STEFANI, M. M. Molecular characteristics of HIV type 1 infection among prisoners from Central Western Brazil. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 27, n. 12, p. 1349-53, Dec 2011.

CARDOSO, L. P.; PEREIRA, G. A.; VIEGAS, A. A.; SCHMALTZ, L. E.; STEFANI, M. M. HIV-1 primary and secondary antiretroviral drug resistance and genetic diversity among pregnant women from central Brazil. **J Med Virol**, v. 82, n. 3, p. 351-7, Mar 2010.

CARDOSO, L. P.; QUEIROZ, B. B.; STEFANI, M. M. HIV-1 pol phylogenetic diversity and antiretroviral resistance mutations in treatment naive patients from Central West Brazil. **J Clin Virol**, v. 46, n. 2, p. 134-9, Oct 2009.

CARDOSO, L. P.; STEFANI, M. M. High level of multidrug resistance mutations in HIV type 1 pol gene and resistance-associated mutations to enfuvirtide (T-20) among antiretroviral-experienced patients from central Brazil. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 25, n. 10, p. 943-50, Oct 2009.

CARR, J. K.; AVILA, M.; GOMEZ CARRILLO, M.; SALOMON, H.; HIERHOLZER, J. et al. Diverse BF recombinants have spread widely since the introduction of HIV-1 into South America. **Aids**, v. 15, n. 15, p. F41-7, Oct 19 2001a.

CARR, J. K.; TORIMIRO, J. N.; WOLFE, N. D.; EITEL, M. N.; KIM, B. et al. The AG recombinant IbNG and novel strains of group M HIV-1 are common in Cameroon. **Virology**, v. 286, n. 1, p. 168-81, Jul 20 2001b.

CARR, J. K.; SALMINEN, M. O.; ALBERT, J.; SANDERS-BUELL, E.; GOTTE, D. et al. Full genome sequences of human immunodeficiency virus type 1 subtypes G and A/G intersubtype recombinants. **Virology**, v. 247, n. 1, p. 22-31, Jul 20 1998.

CARR, J. K.; SALMINEN, M. O.; KOCH, C.; GOTTE, D.; ARTENSTEIN, A. W. et al. Full-length sequence and mosaic structure of a human immunodeficiency virus type 1 isolate from Thailand. **J Virol**, v. 70, n. 9, p. 5935-43, Sep 1996.

CARRION, G.; EYZAGUIRRE, L.; MONTANO, S.M.; LAGUNA-TORRES, V.; SERRA, M. et al. Documentation of subtype C HIV Type 1 strains in Argentina, Paraguay, and Uruguay. **AIDS Res Hum Retroviruses**. v.20, n. 9, p. 1022-5, Sep 2004.

CARVALHO, B. C.; CARDOSO, L. P.; DAMASCENO, S.; STEFANI, M. M. 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**, v. 27, n. 10, p. 1081-7, Oct 2011.

CASADO, G.; THOMSON, M. M.; SIERRA, M.; NAJERA, R. Identification of a novel HIV-1 circulating ADG intersubtype recombinant form (CRF19_cpx) in Cuba. **J Acquir Immune Defic Syndr**, v. 40, n. 5, p. 532-7, Dec 15 2005.

CASTLEY, A. S.; GAUDIERI, S.; JAMES, I.; GIZZARELLI, L. S.; GUELF, G. et al. Longitudinal Trends in Western Australian HIV-1 Sequence Diversity and Viral Transmission Networks and Their Influence on Clinical Parameters: 2000-2014. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 32, n. 3, p. 211-9, Mar 2016.

CAVALCANTI, A. M.; BRITO, A. M.; SALUSTIANO, D. M.; LIMA, K. O.; SILVA, S. P. et al. Primary resistance of HIV to antiretrovirals among individuals recently diagnosed at voluntary counseling and testing centres in the metropolitan region of Recife, Pernambuco. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.107, n.4, p. 450-7, Jun 2012.

CHEN, X.; YE, M.; DUO, L.; PANG W.; SMITH, D. et al. First description of two new HIV-1 recombinant forms CRF82_cpx and CRF83_cpx among drug users in Northern Myanmar. **Virulence**, v. 30, p.1-7, Aug 2016.

CHEONG, H. T.; CHOW, W. Z.; TAKEBE, Y.; CHOOK, J. B.; CHAN, K. G. et al. Genetic Characterization of a Novel HIV-1 Circulating Recombinant Form (CRF74_01B) Identified among Intravenous Drug Users in Malaysia: Recombination History and Phylogenetic Linkage with Previously Defined Recombinant Lineages. **PLoS One**, v. 10, n. 7, p. e0133883, 2015.

CHOW, W. Z.; TAKEBE, Y.; SYAFINA, N. E.; PRAKASA, M. S.; CHAN, K. G. et al. A newly emerging HIV-1 recombinant lineage (CRF58_01B) disseminating among people who inject drugs in Malaysia. **PLoS One**, v. 9, n. 1, p. e85250, 2014.

CHOW, W. Z.; AL-DARRAJI, H.; LEE, Y. M.; TAKEBE, Y.; KAMARULZAMAN, A. et al. Genome sequences of a novel HIV-1 CRF53_01B identified in Malaysia. **J Virol**, v. 86, n. 20, p. 11398-9, Oct 2012.

CLUTTER, D. S.; JORDAN, M. R.; BERTAGNOLIO, S.; SHAFER, R. W. HIV-1 drug resistance and resistance testing. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 46, p. 292-307, 2016.

CONNOR, R. I.; SHERIDAN, K. E.; CERADINI, D.; CHOE, S.; LANDAU, N. R. Change in coreceptor use correlates with disease progression in HIV-1--infected individuals. **J Exp Med**, v. 185, n. 4, p. 621-8, Feb 17 1997.

CORADO, A. L.; BELLO, G.; LEÃO, R. A.; GRANJA, F.; NAVECA, F. G. HIV-1 genetic diversity and antiretroviral drug resistance among individuals from Roraima state, northern Brazil. **PLoS One**, v.12, n.3, e0173894, Mar 16 2017.

COSTA, Z. B.; MACHADO, G. C.; AVELINO, M. M.; GOMES FILHO, C.; MACEDO FILHO, J. V. et al. Prevalence and risk factors for Hepatitis C and HIV-1 infections among pregnant women in Central Brazil. **BMC Infect Dis**, v. 9, p. 116, 2009.

CUNHA, L. K. H.; KASHIMA, S.; AMARANTE, M. F. C.; HADDAD, R., RODRIGUES, E. S. et al. Distribution of human immunodeficiency virus type 1 subtypes in the State of Amazonas, Brazil, and subtype C identification. **Braz J Med Biol Res**, v. 45, n. 2, p. 104-112, Fev 2012.

D'ARC, M.; AYOUBA, A.; ESTEBAN, A.; LEARN, G.H.; BOUÉ, V., et al. Origin of the **HIV-1** group O epidemic in western lowland gorillas. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v.112, n. 11, p. E1343-52, Mar 2015.

da COSTA, C.M., COSTA de OLIVEIRA, C.M., CHEHUAN de MELO, Y.F., DELATORRE, E., BELLO G. et al. High HIV-1 Genetic Diversity in Patients from Northern Brazil. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 32, n. 9, p. 918-22, Sep 2016.

da SILVEIRA, A. A.; CARDOSO, L. P.; FRANCISCO, R. B.; STEFANI, M. M. A. HIV type 1 molecular epidemiology in pol and gp41 genes among naive patients from Mato Grosso do Sul State, central western Brazil. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 28, n. 3, p. 304-7, Mar 2012.

De CLERCQ, E. Antiretroviral drugs. **Curr Opin Pharmacol**, v. 10, n. 5, p. 507-515, 2010

de MORAES SOARES, C. M.; VERGARA, T. R.; BRITES, C.; BRITO, J. D.; GRINBERG, G. et al. Prevalence of transmitted HIV-1 antiretroviral resistance among patients initiating antiretroviral therapy in Brazil: a surveillance study using dried blood spots. **J Int AIDS Soc.**, v. 22, n.17, p. eCollection 2014, Sep 2014.

de OLIVEIRA, T.; PILLAY, D.; GIFFORD, R. J.; UK Collaborative Group on HIV Drug Resistance. The HIV-1 subtype C epidemic in South America is linked to the United Kingdom. **PLoS One**. v. 5, n 2, p. e9311, Feb 19 2010.

De SA FILHO, D. J.; SUCUPIRA, M. C.; CASEIRO, M. M.; SABINO, E. C.; DIAZ, R. S. et al. Identification of two HIV type 1 circulating recombinant forms in Brazil. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 22, n. 1, p. 1-13, Jan 2006.

De SA FILHO, D. J.; SANABANI, S.; DIAZ, R.S.; MUNERATO, P.; BRUNESTEIN, A. 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, n. 2, p. 145-51, Feb 2005.

DE SILVA, T. I.; TURNER, R.; HUE, S.; TRIKHA, R.; VAN TIENEN, C. et al. HIV-1 subtype distribution in the Gambia and the significant presence of CRF49_cpx, a novel circulating recombinant form. **Retrovirology**, v. 7, p. 82, Oct 09 2010.

DELATORRE, E.; COUTO-FERNANDEZ, J. C.; BELLO, G. HIV-1 Genetic Diversity in Northeastern Brazil: High Prevalence of Non-B Subtypes. **AIDS Res Hum Retroviruses**, Apr 25 2017. [Epub ahead of print]

DELATORRE, E.; de AZEVEDO, S. S. D.; RODRIGUES-PEDRO, A.; VELASCO-DE-CASTRO, C.A.; COUTO-FERNANDEZ, J. C. et al. Tracing the origin of a singular HIV-1 CRF45_cpx clade identified in Brazil. **Infect Genet Evol**, v. 46, p. 223-232, May 2016.

DELATORRE, E.; COUTO-FERNANDEZ, J. C.; GUIMARAES, M. L.; VAZ CARDOSO, L. P.; DE ALCANTARA, K. C. et al. Tracing the origin and northward dissemination dynamics of HIV-1 subtype C in Brazil. **PLoS One**, v. 8, n. 9, p. e74072, 2013.

DELGADO, E.; THOMSON, M. M.; VILLAHERMOSA, M. L.; SIERRA, M.; OCAMPO, A. et al. Identification of a newly characterized HIV-1 BG intersubtype circulating recombinant form in Galicia, Spain, which exhibits a pseudotype-like virion structure. **J Acquir Immune Defic Syndr**, v. 29, n. 5, p. 536-43, Apr 15 2002.

DELVIKS-FRANKENBERRY, K.; GALLI, A.; NIKOLAITCHIK, O.; MENS, H.; PATHAK, V. K. et al. Mechanisms and factors that influence high frequency retroviral recombination. **Viruses**, v. 3, n. 9, p. 1650-80, Sep 2011.

DIAZ, R.S.; LEAL, E.; SANABANI, S.; SUCUPIRA, M.C.; TANURI, A. et al. Selective regimes and evolutionary rates of HIV-1 subtype B V3 variants in the Brazilian epidemic. **Virology** v. 381, p. 184–193, 2008.

DIVINO, F.; de LIMA GUERRA CORADO, A.; GOMES NAVECA, F.; STEFANI, M. M.; BELLO, G. High Prevalence and Onward Transmission of Non-Pandemic HIV-1 Clades in Northern and Brazilian Regions. **PLoS One**, v. 11, n. 9, p. e0162112, Sep 7 2016.

DILERNIA, D. A.; JONES, L. R.; PANDO, M. A.; RABINOVICH, R. D.; DAMILANO, G. D. 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**, v. 27, n. 5, p. 569-78, May 2011.

Dos ANJOS SILVA, L., DIVINO, F., da SILVA REGO, M. O., LIMA LOPES, I.G., NOBREGA COSTA, C.M. et al. HIV-1 Genetic Diversity and Transmitted Drug Resistance in Antiretroviral Treatment-Naïve Individuals from Amapá State, Northern Brazil. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v.32, n.4, p. 373-6, Apr 2016.

EBERLE, J.; GURTNER, L. HIV types, groups, subtypes and recombinant forms: errors in replication, selection pressure and quasispecies. **Intervirology**, v. 55, n. 2, p. 79-83, 2012.

ENGELMAN, A.; CHEREPANOV, P. The structural biology of HIV-1: mechanistic and therapeutic insights. **Nat Rev Microbiol**, v. 10, n. 4, p. 279-90, Mar 16 2012.

FARIA, N. R.; RAMBAUT, A.; SUCHARD, M. A.; BAELE, G.; BEDFORD, T. et al. The early spread and epidemic ignition of HIV-1 in human populations. **Science**, v. 346, n. 6205, p. 56-61, Oct 3 2014.

FARIA, N. R.; RAMBAUT, A.; SUCHARD, M. A.; BAELE, G.; BEDFORD, T. et al. HIV epidemiology. The early spread and epidemic ignition of HIV-1 in human populations. **Science**, v. 346, n. 6205, p. 56-61, Oct 3 2014.

FENG, Y.; WEI, H.; HSI, J.; XING, H.; HE, X. et al. Identification of a novel HIV Type 1 circulating recombinant form (CRF65_cpx) composed of CRF01_AE and subtypes B and C in Western Yunnan, China. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 30, n. 6, p. 598-602, Jun 2014.

FERGUSON, M.R.; ROJO, D.R.; VON LINDERN, J.J.; O'BRIEN, W.A. HIV-1 replication cycle. **Clin Lab Med**, v.22, n.3, p.611-635, 2002.

FERNANDEZ-GARCIA, A.; DELGADO, E.; CUEVAS, M. T.; VEGA, Y.; MONTERO, V. et al. Identification of an HIV-1 BG Intersubtype Recombinant Form (CRF73_BG), Partially Related to CRF14_BG, Which Is Circulating in Portugal and Spain. **PLoS One**, v. 11, n. 2, p. e0148549, 2016.

FERNANDEZ-GARCIA, A.; PEREZ-ALVAREZ, L.; CUEVAS, M. T.; DELGADO, E.; MUNOZ-NIETO, M. et al. Identification of a new HIV type 1 circulating BF intersubtype recombinant form (CRF47_BF) in Spain. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 26, n. 7, p. 827-32, Jul 2010.

FERREIRA, A. S.; CARDOSO, L. P.; STEFANI, M. M. Moderate prevalence of transmitted drug resistance and high HIV-1 genetic diversity in patients from Mato Grosso State, Central Western Brazil. **J Med Virol**, v. 83, n. 8, p. 1301-7, Aug 2011.

FONTELLA, R.; SOARES, M.A.; SCHRAGO, C.G. The origin of South American HIV-1 subtype C: lack of evidence for a Mozambican ancestry. **AIDS**, v. 23, n. 14, p. 1926-8, Sep 2009.

FONTELLA, R.; SOARES, M. A.; SCHRAGO, C. G. On the origin of HIV-1 subtype C in South America. **Aids**, v. 22, n. 15, p. 2001-11, Oct 1 2008.

FOSTER, G. M.; AMBROSE, J. C.; HUE, S.; DELPECH, V. C.; FEARNHILL, E. et al. Novel HIV-1 recombinants spreading across multiple risk groups in the United Kingdom: the identification and phylogeography of Circulating Recombinant Form (CRF) 50_A1D. **PLoS One**, v. 9, n. 1, p. e83337, 2014.

FRANKEL, A. D.; YOUNG, J. A. HIV-1: fifteen proteins and an RNA. **Annu Rev Biochem**, v. 67, p. 1-25, 1998.

GALLI, A.; KEARNEY, M.; NIKOLAITCHIK, O. A.; YU, S.; CHIN, M. P. et al. Patterns of Human Immunodeficiency Virus type 1 recombination ex vivo provide evidence for coadaptation of distant sites, resulting in purifying selection for intersubtype recombinants during replication. **J Virol**, v. 84, n. 15, p. 7651-61, Aug 2010.

GAO, F.; BAILES, E.; ROBERTSON, D. L.; CHEN, Y.; RODENBURG, C. M. et al. Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes troglodytes*. **Nature**, v. 397, n. 6718, p. 436-41, Feb 4 1999.

GAO, F.; ROBERTSON, D. L.; CARRUTHERS, C. D.; MORRISON, S. G.; JIAN, B. et al. A comprehensive panel of near-full-length clones and reference sequences for non-subtype B isolates of human immunodeficiency virus type 1. **J Virol**, v. 72, n. 7, p. 5680-98, Jul 1998.

GAO, F.; YUE, L.; CRAIG, S.; THORNTON, C. L.; ROBERTSON, D. L. et al. Genetic Variation of HIV Type 1 in Four World Health Organization-Sponsored Vaccine Evaluation Sites: Generation of Functional Envelope (Glycoprotein 160) Clones Representative of Sequence Subtypes A, B, C, and E. **Aids Research and Human Retroviruses**, v. 10, n. 11, p. 1359-68, 1994.

GILBERT, M. T.; RAMBAUT, A.; WLASIUK, G.; SPIRA, T. J.; PITCHENIK, A. E. et al. The emergence of HIV/AIDS in the Americas and beyond. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 104, n. 47, p. 18566-70, Nov 20 2007.

GOTO, T.; NAKAI, M.; IKUTA, K. The life-cycle of human immunodeficiency virus type 1. **Micron**, v. 29, n. 2-3, p. 123-38, Apr-Jun 1998.

GRÄF, T.; MACHADO FRITSCH, H.; de MEDEIROS, R. M.; MALETICH JUNQUEIRA, D.; ESTEVES de MATOS ALMEIDA, S. et al. Comprehensive Characterization of HIV-1 Molecular Epidemiology and Demographic History in the Brazilian Region Most Heavily Affected by AIDS. **J Virol.**, v.90, n. 18, p. 8160-8201, Aug 26 2016.

GRAF, T.; VRANCKEN, B.; MALETICH JUNQUEIRA, D.; DE MEDEIROS, R. M.; SUCHARD, M. A. et al. Contribution of Epidemiological Predictors in Unraveling the Phylogeographic History of HIV-1 Subtype C in Brazil. **J Virol**, v. 89, n. 24, p. 12341-8, Dec 2015.

GRAF, T.; PINTO, A. R. The increasing prevalence of HIV-1 subtype C in Southern Brazil and its dispersion through the continent. **Virology**, v. 435, n. 1, p. 170-8, Jan 5 2013.

GRINBERG, G.; GIRON, L. B.; KNOLL, R. K.; GALINSKAS, J.; CAMARGO, M. et al. High prevalence and incidence of HIV-1 in a counseling and testing center in the city of Itajaí, Brazil. **Braz J Infect Dis**, v.19, n.6, p. 631-5, Dec 2015.

GUIMARAES, M. L.; MARQUES, B. C.; BERTONI, N.; TEIXEIRA, S. L.; MORGADO, M. G. et al. Assessing the HIV-1 Epidemic in Brazilian Drug Users: A Molecular Epidemiology Approach. **PLoS One**, v. 10, n. 11, p. e0141372, Nov 4 2015.

GUIMARAES, M. L.; VICENTE, A. C.; OTSUKI, K.; DA SILVA, R. F.; FRANCISCO, M. et al. Close phylogenetic relationship between Angolan and Romanian HIV-1 subtype F1 isolates. **Retrovirology**, v. 6, p. 39, Apr 22 2009.

GUIMARAES, M. L.; EYER-SILVA, W. A.; COUTO-FERNANDEZ, J. C.; MORGADO, M. G. Identification of two new CRF_BF in Rio de Janeiro State, Brazil. **Aids**, v. 22, n. 3, p. 433-5, Jan 30 2008.

GUIMARAES, M. L.; DOS SANTOS MOREIRA, A.; LOUREIRO, R.; GALVAO-CASTRO, B.; MORGADO, M. G. High frequency of recombinant genomes in HIV type 1 samples from Brazilian southeastern and southern regions. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 18, n. 17, p. 1261-9, Nov 20 2002.

HAHN, B. H.; SHAW, G. M.; DE COCK, K. M.; SHARP, P. M. AIDS as a zoonosis: scientific and public health implications. **Science**, v. 287, n. 5453, p. 607-14, Jan 28 2000.

HAN, X.; AN, M.; ZHANG, W.; CAI, W.; CHEN, X. et al. Genome Sequences of a Novel HIV-1 Circulating Recombinant Form, CRF55_01B, Identified in China. **Genome Announc**, v. 1, n. 1, Jan 2013a.

HAN, X.; AN, M.; ZHANG, W.; ZHAO, B.; CHU, Z. et al. Genome Sequences of a Novel HIV-1 Circulating Recombinant Form (CRF59_01B) Identified among

Men Who Have Sex with Men in Northeastern China. **Genome Announc**, v. 1, n. 3, Jun 27 2013b.

HEMELAAR, J. The origin and diversity of the HIV-1 pandemic. **Trends Mol Med**, v. 18, n. 3, p.:182-192, 2012.

HEMELAAR, J.; GOUWS, E.; GHYS, P. D.; OSMANOV, S. Global trends in molecular epidemiology of HIV-1 during 2000-2007. **Aids**, v. 25, n. 5, p. 679-89, Mar 13 2011.

HSI, J.; WEI, H.; XING, H.; FENG, Y.; HE, X. et al. Genome sequence of a novel HIV-1 circulating recombinant form (CRF64_BC) identified from Yunnan, China. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 30, n. 4, p. 389-93, Apr 2014.

HU, J.; SEEGER, C. Hsp90 is required for the activity of a hepatitis B virus reverse transcriptase. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 93, n. 3, p. 1060-4, Feb 6 1996.

HU, S. L.; TRAVIS, B. M.; GARRIGUES, J.; ZARLING, J. M.; SRIDHAR, P. et al. Processing, assembly, and immunogenicity of human immunodeficiency virus core antigens expressed by recombinant vaccinia virus. **Virology**, v. 179, n. 1, p. 321-9, Nov 1990.

HU, Y.; WAN, Z.; ZHOU, Y. H.; SMITH, D.; ZHENG, Y. T. et al. Identification of Two New HIV-1 Circulation Recombinant Forms (CRF87_cpx and CRF88_BC) from Reported Unique Recombinant Forms in Asia. **AIDS RES. HUM. Retroviruses**, v. 33, n. 4, p. 353-358, Apr 2017.

JONASSEN, T. O.; STENE-JOHANSEN, K.; BERG, E. S.; HUNGNES, O.; LINDBOE, C. F. et al. Sequence analysis of HIV-1 group O from Norwegian patients infected in the 1960s. **Virology**, v. 231, n. 1, p. 43-7, Apr 28 1997.

JUNQUEIRA, D. M.; ALMEIDA, S. E. HIV-1 subtype B: Traces of a pandemic. **Virology**, v. 495, p. 173-84, Aug 2016.

JUNQUEIRA, D. M.; DE MEDEIROS, R. M.; MATTE, M. C.; ARAUJO, L. A.; CHIES, J. A. et al. Reviewing the history of HIV-1: spread of subtype B in the Americas. **PLoS One**, v. 6, n. 11, p. e27489, 2011.

KIJAK, G. H.; SANDERS-BUELL, E.; WOLFE, N. D.; MPOUDI-NGOLE, E.; KIM, B. et al. Development and application of a high-throughput HIV type 1 genotyping assay to identify CRF02_AG in West/West Central Africa. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 20, n. 5, p. 521-30, May 2004.

KIM, G. J.; YUN, M. R.; KOO, M. J.; SHIN, B.G.; LEE, J. S. et al. Estimating the origin and evolution characteristics for Korean HIV type 1 subtype B using Bayesian phylogenetic analysis. **AIDS Res. Hum. Retrovir.** v. 28, p.880–884, 2012.

KONINGS, F. A.; BURDA, S. T.; URBANSKI, M. M.; ZHONG, P.; NADAS, A. et al. Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) circulating recombinant form 02_AG (CRF02_AG) has a higher in vitro replicative capacity than its parental subtypes A and G. **J Med Virol**, v. 78, n. 5, p. 523-34, May 2006.

KOULINSKA, I. N.; NDUNG'U, T.; MWAKAGILE, D.; MSAMANGA, G.; KAGOMA, C. et al. A new human immunodeficiency virus type 1 circulating recombinant form from Tanzania. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 17, n. 5, p. 423-31, Mar 20 2001.

LAI, A.; CICCOCCHI, M.; FRANZETTI, M.; SIMONETTI, F. R.; BOZZI, G. et al. Local and global spatio-temporal dynamics of HIV-1 subtype F1. **J Med Virol**, v. 86, n. 2, p. 186-92, Feb 2014.

LAU, K. A.; WONG, J. J. Current Trends of HIV Recombination Worldwide. **Infect Dis Rep**, v. 5, n. Suppl 1, p. e4, Jun 6 2013.

LAUKKANEN, T.; CARR, J. K.; JANSSENS, W.; LIITSOLA, K.; GOTTE, D. et al. Virtually full-length subtype F and F/D recombinant HIV-1 from Africa and South America. **Virology**, v. 269, n. 1, p. 95-104, Mar 30 2000.

LEOZ, M.; FEYERTAG, F.; CHARPENTIER, C.; DELAUGERRE, C.; WIRDEN, M. et al. Characterization of CRF56_cpx, a new circulating B/CRF02/G recombinant form identified in MSM in France. **Aids**, v. 27, n. 14, p. 2309-12, Sep 10 2013.

LI, G.; THEYS, K.; VERHEYEN, J.; PINEDA-PENA, A. C.; KHOURI, R. et al. A new ensemble coevolution system for detecting HIV-1 protein coevolution. **Biol Direct**, v. 10, p. 1, Jan 07 2015.

LI, L.; CHEN, L.; YANG, S.; LI, T.; LI, J. et al. Recombination form and epidemiology of HIV-1 unique recombinant strains identified in Yunnan, China. **PLoS One**, v. 7, n. 10, p. e46777, 2012.

LI, X.; NING, C.; HE, X.; YANG, Y.; LI, F. et al. Genome Sequences of a Novel HIV-1 Circulating Recombinant Form (CRF61_BC) Identified among Heterosexuals in China. **Genome Announc**, v. 1, n. 3, Jun 27 2013.

LI, Y.; MIAO, J.; MIAO, Z.; SONG, Y.; WEN, M. et al. Identification of a Novel HIV Type 1 Circulation Recombination Form (CRF86_BC) Among Heterosexuals in Yunnan, China. **AIDS RES. HUM. Retroviruses**, v. 33, n. 3, p. 279-283, Mar 2017.

LI, Y.; TEE, K. K.; LIAO, H.; HASE, S.; UENISHI, R. et al. Identification of a novel second-generation circulating recombinant form (CRF48_01B) in Malaysia: a descendant of the previously identified CRF33_01B. **J Acquir Immune Defic Syndr**, v. 54, n. 2, p. 129-36, Jun 2010.

LIBRELOTTO, C. S.; GRÄF, T.; SIMON, D.; de ALMEIDA, S. E.; LUNGE, V. R. HIV-1 epidemiology and circulating subtypes in the countryside of South Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 48, n. 3, p.249-57, May-Jun 2015.

LIITSOLA, K.; TASHKINOVA, I.; LAUKKANEN, T.; KOROVINA, G.; SMOLSKAJA, T. et al. HIV-1 genetic subtype A/B recombinant strain causing an explosive epidemic in injecting drug users in Kaliningrad. **Aids**, v. 12, n. 14, p. 1907-19, Oct 1 1998.

LIMA, K.; de SOUZA LEAL, É.; CAVALCANTI, A. M.; SALUSTIANO, D. M.; de MEDEIROS, L. B. et al. Correction: Epidemiological, Clinical and Antiretroviral Susceptibility Characterization of Human Immunodeficiency Virus Subtypes B and Non-B in Pernambuco, Northeast Brazil. **PLoS One**, v. 11, n.6, p. e0158192. Jun 2016a.

LIMA, Y. A.; CARDOSO, L. P.; REIS, M. N.; STEFANI, M. M. Incident and long-term HIV-1 infection among pregnant women in Brazil: Transmitted drug resistance and mother-to-child transmission. **J Med Virol**, v. 88, n. 11, p. 1936-43, Nov 2016b.

LIU, Y.; LI, L.; BAO, Z.; LI, H.; ZHUANG, D. et al. Identification of a novel HIV type 1 circulating recombinant form (CRF52_01B) in Southeast Asia. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 28, n. 10, p. 1357-61, Oct 2012.

LOPES, C. A.; SOARES, M. A.; FALCI, D. R.; SPRINZ, E. The Evolving Genotypic Profile of HIV-1 Mutations Related to Antiretroviral Treatment in the North Region of Brazil. **Biomed Res Int.**, v. 2015, 6 pages; Oct 12 2015.

LOS ALAMOS HIV DATABASE. The Circulating Recombinant Forms (CRFs). 2016. Disponível em: < <http://www.hiv.lanl.gov> >. Acesso em: 07.03.2017.

LU, X.; LIU, L.; ZHANG, X.; LAU, T. C.; TSUI, S. K. et al. F18, a novel small-molecule nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor, inhibits HIV-1 replication using distinct binding motifs as demonstrated by resistance selection and docking analysis. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 56, n. 1, p. 341-51, Jan 2011.

MACHADO, L.F.; COSTA, I.B.; FOLHA, M.N.; da LUZ, A.L.; VALLINOTO, A.C. et al. Lower genetic variability of HIV-1 and antiretroviral drug resistance in pregnant women from the state of Pará, Brazil. **BMC Infect Dis.**, v. 17, n.1, p.270-8, Apr 12 2017.

MACHADO, L. Y.; DUBED, M.; DIAZ, H.; RUIZ, N.; ROMAY, D. et al. Transmitted HIV type 1 drug resistance in newly diagnosed Cuban patients. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 29, n. 2, p. 411-4, Feb 2013.

MAILLER, E.; BERNACCHI, S.; MARQUET, R.; PAILLART, J.C.; VIVET-BOUDOU, V.; SMYTH, R.P. The Life-Cycle of the HIV-1 Gag-RNA Complex. **Viruses**. v. 10 n.;8, p.9. Sep 2016.

MAMADOU, S.; VIDAL, N.; MONTAVON, C.; BEN, A.; DJIBO, A. et al. Emergence of complex and diverse CRF02_AG/CRF06_cpx recombinant HIV type 1 strains in Niger, West Africa. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 19, n. 1, p. 77-82, Jan 1 2003.

MANSKY, L. M. The mutation rate of human immunodeficiency virus type 1 is influenced by the vpr gene. **Virology**, v.222, n. 2, p. 391-400, Aug 15 1996.

MCCUTCHAN, F. E. Understanding the genetic diversity of HIV-1. **Aids**, v. 14 Suppl 3, p. S31-44, 2000.

MEHTA, S. R.; WERTHEIM, J. O.; DELPORT, W.; ENE, L.; TARDEI, G. et al. Using phylogeography to characterize the origins of the HIV-1 subtype F epidemic in Romania. **Infect Genet Evol.**, v. 11, n. 5, p.975-9, Jul 2011.

MEDEIROS, R. M.; JUNQUEIRA, D. M.; MATTE, M. C.; BARCELLOS, N. T.; CHIES, J. A. et al. Co-circulation HIV-1 subtypes B, C, and CRF31_BC in a drug-naïve population from Southernmost Brazil: analysis of primary resistance mutations. **J. Med. Virol.**, v. 83, p. 1682–1688, 2011.

MELO, F. L.; JAMAL, L. F.; ZANOTTO, P. M. Characterization of primary isolates of HIV type 1 CRF28_BF, CRF29_BF, and unique BF recombinants

circulating in Sao Paulo, Brazil. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 28, n. 9, p. 1082-8, Sep 2012.

MELONI, S. T.; KIM, B.; SANKALE, J. L.; HAMEL, D. J.; TOVANABUTRA, S. et al. Distinct human immunodeficiency virus type 1 subtype A virus circulating in West Africa: sub-subtype A3. **J Virol**, v. 78, n. 22, p. 12438-45, Nov 2004.

MIR, D.; CABELLO, M.; ROMERO, H.; BELLO, G. Phylodynamics of major HIV-1 subtype B pandemic clades circulating in Latin America. **Aids**, v. 29, n. 14, p. 1863-9, Sep 10 2015.

MONTAVON, C.; VERGNE, L.; BOURGEOIS, A.; MPOUDI-NGOLE, E.; MALONGA-MOUELLET, G. et al. Identification of a new circulating recombinant form of HIV type 1, CRF11-cpx, involving subtypes A, G, J, and CRF01-AE, in Central Africa. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 18, n. 3, p. 231-6, Feb 10 2002.

MONTEIRO, J. P.; FERRARO, G. A.; OLIVEIRA, T.; GOLDANI, L. Z.; KASHIMA, S. et al. Genetic and biologic characterization of HIV type 1 subtype C isolates from south Brazil. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 23, n. 1, p. 135-43, Jan 2007.

MONTEIRO-CUNHA, J. P.; ARAUJO, A. F.; SANTOS, E.; GALVAO-CASTRO, B. et al. Lack of High-Level Resistance Mutations in HIV Type 1 BF Recombinant Strains Circulating in Northeast Brazil. **AIDS RES. HUM. Retroviruses**, v. 27, n. 6, p. 625-631, Jun 2011.

MOORE, P. L.; GRAY, E. S.; MORRIS, L. Specificity of the autologous neutralizing antibody response. **Curr Opin HIV AIDS**, v. 4, n. 5, p. 358-63, Sep 2009.

MORGADO, M. G.; SABINO, E. C.; SHPAER, E. G.; BONGERTZ, V.; BRIGIDO, L. et al. V3 region polymorphisms 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**, v. 10, n. 5, p. 569-76, May 1994.

MOURA, M. E.; DA GUARDA REIS, M. N.; LIMA, Y. A.; EULALIO, K. D.; CARDOSO, L. P. et al. HIV-1 transmitted drug resistance and genetic diversity among patients from Piauí State, Northeast Brazil. **J Med Virol**, v. 87, n. 5, p. 798-806, May 2015a.

MOURA, M. E.; REIS, M. N.; LIMA, Y. A.; EULALIO, K. D.; CARDOSO, L. P. et al. Low rate of transmitted drug resistance may indicate low access to antiretroviral treatment in Maranhão State, northeast Brazil. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 31, n. 2, p. 250-4, Feb 2015b.

MURILLO, W.; VERAS, N.; PROSPERI, M.; DE RIVERA, I. L.; PAZ-BAILEY, G. et al. A single early introduction of HIV-1 subtype B into Central America accounts for most current cases. **J Virol**, v. 87, n. 13, p. 7463-70, Jul 2013.

NADAI, Y.; EYZAGUIRRE, L. M.; SILL, A.; CLEGHORN, F.; NOLTE, C. et al. HIV-1 epidemic in the Caribbean is dominated by subtype B. **PLoS One**, v. 4, n. 3, p. e4814, 2009.

NAJERA, R.; DELGADO, E.; PEREZ-ALVAREZ, L.; THOMSON, M. M. Genetic recombination and its role in the development of the HIV-1 pandemic. **Aids**, v. 16 Suppl 4, p. S3-16, 2002.

NG, K. T.; ONG, L. Y.; TAKEBE, Y.; KAMARULZAMAN, A.; TEE, K. K. Genome sequence of a novel HIV-1 circulating recombinant form 54_01B from Malaysia. **J Virol**, v. 86, n. 20, p. 11405-6, Oct 2012a.

NG, O. T.; EYZAGUIRRE, L. M.; CARR, J. K.; CHEW, K. K.; LIN, L. et al. Identification of new CRF51_01B in Singapore using full genome analysis of three HIV type 1 isolates. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 28, n. 5, p. 527-30, May 2012b.

NIAMA, F. R.; VIDAL, N.; BAZEPEO, S. E.; MPOUDI, E.; TOURE-KANE, C. et al. CRF45_AKU, a circulating recombinant from Central Africa, is probably the common ancestor of HIV type 1 MAL and HIV type 1 NOGIL. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 25, n. 12, p. 1345-53, Dec 2009.

OELRICHS, R. B.; WORKMAN, C.; LAUKKANEN, T.; MCCUTCHAN, F. E.; DEACON, N. J. A novel subtype A/G/J recombinant full-length HIV type 1 genome from Burkina Faso. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 14, n. 16, p. 1495-500, Nov 1 1998.

OGAWA, S.; HACHIYA, A.; HOSAKA, M.; MATSUDA, M.; ODE, H. et al. A Novel Drug-Resistant HIV-1 Circulating Recombinant Form CRF76_01B Identified by Near Full-Length Genome Analysis. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 32, n. 3, p. 284-9, Mar 2016.

PAGAN, I.; HOLGUIN, A. Reconstructing the timing and dispersion routes of HIV-1 subtype B epidemics in the Caribbean and Central America: a phylogenetic story. **PLoS One**, v. 8, n. 7, p. e69218, 2013.

PARASKEVIS, D.; PYBUS, O.; MAGIORKINIS, G.; HATZAKIS, A.; WENSING, A. M. et al. Tracing the HIV-1 subtype B mobility in Europe: a phylogeographic approach. **Retrovirology**, v. 6, p. 49, May 20 2009.

PARASKEVIS, D.; MAGIORKINIS, M.; VANDAMME, A. M.; KOSTRIKIS, L. G.; HATZAKIS, A. Re-analysis of human immunodeficiency virus type 1 isolates from Cyprus and Greece, initially designated 'subtype I', reveals a unique complex A/G/H/K/? mosaic pattern. **J Gen Virol**, v. 82, n. Pt 3, p. 575-80, Mar 2001.

PASSAES, C. P.; GUIMARAES, M. L.; BELLO, G.; MORGADO, M. G. Near full-length genome characterization of HIV type 1 unique BC recombinant forms from Southern Brazil. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 25, n. 12, p. 1339-44, Dec 2009.

PATHAK, V. K.; TEMIN, H. M. Broad spectrum of in vivo forward mutations, hypermutations, and mutational hotspots in a retroviral shuttle vector after a single replication cycle: substitutions, frameshifts, and hypermutations. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 87, n. 16, p. 6019-23, Aug 1990.

PAU, A.K.; GEORGE, J.M. Antiretroviral therapy: current drugs. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 28, n. 3, p. 371-402, 2014.

PEETERS, M.; D'ARC, M.; DELAPORTE, E. Origin and diversity of human retroviruses. **AIDS Rev**, v. 16, n. 1, p. 23-34, Jan-Mar 2014.

PEREIRA, G. A.; STEFANI, M. M.; MARTELLI, C. M.; TURCHI, M. D.; SIQUEIRA, E. M. et al. Human immunodeficiency virus type 1 and hepatitis C virus co-infection and viral subtypes at an HIV testing center in Brazil. **J Med Virol**, v. 78, n. 6, p. 719-23, Jun 2006.

PEREZ-ALVAREZ, L.; DELGADO, E.; VILLAHERMOSA, M. L.; CUEVAS, M. T.; GARCIA, V. et al. Biological characteristics of newly described HIV-1 BG recombinants in Spanish individuals. **Aids**, v. 16, n. 4, p. 669-72, Mar 8 2002.

PEREZ, L.; THOMSON, M. M.; BLEDA, M. J.; ARAGONES, C.; GONZALEZ, Z. et al. HIV Type 1 molecular epidemiology in cuba: high genetic diversity, frequent mosaicism, and recent expansion of BG intersubtype recombinant forms. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 22, n. 8, p. 724-33, Aug 2006.

PESSOA, R.; LOUREIRO, P.; ESTHER LOPES, M.; CARNEIRO-PROIETTI, A. B.; SABINO, E. C. ET AL. Ultra-Deep Sequencing of HIV-1 near Full-Length and Partial Proviral Genomes Reveals High Genetic Diversity among Brazilian Blood Donors. **PLoS One**, v. 11, n. 3, p. e0152499, Mar 31 2016.

PESSOA, R.; WATANABE, J. T.; CALABRIA, P.; ALENCAR, C. S.; LOUREIRO, P. 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**, v. 55, n. 5, p. 980-90, May 2015.

PESSOA, R.; CARNEIRO PROIETTI, A. B.; BUSCH, M. P.; SANABANI, S. S. Identification of a Novel HIV-1 Circulating Recombinant Form (CRF72_BF1) in Deep Sequencing Data from Blood Donors in Southeastern Brazil. **Genome Announc**, v. 2, n. 3, Jun 12 2014a.

PESSOA, R.; WATANABE, J. T.; CALABRIA, P.; FELIX, A. C.; LOUREIRO, P. 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**, v. 9, n. 11, p. e112674, 2014b.

PETERS, P. E. HIV infections in sub-Saharan Africa. **Int J STD AIDS**, v. 14, n. 3, p. 223, Mar 2003.

PILOTTO, J. H.; GRINSZTEJN, B.; VELOSO, V. G.; VELASQUE, L. S.; FRIEDMAN, R. K. et al. Moderate prevalence of transmitted drug resistance mutations among antiretroviral-naïve HIV-infected pregnant women in Rio de Janeiro, Brazil. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 29, n. 4, p. 681-6, Apr 2013.

PIMENTEL, V. F.; MORGADO, M. G.; BELLO, G.; GUIMARÃES, M. D.; CASTILHO, E. A. Temporal trends and molecular epidemiology of HIV type 1 infection in Rio de Janeiro, Brazil. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 29, n. 12, p. 1553-61, Dec 2013.

PLANTIER, J. C.; LEOZ, M.; DICKERSON, J. E.; DE OLIVEIRA, F.; CORDONNIER, F. et al. A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. **Nat Med**, v. 15, n. 8, p. 871-2, Aug 2009.

POWELL, R. L.; ZHAO, J.; KONINGS, F. A.; TANG, S.; EWANE, L. et al. Circulating recombinant form (CRF) 37_cpx: an old strain in Cameroon composed of diverse, genetically distant lineages of subtypes A and G. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 23, n. 7, p. 923-33, Jul 2007a.

POWELL, R. L.; ZHAO, J.; KONINGS, F. A.; TANG, S.; NANFACK, A. et al. Identification of a novel circulating recombinant form (CRF) 36_cpx in

Cameroon that combines two CRFs (01_AE and 02_AG) with ancestral lineages of subtypes A and G. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 23, n. 8, p. 1008-19, Aug 2007b.

PRELLWITZ, I. M.; ALVES, B. M.; IKEDA, M. L.; KUHLELS, D.; PICON, P. D. et al. HIV behind bars: human immunodeficiency virus cluster analysis and drug resistance in a reference correctional unit from southern Brazil. **PLoS One**, v. 8, n. 7, p. e69033, Jul 2013.

QUINONES-MATEU, M. E.; ALBRIGHT, J. L.; TORRE, V.; REINIS, M.; VANDASOVA, J. et al. Molecular epidemiology of HIV type 1 isolates from the Czech Republic: identification of an env E subtype case. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 15, n. 1, p. 85-9, Jan 1 1999.

REIS, M. N.; DE ALCANTARA, K. C.; CARDOSO, L. P.; STEFANI, M. M. Polymorphisms in the HIV-1 gp41 env gene, natural resistance to enfuvirtide (T-20) and pol resistance among pregnant Brazilian women. **J Med Virol**, v. 86, n. 1, p. 8-17, Jan 2014.

RHEE, S.Y.; BLANCO, J.L.; JORDAN, M.R.; TAYLOR, J.; LEMEY, P. et al. Correction: Geographic and Temporal Trends in the Molecular Epidemiology and Genetic Mechanisms of Transmitted HIV-1 Drug Resistance: An Individual-Patient- and Sequence-Level Meta-Analysis. **PLoS Med.**, v.12, n. 6, p. e1001845, Jun 2015.

RIOS, M.; DELGADO, E.; PEREZ-ALVAREZ, L.; FERNANDEZ, J.; GALVEZ, P. et al. Antiretroviral drug resistance and phylogenetic diversity of HIV-1 in Chile. **J Med Virol**, v. 79, n. 6, p. 647-56, Jun 2007.

RISTIC, M.; ZUKUROV, J.; ALKIMIM, W.; DIAZ, R. S.; JANINI, L. M. 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**, v.6, n. 3, p. e17485, Mar 1 2011.

ROBERTSON, D. L.; ANDERSON, J. P.; BRADAC, J. A.; CARR, J. K.; FOLEY, B. et al. HIV-1 nomenclature proposal. **Science**, v. 288, n. 5463, p. 55-6, Apr 7 2000.

ROBERTSON, D.L.; HAHN, B.H.; SHARP, P.M. Recombination in AIDS viruses. **J Mol Evol**, v.40, n.3, p. 249-59, 1995.

ROBINSON, H.L.; New hope for an AIDS vaccine. **Nat Rev Immunol**. V.2, n.4, p. 239-50, Apr 2002. Review.

RUCHANSKY, D.; CASADO, C.; RUSSI, J. C.; ARBIZA, J. R.; LOPEZ-GALINDEZ, C. Identification of a new HIV Type 1 circulating recombinant form (CRF38_BF1) in Uruguay. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 25, n. 3, p. 351-6, Mar 2009.

SABINO, E.C., SHPAER, E. G.; MORGADO, M. G.; KORBER, B. T.; DIAZ, R. S. 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**, v.68, n.10, p. 6340-6, 1994.

SAKURAGI, J. Morphogenesis of the Infectious HIV-1 Virion. **Front Microbiol**, v. 2, p. 242, 2011.

SANABANI, S. S.; PESSOA, R.; SOARES de OLIVEIRA, A. C.; MARTINEZ, V. P.; GIRET, M. T. et al. Variability of HIV-1 genomes among children and adolescents from São Paulo, Brazil. **PLoS One**, v.8, n.5, p. e62552, 2013.

SANABANI, S. S.; PASTENA, E. R.; DA COSTA, A. C.; MARTINEZ, V. P.; KLEINE-NETO, W. et al. Characterization of partial and near full-length genomes of HIV-1 strains sampled from recently infected individuals in Sao Paulo, Brazil. **PLoS One**, v. 6, n. 10, p. e25869, 2011.

SANABANI, S. S.; PASTENA, E. R.; NETO, W. K.; MARTINEZ, V. P.; SABINO, E. C. Characterization and frequency of a newly identified HIV-1 BF1

intersubtype circulating recombinant form in Sao Paulo, Brazil. **Viol J**, v. 7, p. 74, Apr 16 2010.

SANABANI, S.; KLEINE NETO, W.; KALMAR, E. M.; DIAZ, R. S.; JANINI, L. M. et al. Analysis of the near full length genomes of HIV-1 subtypes B, F and BF recombinant from a cohort of 14 patients in Sao Paulo, Brazil. **Infect Genet Evol**, v. 6, n. 5, p. 368-77, Sep 2006a.

SANABANI, S.; NETO, W. K.; DE SA FILHO, D. J.; DIAZ, R. S.; MUNERATO, P. et al. Full-length genome analysis of human immunodeficiency virus type 1 subtype C in Brazil. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 22, n. 2, p. 171-6, Feb 2006b.

SANDERS-BUELL, E.; SAAD, M. D.; ABED, A. M.; BOSE, M.; TODD, C. S. et al. A nascent HIV type 1 epidemic among injecting drug users in Kabul, Afghanistan is dominated by complex AD recombinant strain, CRF35_AD. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 23, n. 6, p. 834-9, Jun 2007.

SANTOS, A. F.; SOARES, M. A. HIV Genetic Diversity and Drug Resistance. **Viruses**, v. 2, n. 2, p. 503-31, Feb 2010.

SANTOS, A. F.; SCHRAGO, C. G.; MARTINEZ, A. M.; MENDONZA-SASSI, R.; SILVEIRA, J. 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.; SOUSA, T. M.; SOARES, E. A.; SANABANI, S.; MARTINEZ, A. M. et al. Characterization of a new circulating recombinant form comprising HIV-1 subtypes C and B in southern Brazil. **Aids**, v. 20, n. 16, p. 2011-9, Oct 24 2006.

SANTOS, L. A.; MONTEIRO-CUNHA, J. P.; ARAUJO, A. F.; BRITES, C.; GALVAO-CASTRO, B. et al. Detection of Distinct Human Immunodeficiency Virus Type 1 Circulating Recombinant Forms in Northeast Brazil. **Journal of Medical Virology**, v. 83, p. 2066-2072, 2011.

SARAFIANOS, S. G.; MARCHAND, B.; DAS, K.; HIMMEL, D. M.; PARNIAK, M. A. et al. Structure and function of HIV-1 reverse transcriptase: molecular mechanisms of polymerization and inhibition. **J Mol Biol**, v. 385, n. 3, p. 693-713, Jan 23 2009.

SEELAMGARI, A.; MADDUKURI, A.; BERRO, R.; DE LA FUENTE, C.; KEHN, K. et al. Role of viral regulatory and accessory proteins in HIV-1 replication. **Front Biosci**, v. 9, p. 2388-413, Sep 01 2004.

SHARP, P. M.; HAHN, B. H. Origins of HIV and the AIDS pandemic. **Cold Spring Harb Perspect Med**, v. 1, n. 1, p. a006841, Sep 2011.

SHATTOCK, R. J.; ROSENBERG, Z. Microbicides: topical prevention against HIV. **Cold Spring Harb Perspect Med**, v. 2, n. 2, p. a007385, Feb 2012.

SHIINO, T.; HATTORI, J.; YOKOMAKU, Y.; IWATANI, Y.; SUGIURA, W. Phylodynamic analysis reveals CRF01_AE dissemination between Japan and neighboring Asian countries and the role of intravenous drug use in transmission. **PLoS One**, v. 9, n. 7, p. e102633, 2014.

SILVEIRA, J.; SANTOS, A. F.; MARTINEZ, A. M.; GÓES, L. R.; MENDONZA-SASSI, R. et al. Heterosexual transmission of human immunodeficiency virus type 1 subtype C in southern Brazil. **J Clin Virol**, v.54, n.1, p. 36-41, May 2012.

SIMONETTI, F. R.; LAI, A.; MONNO, L.; BINDA, F.; BRINDICCI, G. et al. Identification of a new HIV-1 BC circulating recombinant form (CRF60_BC) in Italian young men having sex with men. **Infect Genet Evol**, v. 23, p. 176-81, Apr 2014.

SKAR, H.; AXELSSON, M.; BERGGREN, I.; THALME, A.; GYLLENSTEN, K. et al. Dynamics of two separate but linked HIV-1 CRF01_AE outbreaks among injection drug users in Stockholm, Sweden, and Helsinki, Finland. **J Virol**, v. 85, n. 1, p. 510-8, Jan 2011.

SONG, Y.; FENG, Y.; MIAO, Z.; WANG, B.; YANG, M. et al. Near-Full-Length Genome Sequences of a Novel HIV-1 Circulating Recombinant Form, CRF01_AE/B'/C (CRF78_cpx), in Yunnan, China. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 32, n. 6, p. 601-6, Jun 2016.

SPIRA, S.; WAINBERG, M. A.; LOEMBA, H.; TURNER, D.; BRENNER, B. G. Impact of clade diversity on HIV-1 virulence, antiretroviral drug sensitivity and drug resistance. **J Antimicrob Chemother**, v. 51, n. 2, p. 229-40, Feb 2003.

STEFANI, M. M.; PEREIRA, G. A.; LINS, J. A.; ALCANTARA, K. C.; SILVEIRA, A. A. et al. Molecular screening shows extensive HIV-1 genetic diversity in Central West Brazil. **J Clin Virol**, v. 39, n. 3, p. 205-9, Jul 2007.

STEFANI, M. M.; PEREIRA, G. A.; MARTELLI, C. M.; SHINDO, N.; GALVAO-CASTRO, B. Evidence of HIV-1 genetic diversity among pregnant women with AIDS or infected with HIV-1 in Central Brazil. **J Acquir Immune Defic Syndr**, v. 23, n. 2, p. 205-7, Feb 1 2000.

SU, L.; WEI, D.; YANG, H.; ZENG, Y.; HU, Y. et al. Identification of a Novel HIV-1 Circulating Recombinant Form (CRF85_BC) in Sichuan, China. **AIDS RES. HUM. Retroviruses**, v. 32, n. 9, p. 895-9, Sep 2016.

SU, L.; GRAF, M.; ZHANG, Y.; VON BRIESEN, H.; XING, H. et al. Characterization of a virtually full-length human immunodeficiency virus type 1 genome of a prevalent intersubtype (C/B') recombinant strain in China. **J Virol**, v. 74, n. 23, p. 11367-76, Dec 2000.

SWANSON, C. M.; MALIM, M. H. SnapShot: HIV-1 proteins. **Cell**, v. 133, n. 4, p. 742, 742 e1, May 16 2008.

TAKEHISA, J.; ZEKENG, L.; IDO, E.; YAMAGUCHI-KABATA, Y.; MBOUDJEKA, I. et al. Human immunodeficiency virus type 1 intergroup (M/O) recombination in cameroon. **J Virol**, v. 73, n. 8, p. 6810-20, Aug 1999.

TAYLOR, B. S.; SOBIESZCZYK, M. E.; MCCUTCHAN, F. E.; HAMMER, S. M. The challenge of HIV-1 subtype diversity. **N Engl J Med**, v. 358, n. 15, p. 1590-602, Apr 10 2008.

TEE, K. K.; LI, X. J.; NOHTOMI, K.; NG, K. P.; KAMARULZAMAN, A. et al. Identification of a novel circulating recombinant form (CRF33_01B) disseminating widely among various risk populations in Kuala Lumpur, Malaysia. **J Acquir Immune Defic Syndr**, v. 43, n. 5, p. 523-9, Dec 15 2006.

THOMPSON, M.A.; ABERG, J.A.; HOY, J.F.; TELENTI, A.; BENSON, C. Et al. Antiretroviral treatment of adult HIV infection: 2012 recommendations of the International Antiviral Society-USA panel. **JAMA**, v.308, n. 4, p. 387-402, Jul 25 2012.

THOMSON, M. M.; CASADO, G.; POSADA, D.; SIERRA, M.; NAJERA, R. Identification of a novel HIV-1 complex circulating recombinant form (CRF18_cpx) of Central African origin in Cuba. **Aids**, v. 19, n. 11, p. 1155-63, Jul 22 2005.

THOMSON, M. M.; SIERRA, M.; TANURI, A.; MAY, S.; CASADO, G. 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**, v. 20, n. 10, p. 1126-33, Oct 2004.

THOMSON, M. M.; PEREZ-ALVAREZ, L.; NAJERA, R. Molecular epidemiology of HIV-1 genetic forms and its significance for vaccine development and therapy. **Lancet Infect Dis**, v. 2, n. 8, p. 461-71, Aug 2002.

TOVANABUTRA, S.; KIJAK, G. H.; BEYRER, C.; GAMMON-RICHARDSON, C.; SAKKHACHORNPHOP, S. et al. Identification of CRF34_01B, a second circulating recombinant form unrelated to and more complex than CRF15_01B, among injecting drug users in northern Thailand. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 23, n. 6, p. 829-33, Jun 2007.

TOVANABUTRA, S.; WATANAVEERADEJ, V.; VIPUTTIKUL, K.; DE SOUZA, M.; RAZAK, M. H. et al. A new circulating recombinant form, CRF15_01B, reinforces the linkage between IDU and heterosexual epidemics in Thailand. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 19, n. 7, p. 561-7, Jul 2003.

TUPINAMBÁS, U.; DUANI, H.; MARTINS, A. V.; ALEIXO, A. W.; GRECO, D. B. Transmitted human immunodeficiency vírus-1 drug resistance in a cohort of men who have sex with men in Belo Horizonte, Brazil-1996-2012. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 4, p.470-475, 2013.

TURK, G.; CAROBENE, M.; MONCZOR, A.; RUBIO, A. E.; GOMEZ-CARRILO, M. et al. Higher transactivation activity associated with LTR and Tat elements from HIV-1 BF intersubtype recombinant variants. **Retrovirology**, v.3, p.14, Feb 16 2006.

TURNER, B. G.; SUMMERS, M. F. Structural biology of HIV. **J Mol Biol**, v. 285, n. 1, p. 1-32, Jan 8 1999.

UNAIDS. Global AIDS Update. **UNAIDS**, 2016, 16p

VALLARI, A.; HOLZMAYER, V.; HARRIS, B.; YAMAGUCHI, J.; NGANSOP, C. et al. Confirmation of putative HIV-1 group P in Cameroon. **J Virol**, v. 85, n. 3, p. 1403-7, Feb 2011.

VELASCO-de-CASTRO, C.A.; GRINSZTEJN, B.; VELOSO, V.G.; BASTOS, F.I.; PILOTTO, J. H. 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**, v. 9, n. 1, p. e876222014, Jan 30 2014.

VERAS, N. M.; GRAY, R. R.; BRIGIDO, L. F.; RODRIGUES, R.; SALEMI, M. High-resolution phylogenetics and phylogeography of human immunodeficiency virus type 1 subtype C epidemic in South America. **J Gen Virol**, v. 92, n. Pt 7, p. 1698-709, Jul 2011.

VIDAL, N.; BAZEPEO, S. E.; MULANGA, C.; DELAPORTE, E.; PEETERS, M. Genetic characterization of eight full-length HIV type 1 genomes from the Democratic Republic of Congo (DRC) reveal a new subsubtype, A5, in the A radiation that predominates in the recombinant structure of CRF26_A5U. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 25, n. 8, p. 823-32, Aug 2009.

VIDAL, N.; FRANGE, P.; CHAIX, M. L.; MULANGA, C.; LEPIRA, F. et al. Characterization of an old complex circulating recombinant form, CRF27_cpx, originating from the Democratic Republic of Congo (DRC) and circulating in France. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 24, n. 2, p. 315-21, Feb 2008.

VIDAL, N.; MULANGA, C.; BAZEPEO, S. E.; LEPIRA, F.; DELAPORTE, E. et al. Identification and molecular characterization of subsubtype A4 in central Africa. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 22, n. 2, p. 182-7, Feb 2006.

VISAWAPOKA, U.; TOVANABUTRA, S.; CURRIER, J. R.; COX, J. H.; MASON, C. J. et al. Circulating and unique recombinant forms of HIV type 1 containing subsubtype A2. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 22, n. 7, p. 695-702, Jul 2006.

WEI, H.; HIS, J.; FENG, Y.; XING, H.; HE, X. et al. Identification of a novel HIV-1 circulating recombinant form (CRF62_BC) in western Yunnan of China. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 30, n. 4, p. 380-3, Apr 2014.

WENSING, A. M.; CALVEZ, V.; GÜNTARD, H. F.; JOHNSON, V. A.; PAREDES, R. et al. 2017 Update of the Drug Resistance Mutations in HIV-1. **Top Antivir Med**, v. 24, n.4, p. 132-133, Dec/Jan 2017.

WHO. HIV/AIDS. Data and statistics. 2016. Disponível em: < <http://www.who.int/hiv/data/en/> >. Acesso em: 14/11/2016.

WILBE, K.; CASPER, C.; ALBERT, J.; LEITNER, T. Identification of two CRF11-cpx genomes and two preliminary representatives of a new circulating

recombinant form (CRF13-cpx) of HIV type 1 in Cameroon. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 18, n. 12, p. 849-56, Aug 10 2002.

WILEN, C. B.; TILTON, J. C.; DOMS, R. W. HIV: cell binding and entry. **Cold Spring Harb Perspect Med**. v. 2, n. 8, p. a006866, Aug 1 2012.

WILKINSON, E.; ENGELBRECHT, S.; DE OLIVEIRA, T. History and origin of the HIV-1 subtype C epidemic in South Africa and the greater southern African region. **Sci Rep**. v. 17, n. 5, p. 16897, Nov 2015.

WU, J.; MENG, Z.; XU, J.; LEI, Y.; JIN, L. et al. New emerging recombinant HIV-1 strains and close transmission linkage of HIV-1 strains in the Chinese MSM population indicate a new epidemic risk. **PLoS One**, v. 8, n. 1, p. e54322, 2013.

XIN, K. Q.; MA, X. H.; CRANDALL, K. A.; BUKAWA, H.; ISHIGATSUBO, Y. et al. Dual infection with HIV-1 Thai subtype B and E. **Lancet**, v. 346, n. 8986, p. 1372-3, Nov 18 1995.

XU, L.; POZNIAK, A.; WILDFIRE, A.; STANFIELD-OAKLEY, S. A.; MOSIER, S. M. et al. Emergence and evolution of enfuvirtide resistance following long-term therapy involves heptad repeat 2 mutations within gp41. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 49, n. 3, p. 1113-9, Mar 2005.

YAMAGUCHI, J.; BADREDDINE, S.; SWANSON, P.; BODELLE, P.; DEVARE, S. G. et al. Identification of new CRF43_02G and CRF25_cpx in Saudi Arabia based on full genome sequence analysis of six HIV type 1 isolates. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 24, n. 10, p. 1327-35, Oct 2008.

YE, J.; LU, H.; SU, X.; XIN, R.; BAI, L.; XU, K. et al. Phylogenetic and temporal dynamics of human immunodeficiency virus type 1 B in China: four types of B strains circulate in China. **AIDS Res. Hum. Retrovir**, v. 30, p. 920–926, 2014.

9. ANEXOS

Anexos 1 – Pareceres do Comitê de Ética- HDT



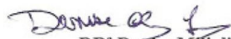
PARECER CONSUBSTANCIADO

Protocolo nº: 003/2008
Projeto de Pesquisa: Profilaxia da Transmissão Vertical em Gestantes Adolescentes Infectadas pelo HIV-1 do Centro-Oeste: Perfis Imunológico e Viral e Genotipagem para Resistência aos Anti-Retrovirais.
Pesquisador Responsável: Prof. Dr. Mariane Martins de Araújo Stefani
Instituição Responsável: Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública.
CEP de Origem: Comitê de Ética em Pesquisa do HDT.
Área Temática: Grupo III
Instituição onde será realizada a Pesquisa: Hospital HDT.

PARECER FINAL:

O projeto é pertinente e mediante a adequação do mesmo as normas exigidas por este Comitê e Resolução nº 196/96-CONEP, manifestamos favorável pela aprovação do referido projeto.

Goiânia, 04 de março de 2008.


DRª Denise Milioli

Presidente do Comitê de Ética e Pesquisa do HDT



SECRETARIA DA SAÚDE
DO ESTADO DE GOIÁS



**GOVERNO DO
ESTADO DE GOIÁS**
Desenvolvimento com Responsabilidade

Hospital de Doenças Tropicais Dr. Anuar Auad - HDT

PARECER CONSUBSTANCIADO

PROTOCOLO Nº 003/2011

PROJETO DE PESQUISA: "ABORDAGEM MOLECULAR E IMUNOLÓGICA EM GESTANTES INFECTADAS PELO HIV-1: GENOTIPAGEM PARA RESISTÊNCIA APÓS INTERRUPTÃO DA PROFILAXIA PARA TRANSMISSÃO VERTICAL E INFLUÊNCIA DA GESTAÇÃO NA FREQUÊNCIA DE CÉLULAS T REGULADORAS".

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: MARIANE MARTINS ARAÚJO STEFANI

PESQUISADORES PARTICIPANTES: YANNA ANDRESSA RAMOS DE LIMA, LUDIMILA PAULA VAZ CARDOSO, BOAVENTURA BRAZ DE QUEIROZ, LUIZA EMYLCE SCHMALTZ, ANA LUCIA MINUZZI.

INSTITUIÇÃO RESPONSÁVEL: IPTESPO/UFG/GO

CEP DE ORIGEM: COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA DO HOSPITAL DE DOENÇAS TROPICAIS.

PARECER FINAL: Projeto de pesquisa apresenta relevância científica e encontra-se dentro dos preceitos éticos legais segundo a Resolução 196/96 da CONEP/MS. Portanto, o CEP/HDT manifesta-se por **APROVAR** o projeto de pesquisa nos termos em que está proposto.

Obs.: Será necessário a entrega de um relatório semestral (até a conclusão da pesquisa) sobre seu andamento. Caso isso não ocorra o fato será encaminhado à CONEP para ela adote as providências cabíveis.

Goiânia, 04 de Abril de 2011.


Dr. Raimundo Nonato Leite Pinto
Presidente do Comitê de ética e Pesquisa do HDT

Missão: Oferecer Assistência especializada na área de doenças infecciosas, dentro do contexto público visando a reintegração do paciente e promover o conhecimento científico.

Visão: Ser um serviço de excelência em infectologia, uma das referências mencionadas no tratamento de saúde de doenças infecciosas, pautando-se pela alta reatividade diagnóstica e terapêutica.

Hospital Dr. Anuar Auad
Av. Contorno n.º 3556 Jardim Bela Vista – Goiânia-GO – Fone/Fax: (62) 3201-3675

Anexos 2 - Pareceres do Comitê de Ética- HC



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E DO DESPORTO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
HOSPITAL DAS CLÍNICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA MÉDICA HUMANA E ANIMAL

PROTOCOLO CEPMHA/HC/UFG Nº 073/05

Goiânia, 18/10/2005

INVESTIGADOR (A) RESPONSÁVEL (IES): Profª. Mariane Martins de Araújo Stefani

TÍTULO: "Estudo de resistência genética a antiretrovirais e mapeamento genético molecular do HIV – 1 no centro oeste e norte do Brasil."

Área Temática: Grupo III

Local de Realização: Inst. Patologia Tropical e Saúde Pública/UFG

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa Médica Humana e Animal, após a análise das respostas adequadas às solicitações deste CEPMHA/HC/UFG, aprovou sem restrições o projeto de Pesquisa acima referido, e o mesmo foi considerado em acordo com os princípios éticos vigentes.

→ Não há necessidade de aguardar o parecer da CONEP- Comissão Nacional de Ética em Pesquisa para iniciar a pesquisa.

→ O pesquisador responsável deverá encaminhar ao CEPMHA/HC/UFG, relatórios trimestrais do andamento da pesquisa, encerramento, conclusão(ões) e publicação(ões).

Prof. Joffre Rezende Filho
Coordenador do CEPMHA/HC/UFG

PROTOCOLO CEP/HC/UFG Nº 163/2010

Goiânia, 24/11/2010

INVESTIGADOR RESPONSÁVEL: Farmª Mariane Martins de Araújo Stefani
PESQUISADORAS PARTICIPANTES: Yanna Andressa Ramos de Lima; Ludmila Paula Vaz Cardoso; Ana Lucia Minuzzi.

TÍTULO: "Abordagem molecular e imunológica em gestantes infectadas pelo HIV-1: Genotipagem para resistência após interrupção da profilaxia para transmissão vertical e influência da gestação na frequência de células T Reguladoras."

Área Temática: Grupo III

Local de realização: Instituto de Patologia Tropical e saúde pública.

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa analisou e aprova o projeto de pesquisa acima referido, juntamente com os documentos apresentados e o mesmo foi considerado em acordo com os princípios éticos vigentes.

Informamos que não há necessidade de aguardar o parecer da CONEP- Comissão Nacional de Ética em Pesquisa para iniciar a pesquisa.

O pesquisador responsável deverá encaminhar ao CEP/HC/UFG, relatórios semestrais do andamento da pesquisa, encerramento, conclusão(ões) e publicação(ões).

O CEP/HC/UFG pode, a qualquer momento, fazer escolha aleatória de estudo em desenvolvimento para avaliação e verificação do cumprimento das normas da Resolução 196/96 (Manual Operacional Para Comitês de Ética em Pesquisa – item 13)



Farm. José Mário Coelho Moraes
Coordenador do CEP/HC/UFG

**Anexo 3- Aprovação do Projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital
Universitário Júlio Muller - Universidade Federal de Mato Grosso**

Ministério da Educação
FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO JÚLIO MÜLLER

Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Júlio Müller
Registrado na Comissão Nacional de Ética em Pesquisa em 25/08/97

**TERMO DE APROVAÇÃO ÉTICA
DE PROJETO DE PESQUISA**

REFERÊNCIA: Projeto de protocolo Nº 435/CEP-HUJM/07

"COM PENDÊNCIAS" ☐

APROVADO "ad referendum" ☐

APROVAÇÃO FINAL ☒

NÃO APROVADO ☐

O projeto de pesquisa intitulado: "Estudo de resistência genética a antiretrovirais e mapeamento genético molecular do HIV-1 no Centro Oeste e Norte do Brasil," encaminhado pelo (a) pesquisador (a), **Aparecida Duarte Hg Mussi** foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HUJM, em reunião realizada dia 12/12/07 que concluiu pela aprovação final, tendo em vista que atende a Resolução CNS.196/96 do Ministério da Saúde para pesquisa envolvendo seres humanos.

Cuiabá, 12 de Dezembro de 2007.


Profa. Dra. Maria Aparecida Munhoz Galva
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa do HUJM

Hospital Universitário Júlio Müller
Rua L, SN, Jardim Alvorada, CEP 78048-790 Cuiabá - MT, Brasil
Fone: 65-3615-7254 e-mail: cep@ujm@ccpd.ufmt.br
http://www.ufmt.br/cep_hujm

Anexo 4 - Parecer do Comitê de Ética- MA e PI



GOVERNO DO ESTADO DO PIAUÍ
UNIVERSIDADE ESTADUAL DO PIAUÍ – UESPI
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
Rua Cláudio Biliac, 2335 Centro - Fone: (86)3221-8658
CEP 64001-280 Teresina-PI

ANÁLISE DE PROJETO DE PESQUISA

Registro do projeto: CEP-UESPI 022/2011

Título: **"MUTAÇÕES ASSOCIADAS À RESISTÊNCIA PRIMÁRIA E SECUNDÁRIA A ANTIRETROVIRAIS E DIVERSIDADE GENÉTICA DO HIV-1 EM PACIENTES DOS ESTADOS DO MARANHÃO E PIAUÍ"**.

Pesquisador responsável: **MARIANE MARTINS DE ARAÚJO STEFANI**

Documentos analisados: **Termos do Consentimento e Projeto de Pesquisa**

Data de entrada: **12 de abril de 2011**

Proposição do(a) Relator(a):

☒ **Aprovação**

☐ **Aprovação com pendências**

☐ **Não aprovação**

Data da primeira análise pelo CEP-UESPI: **25.05.2011**

Data do parecer final do projeto pelo CEP-UESPI: **07.06.2011**

PARECER

Com base na Resolução CNS/MS nº 196/96, que regulamenta a matéria, o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual do Piauí, em Reunião 06/2011 realizada em 07.06.2011, decidiu **APROVAR**, de acordo com o parecer do(a) relator(a), o projeto de pesquisa acima especificado, quanto aos seus aspectos éticos.

Teresina, 08 de junho de 2011

Prof. Mauro Roberto Biá da Silva

Coordenador do CEP-UESPI

Anexo 5 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

nº _____

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA, IMUNOLOGIA, PARASITOLOGIA E PATOLOGIA
Rua 235 s/n Setor Universitário CEP 74605050
Laboratório de Imunologia da Aids e da Hanseníase - Laboratórios nº 326, 327 e 335.
Telefones: (62) 32096111 32096106



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado para participar como voluntário em uma investigação sobre infecção pelo HIV/AIDS. Você será informado sobre todas as etapas da investigação. Caso você aceite participar da investigação, assine ao final deste documento. Caso não queira participar, você não sofrerá nenhum tipo de prejuízo no seu tratamento, assistência, cuidado ou acompanhamento.

1.1 Informações sobre a Pesquisa

Título do Projeto: ESTUDO DE RESISTÊNCIA GENÉTICA A ANTIRETROVIRAIS E MAPEAMENTO GENÉTICO MOLECULAR DO HIV-1 NO CENTRO-OESTE E NORTE DO BRASIL

Responsável: Dra Mariane Martins de Araújo Stefani – Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública / Universidade Federal de Goiás

1.2 Descrição da Pesquisa

O vírus que causa a aids é chamado de HIV-1. Vários estudos realizados em diferentes países e no Brasil indicam que este vírus é muito variável e apresenta várias formas genéticas diferentes chamadas de subtipos. Além disto o HIV pode mudar seu material genético e ficar resistente a drogas que são normalmente utilizadas no tratamento da infecção. O objetivo deste estudo é identificar o tipo de HIV-1 responsável pela sua infecção e analisar se este vírus apresenta alterações que fazem com que o vírus não seja destruído pelas drogas usadas para combatê-lo.

Procedimento da Pesquisa

Se você concordar em participar desse estudo, nós iremos fazer perguntas sobre fatores que podem levar a maior risco para infecção pelo HIV e coletar uma única amostra de sangue que apresenta um risco mínimo à saúde.

Tudo o que soubermos sobre você através do estudo (resultados de exames, entrevista) será confidencial. A sua identidade jamais será revelada e mesmo na divulgação dos resultados nenhum participante será identificado de nenhuma maneira.

Os resultados sobre o tipo de HIV-1 que causou sua infecção e se este vírus sofreu alteração e pode não responder ao tratamento serão repassados ao laboratório onde você faz seus exames de carga viral e contagem de CD4 ou ao médico responsável pelo seu acompanhamento. Se você tem alguma dúvida relacionada ao estudo neste momento ou durante a investigação, você poderá contactar o Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás, Laboratório de Imunologia da AIDS, Prof Dra Mariane Martins de Araújo telefone 0XX62 3209 6111 que estará disponível para esclarecer suas dúvidas.

1.1.1 Participação

A sua participação é voluntária, você pode recusar e retirar o seu consentimento a qualquer momento, sem nenhum prejuízo na realização dos exames de rotina de acompanhamento ou no tratamento da infecção pelo HIV.

A sua participação voluntária não irá além da coleta de sangue e entrevista, não havendo, portanto, nenhum tipo de risco à sua saúde e integridade física, não cabendo, pois, qualquer tipo de indenização por danos, pois estes não existem.

CRITÉRIOS DE INCLUSÃO - Pacientes HIV positivos/aids, provenientes ou com domicílio no estado onde faz acompanhamento clínico e laboratorial.

CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO - Pacientes HIV positivos/aids que não morem nem sejam provenientes da área de estudo, pacientes HIV positivos/aids que tenham os 2 últimos resultados de Carga Viral indetectável ou resultados de contagens de CD4 inferiores a 200 células/uL pois nestes casos, as chances de recuperação do vírus nas amostras de sangue são reduzidas.

Confidencialidade

Todos os dados da pesquisa serão confidenciais, somente usados pelos pesquisadores para fins científicos. Nenhum nome ou resultado individual será divulgado, permanecendo em sigilo. O paciente terá acesso aos resultados a qualquer tempo.

Consentimento

Eu, _____,
RG/CPF nº. _____ concordo em participar deste estudo. Certifico que fui informado sobre o estudo, estou ciente que minha participação é voluntária, que responderei a um questionário e serei submetido a uma única coleta de sangue. Sei que posso desistir de participar deste estudo em qualquer momento sem ter nenhum tipo de prejuízo no meu tratamento/assistência ou acompanhamento. Concordo, inclusive, com a possível publicação dos resultados dessa pesquisa em forma de resumos e/ou artigos científicos em revistas, pois sei que os pacientes serão identificados por códigos. Informo que aceito participar/ou que o menor de 18 anos sob minha responsabilidade participe da investigação.

Assinatura do participante ou responsável pelo menor

Assinatura do entrevistador

Assinatura do Pesquisador

Data: ____/____/____

Testemunhas não vinculadas as equipe de pesquisadores:

Assistimos a informação sobre o estudo, solicitação do consentimento e o aceite do voluntário em participar

Nome _____ Assinatura _____

Nome _____ Assinatura _____

Anexo 6 : Molecular Characteristics of HIV-1 Infection Among Prisoners from Central Western Brazil (Artigo publicado em 2011).

AIDS RESEARCH AND HUMAN RETROVIRUSES
Volume 27, Number 12, 2011
© Mary Ann Liebert, Inc.
DOI: 10.1089/aid.2011.0153

Molecular Characteristics of HIV Type 1 Infection Among Prisoners from Central Western Brazil

Ludimila Paula Vaz Cardoso,¹ Alexander Augusto da Silveira,¹ Roberta Barbosa Lopes Francisco,² Mônica Nogueira da Guarda Reis,¹ and Mariane Martins de Araújo Stefani¹

Abstract

This study among antiretroviral-experienced prisoners from central western Brazil investigated mutations associated with secondary resistance to nucleoside/nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTI/NNRTI), protease inhibitors (Stanford HIV-1 Resistance/International AIDS Society Databases), and HIV-1 subtypes (REGA/phylogenetic analyses/SimPlot). Twenty-seven prisoners from three prisons (16 males and four females from Mato Grosso do Sul State and seven males from Goiás State) had HIV-1 protease and reverse transcriptase fragments sequenced after nested PCR. Median age was 35 years. Seven males and two females were intravenous drug users, three males referred homosexual practice. Resistance mutations were present in 37% (10/27): NRTI+NNRTI mutations ($n=5$), NRTI mutations ($n=3$), multidrug-resistant mutations ($n=2$). Subtype B (48%), subtype C (11%), B/F1, B/C, and F1/B/C recombinants (40.7%) were detected. Possible intraprisson transmissions were identified: two intravenous drug user females (subtype C); two clusters among homosexual males (subtype B and B/F1). High resistance rate and possible intraprisson transmission highlight the need for improved prevention, counseling, and treatment strategies for prisoners.

CHALLENGES, BARRIERS, AND DIFFICULTIES to study marginalized groups contribute to the scarce information about HIV/AIDS epidemic among minorities, such as prisoners, who are at a greater risk of infection.¹ Risk behaviors in prisons include unprotected sexual activity, parenteral exposure from activities, such as tattooing and piercing, and, in particular, intravenous drug use and its related needle/syringe sharing. These risks favor acquisition/transmission of sexually transmitted diseases (STD) and blood-borne pathogens.^{2,3} Most infected inmates have probably acquired HIV-1 infection through intravenous drug use before incarceration. However, transmission cases within prisons have been well documented.^{4,5} Moreover, the dynamic interchange between the nonincarcerated population and prisoners highlights their importance in the dissemination of HIV-1 and other pathogens to the outside community.

Especially in developing countries, health and patient management inside correctional institutions are generally poor with limited access to prevention, diagnosis, and treatment programs. Among prisoners the adherence to highly active antiretroviral therapy (HAART) based on nonnucleoside/nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTI/NRTI) and protease inhibitors (PI) remains a challenge. High-

risk behaviors and illicit drug consumption are associated with low adherence, which may lead to the selection of mutations associated with resistance. Drug resistance is considered the main reason for the failure of HAART over time.

The molecular epidemiology of HIV-1 in Brazil is characterized by the prevalence of subtype B, except in the south, where subtype C predominates. "Pure" HIV-1 subtypes F1 and subtype C have been sporadically identified in different geographical regions.⁶ A growing number of recombinants including circulating recombinant forms (CRFs) and unique recombinant forms (URFs), involving primarily HIV-1 subtypes B/F1 or B/C, have been reported.⁷⁻⁹

Knowledge about the antiretroviral (ARV) resistance mutations and HIV-1 subtypes among high-risk and hard-to-reach groups, such as prisoners, can lead to adequate prevention and intervention programs. This study among subgroups of treatment-experienced inmates infected with HIV-1 describes the prevalence of secondary resistance to protease (PR) and reverse transcriptase (RT) inhibitors. HIV-1 diversity and phylogenetic links are also reported.

This study included 27 prisoners with HIV-1 infection, prescribed with ARV, recruited between 2008 and 2009 at

¹Tropical Pathology and Public Health Institute, Federal University of Goiás, Goiânia City/Goiás State, Brazil.

²Central Laboratory, LACIN of Campo Grande City/Mato Grosso do Sul State, Brazil.

Increasing Heterosexual Transmission of HIV-1 Subtype C in Inland Central Western Brazil

Keila Correia Alcântara,¹ Monica Nogueira Guarda Reis,¹ Ludimila Paula Vaz Cardoso,¹ Gonzalo Bello,² and Mariane Martins Araújo Stefani^{1*}

¹Tropical Pathology and Public Health Institute/Federal University of Goiás, Goiânia, Go, Brazil

²Laboratório de AIDS & Imunologia Molecular, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

The molecular epidemiology of HIV-1 in Brazil is complex and heterogeneous because several subtypes co-circulate with some important regional differences. This study evaluated HIV-1 subtypes amongst pregnant women living in the metropolitan area and in the interior cities from central western Brazil. From June 2008 to June 2010, 86.9% of confirmed cases of HIV-1 infection amongst pregnant women (172 out of 198 cases) were recruited in Goiânia/Goiás state. The HIV-1 *pol* gene was sequenced after nested-PCR. HIV-1 subtypes were assigned by REGA, phylogenetic, and bootscan analyses. The median age of participants was 26 years (15–41 years range); 58.7% of participants were diagnosed during prenatal care and 51.7% of participants came from >50 interior cities within Goiás state. Amongst the 131 HIV-1 *pol* sequences, 64.9% were subtype B, 13.0% were BF1 recombinant, 11.4% were subtype C, 7.6% were subtype F1, and 2.3% were BC recombinant. According to the HIV-1 diagnosis date (1994–2010), a significant increase in subtype C and a decrease of BF1 mosaics were observed over time. All subtype C patients lived in interior cities where the highest prevalence of subtype C outside southern Brazil was observed (18.4%). Phylogenetic analysis revealed multiple independent introductions of the Brazilian subtype C clade from the southern/southeastern regions of Brazil. The HIV-1 epidemic in women from central western Brazil infected by the heterosexual route is characterized by an unexpectedly high prevalence of subtype C viruses highly related to those circulating in southern/southeastern Brazil. These findings highlight the importance of molecular surveillance programs outside large metropolitan regions in Brazil. *J. Med. Virol.* 85:396–404, 2013. © 2012 Wiley Periodicals, Inc.

KEY WORDS: HIV-1 subtype C; heterosexual transmission; pregnant women; Brazil

INTRODUCTION

The distribution of different HIV-1 variants worldwide is a dynamic process in which the subtypes may have evolved from different founder viruses that have since spread in specific geographic areas. The molecular epidemiology of HIV-1 in Brazil, the largest country in Latin America, is characterized by the co-circulation of several subtypes with important regional differences [Soares et al., 2003; Cardoso et al., 2009; Brígido et al., 2011]. The HIV-1 subtype C that predominates globally and is prevalent in southern Africa, India, Ethiopia, and southern China has entered Brazil by the southern region, where it is prevalent and has been expanding to the neighboring southeastern region [Véras et al., 2011; Bello et al., 2012]. Because of ever increasing levels of human mobility and migration and because of the apparent lower pathogenicity and longer disease-free period with similar transmission capacity, subtype C participation in the HIV-1 epidemic is likely to grow [Abraham et al., 2009]. Subtype B, the predominant variant in the western world, prevails in other Brazilian regions. Subtype F1, which has been reported in central Africa and eastern Europe, also circulates in Brazil and in other South American countries. More recently, several BF1 and BC circulating recombinant forms (CRF) and unique recombinant forms (URF) have been reported mainly in the southern and southeastern

Grant sponsor: UNESCO AIDS/STD National Program, Brazilian Ministry of Health; Grant number: #310-06; Grant sponsor: Ministry of Health/Council for Scientific and Technological Development (MS/MCT/CNPq/SCITE-DECT/CT-Sadde); Grant number: #022/2007; Grant sponsor: FAPESP; Grant number: #200910267000696; Grant sponsor: CNPq; Grant numbers: #141820/2006-3, #304869/2008-2.

The authors declare that there is no conflict of interest involving this manuscript.

*Correspondence to: Mariane Martins Araújo Stefani, Tropical Pathology and Public Health Institute/Federal University of Goiás, Goiânia, Go, Brazil
E-mail: mariane.stefani@pq.cnpq.br

Accepted 23 October 2012

DOI 10.1002/jmv.23474

Published online 21 November 2012 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

Anexo 8 : Polymorphisms in the HIV-1 gp41 env gene, natural resistance to enfuvirtide (T-20) and pol resistance among pregnant Brazilian women
(Artigo publicado em 2014)

Journal of Medical Virology 86:8–17 (2014)

Polymorphisms in the HIV-1 gp41 env Gene, Natural Resistance to Enfuvirtide (T-20) and pol Resistance Among Pregnant Brazilian Women

Mônica Nogueira da Guarda Reis, Keila Correa de Alcântara, Ludimila Paula Vaz Cardoso, and Mariane Martins Araújo Stefani*

Tropical Pathology and Public Health Institute, Federal University of Goiás, Goiânia, Goiás, Brazil

The selective pressure of antiretroviral drugs (ARVs) targeting HIV-1 *pol* can promote drug resistance mutations in other genomic regions, such as *env*. Drug resistance among women should be monitored to avoid horizontal and mother-to-child transmission. To describe natural resistance to T-20 (enfuvirtide), gp41 *env* polymorphisms, mutations in *pol* and HIV-1 subtypes, 124 pregnant women were recruited. For 98 patients, the gp41 *env*, protease (PR) and reverse transcriptase (RT) fragments were sequenced. The patients were ARV naïve ($n=30$), taking mother-to-child transmission prophylaxis ($n=50$), or being treated with highly active ARV therapy/HAART ($n=18$). The Stanford and IAS/USA databases and other sources were used to analyze PR/RT, gp41 *env* resistance mutations. The HIV-1 genetic diversity was analyzed by REGA/phylogenetic analyses. The patients' median age was 25 years (range, 16–42), 18.4% had AIDS. The frequency of natural resistance to T-20 (N42D, L44M, and R46M-low-impact mutations) was 6.1% (6/98); 20.4% (20/98) had compensatory mutations in HR2. The prevalence of transmitted drug resistance in the *pol* was 13.3% (4/30), and the prevalence of secondary drug resistance was 33.3% (6/18). Two patients were infected with multidrug resistant/MDR viruses. The analysis of HIV-1 subtypes (PR/RT/gp41) revealed that 61.2% (60/98) were subtype B, 12.2% (12/98) were subtype C, 4.1% (4/98) were subtype F1, and 22.4% (22/98) were possible recombinants (BF1 = 20.4%; BC = 2%). Natural resistance to T-20 was not associated with *pol* resistance or previous ARV use. The high rate of secondary resistance, including MDR, indicates that the number of women that may need T-20 salvage therapy may be higher than anticipated. **J. Med. Virol. 86:8–17, 2014.**

© 2013 Wiley Periodicals, Inc.

© 2013 WILEY PERIODICALS, INC.

KEY WORDS: enfuvirtide; HIV-1 resistance; pregnant women; Central-West Region Brazil

INTRODUCTION

During the last two decades, the proportion of women infected with HIV-1 has grown significantly worldwide, and women now represent nearly half of the 34 million persons infected with HIV-1 [WHO/UNAIDS, 2006; WHO/UNAIDS, 2011]. In Brazil, the ratio of man to woman infected with HIV-1 has changed from 40:1 in 1983 to 1.7:1 in 2010 [Brazil, 2011].

In the context of the “feminization” of the AIDS epidemic, prenatal screening for HIV-1 infection has become an important public health issue and a unique opportunity to provide early diagnosis, treatment, and prevention of mother-to-child transmission of HIV-1.

Grant sponsor: United Nations Educational Scientific and Cultural Organization (UNESCO) AIDS/STD National Program; Brazilian Ministry of Health; Grant number: 310-06; Grant sponsor: MS/MCT/CNPq-SCTIE-DECIT/CT-Saúde; Grant number: 022/2007; Grant sponsor: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG to K. C. Alcântara); Grant number: 200910267000696; Grant sponsor: FAPEG (to M. N. G. Reis); Grant number: 201210267000386; Grant sponsor: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq to L. P. Cardoso); Grant number: 141820/2006-3; Grant sponsor: CNPq (to M. M. Stefani); Grant number: 310582/2011-3.

The authors declare that there is no conflict of interest involving this manuscript.

*Correspondence to: Mariane Martins de Araújo Stefani, Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Rua 235 s/n Setor Universitário, 74605-050 Goiânia, Goiás, Brasil.

E-mail: mariane.stefani@pq.cnpq.br

Accepted 20 July 2013

DOI 10.1002/jmv.23738

Published online 13 September 2013 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

Anexo 9 – Low Rate of Transmitted Drug Resistance May Indicate Low Access to Antiretroviral Treatment in Maranhão State, Northeast Brazil (Artigo publicado em 2015)

AIDS RESEARCH AND HUMAN RETROVIRUSES
Volume 31, Number 2, 2015
© Mary Ann Liebert, Inc.
DOI: 10.1089/aid.2014.0261

SEQUENCE NOTES

Low Rate of Transmitted Drug Resistance May Indicate Low Access to Antiretroviral Treatment in Maranhão State, Northeast Brazil

Maria Edileuza Soares Moura,¹ Mônica Nogueira da Guarda Reis,² Yanna Andressa Ramos Lima,² Kelsen Dantas Eulálio,³ Ludimila Paula Vaz Cardoso,^{2,4} and Mariane Martins de Araújo Stefani²

Abstract

The Brazilian AIDS epidemic is characterized by significant geographic contrasts: a reduction in incidence and mortality in the epicenter (southeast) and an increase in the northeast. HIV-1-transmitted drug resistance (TDR) and genetic diversity were investigated among 106 antiretroviral (ARV)-naïve patients from Maranhão State, northeast. The HIV-1 protease (PR) and reverse transcriptase (RT) regions were sequenced; subtypes were assigned by REGA/phylogenetic analysis. TDR to the nucleoside/nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor (NRTI/NNRTI) and protease inhibitor (PI) was identified by the Calibrated Population Resistance tool (Stanford). The median age was 31 years (range 18–72), with 54.7% women, 78.3% heterosexual transmission, and 17.9% men who have sex with men (MSM). Around 30% had <350 CD4⁺ T cells/ μ l and 47.2% had plasma viral loads $\leq 10,000$ copies/ml. The TDR rate was 3.8% (4/106; CI 95%, 1.2–8.9%) (three males, two of them MSM). Only single class mutations to NRTI (M184V; T215S) or NNRTI (K103S/N) were detected. Subtype B represented 81.1% (86/106), F1 1.9% (2/106), and C 2.8% (3/106); 14.2% were mosaics: 13 BF1 and 2 BC. Surveillance of TDR and HIV-1 genetic diversity is important to improve control strategies regionally.

STRIKING REGIONAL DIFFERENCES have been described in the dynamic of the Brazilian AIDS epidemic, which has stabilized in the most populated and industrialized southeast/south regions where cases are strongly concentrated. In the past decade, a reduction of 18.6% in the AIDS detection rate has taken place in the southeast, contrasting with a 62.6% increase in the northeast region, with high rates of HIV-1-infected young individuals in the 15–24 year age range.¹ Since the 1990s the Brazilian public health program has provided free antiretroviral drugs (ARV) to more than 313,000 HIV-1/AIDS patients, promoting a 14% reduction in AIDS-related mortality.¹ However, during the past decade, a 33.3% growth in AIDS-related mortality was reported in the northeast region.¹

One of the drawbacks of the widespread use of ARV is the selection of mutations associated with drug resistance, which can be transmitted to uninfected patients. Transmitted drug resistance (TDR) represents an important public health issue that can impact initial treatment options including highly active antiretroviral therapy (HAART) with nucleoside and nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTI/NNRTI)

and protease inhibitors (PI).² Genotyping tests have been employed to orient treatment options by identifying mutations that may confer resistance to ARV drugs.

Since the beginning of the AIDS epidemic in Brazil, Maranhão State (6,794,301 inhabitants) in northeast Brazil has identified 11,460 cases. São Luís, the State capital, is a port city and Itaqui harbor exports iron ore, pig iron, soy, petroleum derivatives, copper, and aluminum. In the northeast, São Luís has the highest incidence of AIDS cases (42.5/100,000 inhabitants) among municipalities with over 50,000 inhabitants. From 2009 to 2012, 10 referral centers for AIDS patients' care were available in Maranhão State, where most of the HIV-1-infected patients were symptomatic and had AIDS-defining illness at diagnosis.³

Low to moderate levels of TDR have been reported in patients from the most densely populated southeast/south regions in Brazil.^{4–7} However, there are very limited data from regions where the epidemic is growing, including Maranhão State in northeast Brazil, our study area, which has recently reported a 106.2% increase in AIDS cases rate. This

¹State University of Maranhão, Caxias City/Maranhão State, Brazil.

²Tropical Pathology and Public Health Institute, Federal University of Goiás, Goiânia City/Goiás State, Brazil.

³Faculty of Medicine, University of Piauí State, Teresina City, Piauí State, Brazil.

⁴Faculty of Medicine, Federal University of Goiás, Jataí/Goiás State, Brazil.

HIV-1 Transmitted Drug Resistance and Genetic Diversity Among Patients From Piauí State, Northeast Brazil

Maria Edileuza Soares Moura,¹ Mônica Nogueira da Guarda Reis,² Yanna Andressa Ramos Lima,² Kelsen Dantas Eulálio,³ Ludimila Paula Vaz Cardoso,² and Mariane Martins Araújo Stefani^{2*}

¹University of Maranhão, Caxias, Brazil

²Tropical Pathology and Public Health Institute, Federal University of Goiás, Goiânia, Brazil

³Faculty of Medicine, University of Piauí, Teresina, Brazil

HIV-1 transmitted-drug-resistance and genetic diversity are dynamic and may differ in distinct locations/risk groups. In Brazil, increased AIDS incidence and related mortality have been detected in the Northeast region, differently from the epicenter in the Southeast. This cross-sectional study describes transmitted-drug-resistance and HIV-1 subtypes in protease/PR and reverse transcriptase/RT regions among antiretroviral naïve patients from Piauí State, Northeast Brazil. Among 96 patients recruited 89 (92.7%) had HIV-1 PR/RT regions sequenced: 44 females and 45 males, 22 self-declared as men who have sex with men. Transmitted-drug-resistance was investigated by CPR tool (Stanford HIV-1 Drug Resistance/SDRM). HIV-1 subtypes were assigned by REGA and phylogenetic inference. Overall, transmitted-drug-resistance rate was 11.2% (10/89; CI 95%: 5.8–19.1%); 22.7% among men who have sex with men (5/22; CI 95%: 8.8–43.4%), 10% in heterosexual men (2/20; CI 95%: 1.7–29.3%) and 6.8% in women (3/44; CI 95%: 1.8–17.4%). Singleton mutations to protease-inhibitor/PI, nucleoside-reverse-transcriptase-inhibitor/NRTI or non-nucleoside-reverse-transcriptase-inhibitor/NNRTI predominated (8/10): PI mutations (M46L, V82F, L90M); NRTI mutations (M41L, D67N) and NNRTI mutations (K103N/S). Dual class resistance mutations to NRTI and NNRTI were observed: T215L (NRTI), Y188L (NNRTI) and T215N (NRTI), F227L (NNRTI). Subtype B prevailed (86.6%; 77/89), followed by subtype F1 (1.1%, 1/89) and subtype C (1.1%, 1/89). B/F1 and B/C intersubtype recombinants represented 11.2% (10/89). In Piauí State extensive testing of incidence and transmitted-drug-resistance in all populations with risk behaviors may help control AIDS epidemic locally. *J. Med. Virol.* 87:798–806, 2015.

© 2015 Wiley Periodicals, Inc.

KEY WORDS: HIV-1; transmitted drug resistance; subtypes; Northeast Brazil

INTRODUCTION

HIV-1 surveillance programs should monitor incidence/prevalence, subtypes distribution and drug resistance mutations among all exposure categories, especially in high risk groups, such as men who have sex with men, commercial sex workers and intravenous drug users (IDU). Brazil has reported the largest number of AIDS cases and the highest level of HIV-1 genetic diversity in Latin America and in this huge and diverse country, AIDS epidemic reflects important regional differences [Brazil, 2013]. Although the epidemic has been considered stable, over the last 10 years, from 2003 to 2012 an

All authors declare no conflicts of interest.

This study was approved by the regional Institutional Review Boards ("Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual do Piauí", protocol# 022/2011 and "Comitê de Ética de Pesquisa do Hospital de Doenças Tropicais Dr. Natan Portela", protocol# 16/2011). All participants were instructed about the study and signed a written informed consent before interview and blood collection for HIV-1 molecular analysis.

Grant sponsor: CNPq; Grant number: 304869/2008-2; Grant sponsor: FAPES; Grant number: APP-UNIVERSAL-00222/12; Grant sponsor: CAPES; Grant numbers: 52001016; 02479/09-5; Grant sponsor: FAPEG; Grant number: 201210267000386

*Correspondence to: Mariane Martins Araújo Stefani, Tropical Pathology and Public Health Institute, Federal University of Goiás, 235 Street, Setor Universitário, 74605-050, Goiânia city, Goiás State, Brazil.

E-mail: mariane.stefani@pq.cnpq.br

Accepted 1 October 2014

DOI 10.1002/jmv.24087

Published online 3 February 2015 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

Incident and Long-Term HIV-1 Infection Among Pregnant Women in Brazil: Transmitted Drug Resistance and Mother-to-Child Transmission

Yanna Andressa Ramos Lima,¹ Ludimila Paula Vaz Cardoso,² Mônica Nogueira da Guarda Reis,¹ and Mariane Martins Araújo Stefani^{1*}

¹Tropical Pathology and Public Health Institute, Federal University of Goiás, Goiânia, Goiás, Brazil

²Department of Medicine, Federal University of Goiás, Jataí, Goiás, Brazil

Primary infection, seroconversion, and transmitted drug resistance (TDR) during pregnancy may influence the risk of mother-to-child-transmission (MTCT) of HIV-1 infection. This study estimated recent seroconversion, TDR rates, HIV-1 subtypes and pregnancy outcomes among 95 recently diagnosed, antiretroviral (ARV)-naïve pregnant women recruited during antenatal care in central western Brazil. Recent seroconversion was defined by BED-capture enzyme immunoassay (<155 days) and ambiguous nucleotides base calls (<1 year) in *pol* sequences (protease-PR and reverse transcriptase-RT regions). TDR was evaluated by the Calibrated Population Resistance tool. HIV-1 subtypes were defined by REGA and phylogenetic analyses. The median age of participants was 25 years; the median gestational age at diagnosis was 20.5 weeks. Based on serology and sequence polymorphism, recent infection was identified in 11.6% (11/95) and, 9 of them (82%), probably seroconverted during pregnancy; one MTCT case was observed among them. Three cases of stillbirth were observed among chronic infected patients (3.6%; 3/84). Moderate rate of TDR was observed (9/90, 10%, CI-95% 4.7–18.1%). Subtype B was 60% (54/90), 13.3% (12/90) was subtype C, 6.7% (6/90) was subtype F1. Recombinant B^{PR}/F1^{RT} and F1^{PR}/B^{RT} viruses comprised 15.5% (14/90); B^{PR}/C^{RT} mosaics represented 4.4% (4/90). Seroconversion during pregnancy, late presentation to antenatal care and moderate TDR identified in this study represent significant challenges for the MTCT elimination. *J. Med. Virol.* 88: 1936–1943, 2016. © 2016 Wiley Periodicals, Inc.

KEY WORDS: HIV-1; seroconversion; pregnancy; drug resistance

INTRODUCTION

Recent cases of infection by HIV-1 can be identified by different serological approaches known as serological testing algorithms for recent HIV seroconversion (STARHS) [Janssen et al., 1998; McDougal et al., 2005; Prejean et al., 2011]. The commercial BED-capture enzyme immunoassay (BED-CEIA), a less-sensitive immunoassay developed to detect HIV-1 incidence/recent seroconversion, has been used in diverse populations [Parekh et al., 2002; Braunstein et al., 2009; de Castro et al., 2010]. This assay involves the quantification, during acute phase, of anti HIV-specific IgG antibodies in the pool of total IgG, which gradually increases as a result of the maturation of the immune response during established infections [Parekh et al., 2002]. One limitation of BED-CEIA comes from the fact that some long-term infections may be associated with a decrease in HIV-specific IgG antibodies and these cases could be misclassified as recent seroconversions. Also, different viral subtypes can lead to variations in the cut-off for recent infection determined by BED-CEIA restricting its use in patients with high viral diversity [Parekh et al., 2011].

Other alternative approaches proposed to estimate incident cases of HIV-1 infection include the

Grant sponsor: MS/MCT/CNPq-SCITE-DECIT/CT-Saúde; Grant number: 022/2007; Grant sponsor: The National Council of Technological and Scientific Development/CNPq; Grant number: 304869/2008-2; Grant sponsor: CAPES; Grant numbers: 52001016; 02479/09-5; Grant sponsor: FAPESP; Grant number: 201210267000386

*Correspondence to: Mariane Martins de Araújo Stefani, Universidade Federal de Goiás/Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, sala 335, Rua 235 s/n Setor Universitário, Goiânia, Goiás 74605-050, Brazil. E-mail: mmastefani@gmail.com; mariane.stefani@pq.cnpq.br

Accepted 29 March 2016

DOI 10.1002/jmv.24540

Published online 14 April 2016 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

Anexo 12 – HIV-1 infection and pregnancy in young women in Brazil: socioeconomic and drug resistance profiles in a cross-sectional study (Artigo publicado em 2016)

Open Access

Research

BMJ Open HIV-1 infection and pregnancy in young women in Brazil: socioeconomic and drug resistance profiles in a cross-sectional study

Yanna Andressa Ramos Lima,¹ Mônica Nogueira Guarda Reis,¹
Ludimila Paula Vaz Cardoso,² Mariane Martins Araújo Stefani¹

To cite: Lima YAR, Reis MNG, Cardoso LPV, Stefani MMA. HIV-1 infection and pregnancy in young women in Brazil: socioeconomic and drug resistance profiles in a cross-sectional study. *BMJ Open* 2016;6:e010837. doi:10.1136/bmjopen-2015-010837

► Prepublication history for this paper is available online. To view these files please visit the journal online (<http://dx.doi.org/10.1136/bmjopen-2015-010837>).

Received 14 December 2015
Revised 9 June 2016
Accepted 13 June 2016



CrossMark

¹Tropical Pathology and Public Health Institute, Federal University of Goiás, Goiânia, Goiás, Brazil
²Department of Medicine, Federal University of Goiás, Jataí, Goiás, Brazil

Correspondence to:
Dr Mariane Martins Araújo Stefani;
mmstefani@gmail.com

ABSTRACT

Objectives: To describe socioeconomic and antiretroviral (ARV) drug resistance profiles among young pregnant women infected with HIV-1.

Setting: A public health antenatal programme responsible for screening ~90 000 pregnant women per year for nine different infectious diseases in Central Western Brazil.

Participants: 96 young pregnant women (15–24 years) infected with HIV-1.

Primary and secondary outcome measures: Standard interviews and blood samples were taken at the time of recruitment, at the first medical appointment after confirmation of diagnosis of HIV-1 infection, and before ARV prophylaxis initiation. Clinical and laboratory data were retrieved from medical files. HIV-1 pol gene sequences (entire protease/PR, partial reverse transcriptase/RT) were obtained from plasma RNA. ARV resistance mutations (CPR/Stanford HIV-1; International AIDS Society-USA databases) were identified.

Results: The median age was 21 years; most reported <8 years education; 73% were recently diagnosed. Approximately 20% (19/96) presented late for antenatal care (after 26 gestational weeks), while 49% reported ≥2 previous pregnancies. Possible heterosexual transmission by an HIV-1 infected partner (17%) and commercial sex work (2%) were reported. The median of CD4 cell count was 526 cells/mm³; the median viral load was: 10 056 copies/mL in ARV-naïve (48/96) patients and 5881 copies/mL in ARV-exposed (48/96) patients. Two probable seroconversion cases during pregnancy were identified in adolescents. One mother-to-child transmission case (1.0%) was observed. Transmitted drug resistance among ARV-naïve patients was 9.3% (CI 95% 3.3% to 19.6%); secondary drug resistance among ARV-exposed patients was 12.5% (CI 95% 4.7% to 25.6%).

Conclusions: Despite high access to antenatal care, the low socioeconomic-educational profiles seen in these young HIV-1-infected women highlight the necessity of improved public health educational and preventive strategies regarding HIV infection and early unplanned pregnancy.

Strengths and limitations of this study

- Representative sample of HIV-1 infected pregnant young women attending an antenatal care programme that screens ~90 000 women per year;
- Assessment of drug resistance and mother-to-child transmission of potential risk among adolescents and young pregnant women;
- Other studies on larger groups of HIV-1 infected pregnant adolescent/young women from other settings in Brazil and abroad are important to better define this vulnerable population.

INTRODUCTION

The Brazilian AIDS epidemic is considered stable; however, in the past decade, a significant increase in AIDS cases in the younger population (15–19 years) was observed both among males (53.2%) and females (10.5%).¹ Adolescence is characterised by a series of physical, emotional and social modifications that influence health, especially factors associated with the start of sexual activities. Adolescents (10–19 years) and young adults (20–24 years) are considered highly susceptible to sexually transmitted infections (STIs), including HIV infection.² This vulnerability in the younger age is certainly associated with engagement in risky sexual behaviours such as early sexual debut, multiple sexual partners and lack of consistent use of condoms.³ Young women may also be vulnerable to sexual violence and commercial sex with older men.²

In Brazil, during the past decade, 40% of HIV-1 infected pregnant women were in the age range of 15–24 years.¹ In the Central Western region, adolescents represented 26% of 54 139 pregnant women screened for HIV-1 infection during antenatal care.⁴

BMJ

Lima YAR, et al. *BMJ Open* 2016;6:e010837. doi:10.1136/bmjopen-2015-010837

1