

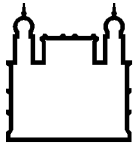
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Biologia Computacional e Sistemas

Filodinâmica das variantes não-pandêmicas do Vírus da
Imunodeficiência Humana Tipo 1 Subtipo B no Brasil

FLÁVIA CAROLINA DE PAULA DIVINO

Rio de Janeiro
Fevereiro de 2017



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Computacional e Sistemas

Flávia Carolina de Paula Divino

Filodinâmica das variantes não-pandêmicas do Vírus da Imunodeficiência Humana
Tipo 1 Subtipo B no Brasil

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Computacional e Sistemas

Orientador : Dr. Gonzalo José Bello Bentancor

RIO DE JANEIRO

Fevereiro de 2017

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ – RJ

D618 Divino, Flávia Carolina de Paula

Filodinâmica das variantes não-pandêmicas do vírus da
Imunodeficiência Humana tipo 1 subtipo B no Brasil / Flávia Carolina de
Paula Divino. – Rio de Janeiro, 2017.

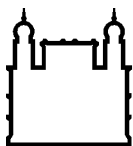
xvii, 53 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação
em Biologia Computacional e Sistemas, 2017.

Bibliografia: f. 62-69

1. HIV. 2. Subtipo B. 3. Filodinâmica. 4. Variantes não-pandêmicas.
5. Brasil. I. Título.

CDD 579.2569



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Computacional e Sistemas

AUTOR: FLÁVIA CAROLINA DE PAULA DIVINO

Filodinâmica das variantes não-pandêmicas do Vírus da
Imunodeficiência Humana Tipo 1 Subtipo B no Brasil

ORIENTADOR: Dr. Gonzalo José Bello Bentancor

Aprovada em: ____/____/____

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Ana Carolina Paulo Vicente (Presidente) (FIOCRUZ)

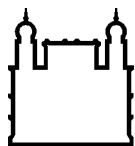
Prof. Dr. Marcelo Alves Soares (INCA/UFRJ)

Prof. Dr. Dennis Maletich Junqueira (UFRGS)

Prof. Dr. Marcio Galvão Pavan (FIOCRUZ)

Prof. Dr. Edson Oliveira Delatorre (FIOCRUZ)

Rio de Janeiro, 20 de fevereiro de 2017



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Primeiramente,
Fora Temer!

AGRADECIMENTOS

Gratidão vai além de um muito obrigado, ultrapassa gentilezas. Gratidão é celebrar cada momento, cada conquista e com o coração leve ter uma bela forma de agradecer. Sinto gratidão por muitas pessoas que dividem a vida comigo, que passaram por ela e deixaram um pouquinho e todas aquelas que depositaram energia linda para essa conquista.

Gratidão à energia que me rege, aos meus ancestrais que me ajudam e me mantem num caminho de paz.

Aos meus pais, Nazareno (em memória) e Mariza que nunca mediram esforços para que eu pudesse alcançar cada objetivo na vida com carinho e amor de sempre. Devo tudo a vocês. Mãe, obrigada por tudo. Eu te amo.

Aos meus irmãos, Flávio e Fábio e Déia por todo carinho na caminhada da vida. Amo vocês

Ao meu orientador Gonzalo, pelos dois anos de aprendizado e carinho. Foi maravilhoso trabalhar com você! Obrigada pela oportunidade de crescimento, e não vou esquecer os chocolates uruguaios! À Daiana, pelos dias e tardes agradáveis, pelo carinho de sempre e pelo aprendizado.

A todos os integrantes LABAIDS pela vivência e crescimento conjunto. Gratidão por tudo.

Aos amigos e encontros que a vida me presenteou dentro da Fiocruz, tenho um carinho enorme por todos e gratidão infinita pela vivência! Aos amigos de luta do Comitê Fiocruz pela democracia, seria injusto citar nomes, a vida foi linda ao me apresentar a todos vocês! À Carol e Luciana que foram amigas, fiéis escudeira nesses anos aqui. Amo vocês! Gratidão pelo encontro com pessoas magnificas.

Aos meus amigos pessoais da vida! Gratidão por tudo!

Gratidão a você Regiane, minha Preta, gratidão pela força de sempre, pelo caminho juntas, pela confiança e amizade. Te amo!

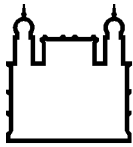
Nossa ciência nos tem feito cínicos, nossa inteligência, duros e sem sentimento...

Pensamos demasiado e sentimos demasiadamente pouco...

Mais que da máquina, necessitamos de humanidade...

Mais que inteligência, necessitamos de amabilidade e cortesia...

Charles Chaplin
O Grande Ditador

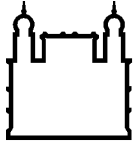


Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

RESUMO

No Brasil, estima-se que aproximadamente 830.000 pessoas estejam infectadas com o vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1), agente causador da síndrome da imunodeficiência adquirida (aids). O HIV-1 exibe um extraordinário grau de variabilidade genética que se organiza em grupos (M, N, O e P) e subtipos (A-D, F-H, J e K). O subtipo B foi o primeiro a ser identificado pela comunidade científica internacional, representa aproximadamente 11% de todas as infecções causadas pelo HIV no mundo, com elevada prevalência nas Américas, na Europa, na Austrália assim como também em alguns países Asiáticos. O subtipo B possui uma variante globalmente distribuída ($B_{\text{PANDEMICO}}$) e outras variantes principalmente restritas à região do Caribe (B_{CAR}). Um estudo anterior conduzido pelo nosso grupo demonstrou uma alta prevalência (95%) da variante $B_{\text{PANDEMICO}}$ no Brasil, no entanto, o mesmo foi baseado em sequências subtipo B oriundas principalmente das regiões Sudeste, Sul e Centro-Oeste. O objetivo deste projeto é estimar a frequência das variantes $B_{\text{PANDEMICO}}$ e B_{CAR} do HIV-1 subtipo B em indivíduos residentes em distintos estados e regiões do Brasil e caracterizar a dinâmica de disseminação espaço-temporal das variantes B_{CAR} no país. Foram analisadas um total de 2.682 sequências da região *pol* do HIV-1 subtipo B provenientes de indivíduos de 21 estados brasileiros das cinco regiões do país recrutados entre 1998 e 2013. As análises filogenéticas de Máxima Verossimilhança revelaram a presença de variantes B_{CAR} em 16 dos 21 estados brasileiros analisados. As variantes B_{CAR} compreendem uma fração menor (<10%) de infecções do subtipo B na maioria dos estados brasileiros analisados, com exceção de Roraima (41%), Amazonas (14%) e Maranhão (14%). As análises filogeográficas Bayesianas indicam que as variantes B_{CAR} foram introduzidas em diferentes estados de todas as regiões brasileiras desde a Hispaniola, Guiana Francesa e Guiana. Algumas dessas variantes provavelmente introduzidas através de Roraima, Maranhão e São Paulo entre o final dos anos 1970 e o início da década de 1980 estabeleceram epidemias secundárias na população brasileira e foram posteriormente disseminadas para outros estados. Estes resultados indicam que as epidemias do HIV-1 subtipo B em alguns estados brasileiros das regiões Norte e Nordeste apresentam um padrão molecular único caracterizado pela elevada prevalência de variantes B_{CAR} que foram provavelmente introduzidas no país a mais de 30 anos. Estes resultados também apontam para uma forte ligação epidemiológica entre as epidemias de HIV-1 de Roraima, Amazonas e Maranhão e as epidemias do Caribe e de países do extremo norte da América do Sul como Guiana, Guiana Francesa e Suriname.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

ABSTRACT

In Brazil, it is estimated that approximately 830,000 people are infected with the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1), the causing agent of the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). HIV-1 exhibits an extraordinary degree of genetic variability that is organized into groups (M, N O and P) and subtypes (A-D, F-H, J and K). Subtype B was the first to be identified by the international scientific community and accounts for approximately 11% of all HIV infections in the world, reaching high prevalence in the Americas, Europe, Australia, and in some Asian countries. Subtype B epidemic comprises one variant globally distributed (B_{PANDEMIC}) as well as other non-pandemic variants mostly restricted to the Caribbean region (B_{CAR}). A previous study conducted by our group revealed a high prevalence (95%) of the B_{PANDEMIC} variant in Brazil, however, that study was based on sequences originating mainly from the Southeast, South and Central-West regions. The objective of this project was to estimate the frequency of the B_{PANDEMIC} and B_{CAR} variants among subtype B-infected individuals from different Brazilian states and regions, and to characterize the spatiotemporal dissemination dynamics of the B_{CAR} variants in Brazil. A total of 2,682 HIV-1 subtype B *pol* sequences collected from 21 different Brazilian states from the five country regions between 1998 and 2013 were analyzed. Maximum Likelihood phylogenetic analyses revealed that the B_{CAR} strains reached 16 out of 21 Brazilian states here analyzed. The B_{CAR} clades comprise a low fraction (<10%) of subtype B infections in most Brazilian states analyzed, with exception of Roraima (41%), Amazonas (14%) and Maranhão (14%). Bayesian phylogeographic analyses indicate that B_{CAR} strains originally from the Hispaniola, French Guiana and Guiana were introduced at multiple times into different states from all Brazilian regions and a few of those strains, probably introduced into Roraima, Maranhão and São Paulo between the late 1970s and the early 1980s, established secondary outbreaks in the Brazilian population. These results support that the HIV-1 subtype B epidemics in some Brazilian states from the Northern and Northeastern regions display a unique molecular pattern characterized by the high prevalence of B_{CAR} lineages that were probably introduced into the country more than 30 years ago. These results also point to a strong epidemiological link between the HIV-1 epidemics in Roraima, Amazonas and Maranhão and those epidemics in the Caribbean islands and in Northern South American countries like French Guiana, Guiana and Suriname.

ÍNDICE

RESUMO	8
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Histórico.....	1
1.2 Epidemia de HIV/aids no Brasil.....	3
1.3 O HIV.....	5
1.4 Epidemiologia molecular do HIV-1.....	7
1.5 Epidemiologia molecular do HIV-1 no Brasil	8
1.6 Origem e disseminação da epidemia de HIV-1 subtipo B nas Américas	10
1.7 Origem e disseminação da epidemia de HIV-1 subtipo B no Brasil	12
2 OBJETIVOS	14
2.1 Objetivo Geral.....	14
2.2 Objetivos Específicos	14
3 MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1 Sequências de HIV-1 subtipo B provenientes do Brasil.	15
3.2 Sequências de HIV-1 subtipo B provenientes do extremo Norte da América do Sul.	17
3.3 Sequências referência dos clados BCAR e BPANDEMICO do HIV-1 subtipo B.....	18
3.4 Confirmação do subtipo viral.....	19
3.5 Classificação das sequências de HIV-1 subtipo B nos clados B _{CAR} e B _{PANDEMICO}	19
3.6 Análises evolutivas e filogeográficas.....	20
4 RESULTADOS	22
4.1 Frequência das variantes B _{PANDEMICO} e B _{CAR} nos distintos estados do Brasil.....	22
4.2 Dinâmica de disseminação espaço-temporal das variantes B _{CAR} do HIV-1 do Caribe para o Brasil.	25
4.3 Dinâmica de disseminação espaço-temporal dos clados B _{CAR} brasileiros.	30

4.4	Frequência das variantes $B_{\text{PANDEMICO}}$ e B_{CAR} e identificação dos principais clados B_{CAR} nos países do extremo norte da América do Sul.....	31
4.5	Dinâmica de disseminação espaço-temporal dos principais clados B_{CAR} que circulam no extremo norte da América do Sul.	34
5	DISCUSSÃO	39
6	CONCLUSÕES	44
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Variação e distribuição do numero das pessoas vivendo com HIV/aids no mundo por região geográfica em 2015.	2
Figura 1.2 Distribuição espacial das pessoas vivendo com HIV/aids (PVHA) vinculadas ao serviço público de saúde no Brasil (2012).	4
Figura 1.3 Taxa de detecção de aids (/100 mil habitantes) e percentual de declínio ou incremento entre 2006 e 2015 segundo UF de residência.	4
Figura 1.4 Representação esquemática da partícula viral madura do HIV.	6
Figura 1.5 Representação esquemática do genoma proviral do HIV dos tipos 1 e 2.	6
Figura 1.6 Distribuição geográfica e prevalência global dos subtipos do HIV-1 grupo M e formas recombinantes.	8
Figura 1.7 Distribuição dos subtipos de HIV-1 e formas recombinantes por região do Brasil.	9
Figura 1.8 Arvore que resume os resultados das análises bayesianas de genes env completos para maximizar as hipóteses de origem e disseminação do HIV-1 subtipo B nas Américas.	10
Figura 1.9 Prevalência dos clados $B_{\text{PANDEMICO}}$ e B_{CAR} nas infecções pelo HIV-1 subtipo B no Caribe.	11
Figura 1.10 Prevalência dos clados $B_{\text{PANDEMICO}}$ e B_{CAR} nas infecções pelo HIV-1 subtipo B na America Latina.	12
Figura 4.1 Árvores filogenéticas de MV das sequências HIV-1 subtipo B provenientes do estado de São Paulo (A), das regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste (B) e das regiões Norte e Nordeste (C) do Brasil.	23
Figura 4.2 Proporção estimada dos clados $B_{\text{PANDEMICO}}$ e B_{CAR} nos diferentes estados do Brasil de acordo com as análises filogenéticas de MV.	24
Figura 4.3 Árvore Bayesiana de máxima credibilidade de sequências <i>pol</i> de HIV-1 de linhagens B_{CAR} do Brasil e Caribe e sequências de referência do subtipo D da RDC.	27
Figura 4.4 Representação esquemática da dinâmica de disseminação das variantes B_{CAR} do HIV-1 entre o Caribe e Brasil.	28
Figura 4.5 Árvores filogenéticas de MV das sequências HIV-1 subtipo B provenientes da Guiana Francesa e Suriname.	32
Figura 4.6 Árvore filogenética de MV das sequencias HIV-1 subtipo B <i>pol</i> de variantes B_{CAR} provenientes do Brasil , Guiana Francesa, Suriname e diversas ilhas do Caribe.	33

Figura 4.7 Árvore Bayesiana de máxima credibilidade de sequências *pol* de HIV-1 das maiores linhagens B_{CAR} do Brasil, Guiana Francesa e Suriname, sequências B_{CAR} da Guiana e ilhas do Caribe e sequências de referência do subtipo D **37**

Figura 4.8 Representação esquemática da dinâmica de disseminação das variantes BCAR do HIV-1 entre o Caribe, Guiana Francesa, Suriname, Guiana e Brasil. **38**

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 Sequências do gene <i>pol</i> do HIV-1 subtipo B provenientes do Brasil.	15
Tabela 3.2 Sequências do gene <i>pol</i> do HIV-1 subtipo B provenientes da Guiana Francesa, Suriname e Guiana.	17
Tabela 3.3 Sequências de referência dos clados BCAR e BPANDEMICO do HIV-1 subtipo B provenientes do Caribe, EUA e França	18
Tabela 3.4 “Priors” utilizados nas análises Bayesianas para cada um dos parâmetros.	21
Tabela 4.1 Sequências HIV-1 B _{CAR} <i>pol</i> do Brasil e do Caribe utilizadas nas análises filogeográficas Bayesianas.	26
Tabela 4.2 Estimativas Bayesianas do T _{MRCA} dos principais clados B _{CAR} do Brasil e do Caribe.	26
Tabela 4.3 Taxas de fator de Bayes (BF) das ligações epidemiológicas entre as diferentes localidades do Caribe e do Brasil na dispersão das variantes B _{CAR} .	29
Tabela 4.4 Sequências HIV-1 B _{CAR} <i>pol</i> do Brasil, Guiana Francesa, Suriname, Guiana e do Caribe utilizadas nas análises filogeográficas Bayesianas.	34
Tabela 4.5 Estimativas Bayesianas do T _{MRCA} dos principais clados B _{CAR} do Brasil, Guiana Francesa, Suriname e Guiana.	36

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

aLRT	Teste de razão de verossimilhança aproximada.
AM	Amazonas
AC	Acre
AP	Amapá
B _{CAR}	Variante não-pandêmica do subtipo B
B _{PANDEMICO}	Variante pandêmica do subtipo B
BA	Bahia
BF	Fator de Bayes
CRF	Forma Recombinante Circulante
CDC	Centro de Prevenção e Controle de Doenças
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ES	Espirito Santo
EUA	Estados Unidos da América
GF	Guiana Francesa
GY	Guiana
GO	Goiás
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HIV-1	Vírus da Imunodeficiência Humana Tipo 1
HIV-2	Vírus da Imunodeficiência Humana Tipo 2
HISP	Hispaniola
HTLV-III	Vírus Linfotrópico de células T humano Tipo III
IN	Integrase
LAV	Vírus associado a Linfadenopatia
MV	Máxima Verossimilhança
MT	Mato Grosso
MS	Mato Grosso do Sul
MA	Maranhão
MG	Minas Gerais
<i>pol</i>	Gene da polimerase do HIV
PA	Pará
PI	Piauí
PP	Probabilidade Posterior
PR	Paraná

PRO	Protease
PSP	Probabilidade Posterior de Localidade
PE	Pernambuco
RR	Roraima
RO	Rondônia
RDC	República Democrática do Congo
RJ	Rio de Janeiro
RS	Rio Grande do Sul
SR	Suriname
SP	São Paulo
SC	Santa Catarina
TT	Trinidad e Tobago
TR	Transcriptase Reversa
TO	Tocantins
URF	Forma Recombinante Única

1 INTRODUÇÃO

1.1 Histórico

A Síndrome da Imunodeficiência Humana (aids) foi reportada pela primeira vez em 1981 quando o Centro de Prevenção e Controle de Doenças (CDC) dos Estados Unidos da América (EUA) notificou os primeiros casos de imunodeficiência associada a pneumonia e sarcoma de Kaposi em jovens homossexuais masculinos dos estados de Nova York e Califórnia, doenças consideradas raras em indivíduos saudáveis [1]. Em seguida foram notificados casos de aids em mulheres parceiras sexuais de homens com aids assim como em crianças que foram infectadas de forma vertical. Nesse momento ficou claro se tratar de uma síndrome infecciosa, provavelmente provinda de uma transmissão viral.

Em Paris, no Instituto Pasteur, um grupo de pesquisadores liderados pelo Dr. Luc Montanier isolaram em 1983 o agente causador desta nova patologia, sendo então denominado como “Lymphadenopathy-Associated Vírus” (LAV) [2]. No ano seguinte, o grupo liderado pelo Dr. Robert Gallo confirmou que o novo retrovírus isolado, que denominou como “Vírus Linfotrópico de células T humano Tipo III (HTLV-III)”, era o agente causador da AIDS [3]. Em 1986, o Comitê Internacional de Taxonomia Viral renomeou o vírus da aids como Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV).

A aids já foi relatada em mais de 193 países em todo o mundo, dados apontam que aproximadamente 37 milhões de pessoas no mundo estejam infectadas com o HIV e de acordo com os novos dados divulgados pela UNAIDS, estima-se que 17 milhões de pessoas tenham chegado ao final de 2015 com acesso à medicamento antirretrovirais.(Figura 1.1) [4]. A maioria dos indivíduos infectados pelo HIV vivem nas regiões Sul e Este da África (19.0 milhões), seguida pelas regiões Central e Oeste da África (6.5 milhões) e pela Ásia e Pacífico (5.1 milhões) (Figura 1.1). Além de estar amplamente distribuída pelo globo, a aids possui uma taxa de mortalidade próxima a 100% na ausência de terapia antirretroviral, tornando-a uma infecção devastadora. Apesar dos grandes avanços na área de terapêutica, ainda não existem vacinas capazes de controlar esta pandemia.

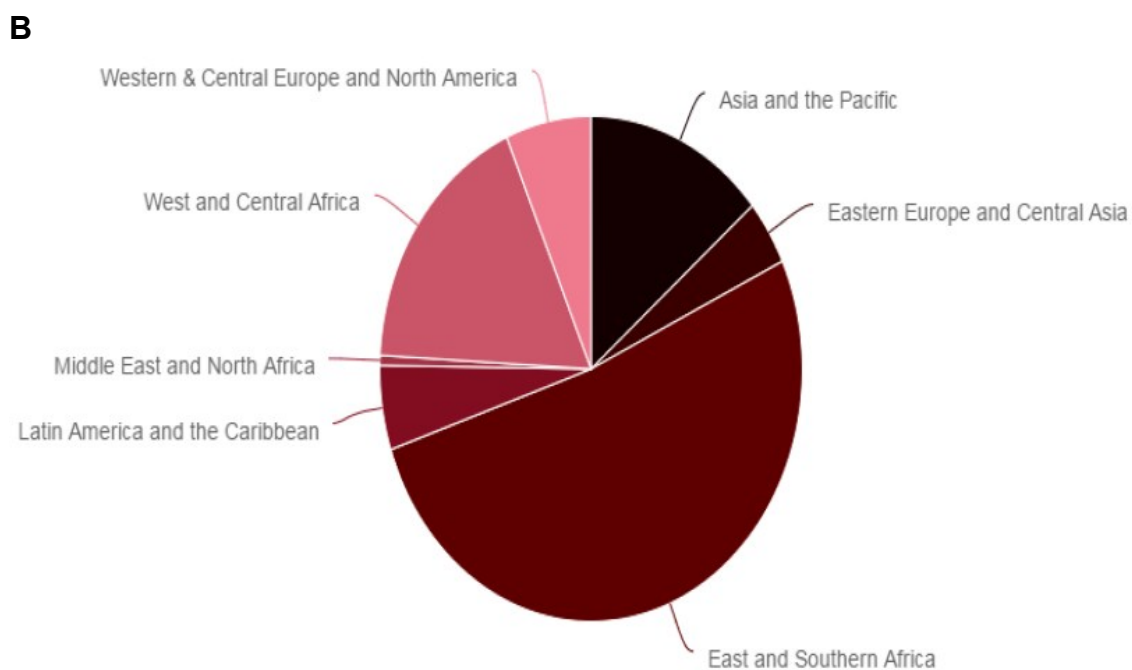
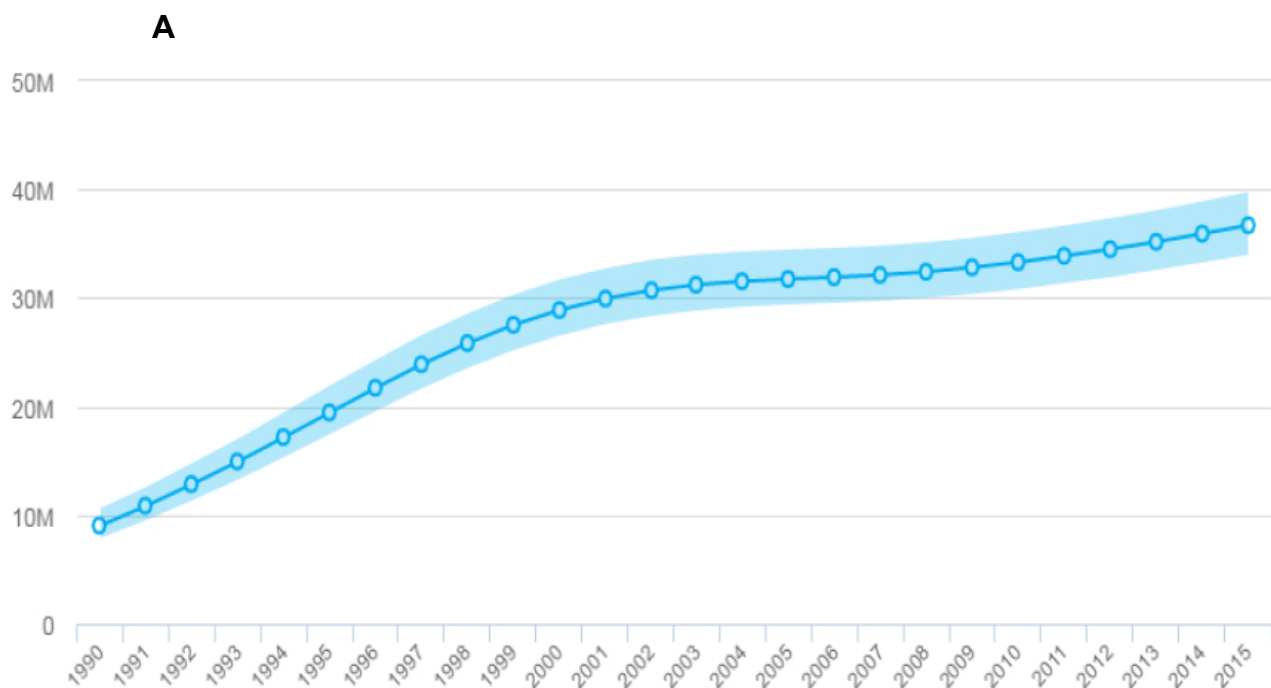


Figura 1. 1 (A) Variação no número das pessoas vivendo com HIV/aids no mundo entre 1990 e 2015. (B) Distribuição do número das pessoas vivendo com HIV/aids no mundo por região geográfica em 2015. Fonte: UNAIDS, estimativa 2016.

1.2 Epidemia de HIV/aids no Brasil

Os primeiros casos de aids no Brasil datam de 1980, e a disseminação da epidemia teria ocorrido primeiramente nas capitais metropolitanas do Sudeste. Os primeiros estudos no Brasil evidenciaram uma epidemia principalmente restrita às grandes metrópoles – Rio de Janeiro e São Paulo – e de predominância masculina, atingindo prioritariamente homens com prática sexual homossexual/bissexual e indivíduos hemofílicos. Nos anos seguintes, já é possível observar quadros de heterossexualização, feminização e interiorização da epidemia [5]. Dessa forma, observa-se um aumento crescente no número de infecções em heterossexuais e mulheres assim como uma disseminação do vírus desde as grandes metrópoles da região Sudeste para as outras regiões do Brasil (Figura 1.2).

De acordo com estimativas do Ministério da Saúde, cerca de 840.000 casos de aids foram notificados no Brasil desde o primeiro caso da doença até junho de 2016, sendo o total de óbitos acumulados no mesmo período de aproximadamente 300.000 [6]. Em relação aos casos de aids notificados de 1980 até junho de 2016, houve uma concentração na região Sudeste (53%), seguida pelas regiões Sul (20%), Nordeste (15%), Norte (6%) e Centro-Oeste (6%). A partir de 1996, quando o Ministério da Saúde passou a disponibilizar gratuitamente os medicamentos antirretrovirais a todos os cidadãos brasileiros com aids, o coeficiente de mortalidade da doença começou a diminuir, passando de 9,6 óbitos por 100 mil habitantes em 1996 para 6,2 óbitos por 100 mil habitantes em 2015.

Tem sido verificada também uma estabilização na taxa de incidência da doença no Brasil nos últimos 10 anos, registrando-se uma média de 20,7 novos casos de aids por 100 mil habitantes. Existem, entretanto, importantes diferenças regionais (Figura 1.3). Entre 2006 e 2015 houve uma importante queda na taxa de incidência de 23,4% na região Sudeste (passando de 23,5 para 18,0 casos/100 mil habitantes), uma leve tendência de queda de 7,4% na região Sul (passando de 30,1 para 27,9 casos/100 mil habitantes) e uma estabilização da taxa na região Centro-Oeste (18,5 casos/100 mil habitantes). No mesmo período, houve um aumento de 37,2% da taxa de incidência na região Nordeste (passando de 11,2 para 15,3 casos por 100 mil habitantes) e de 61,4% no Norte (passando de 14,9 para 24,0 casos por 100 mil habitantes).

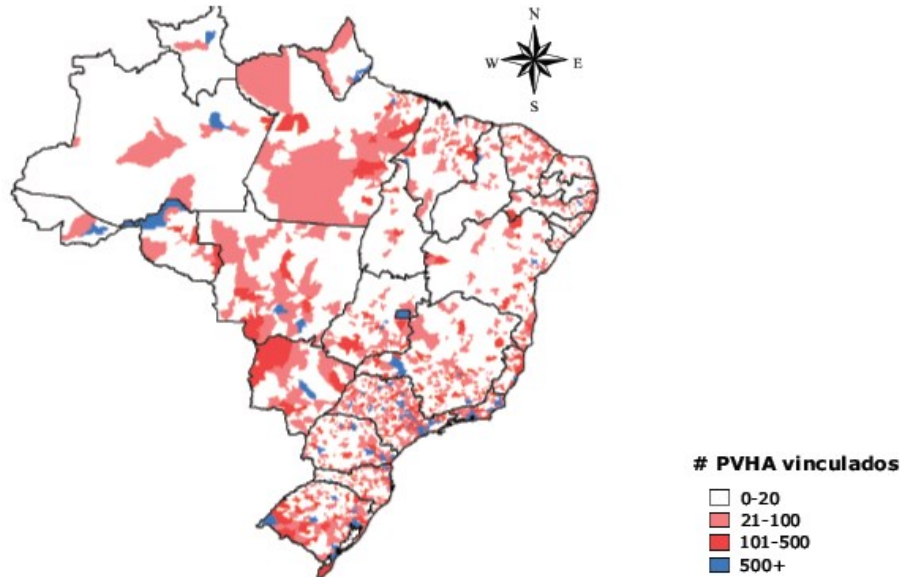


Figura 1.2 Distribuição espacial das pessoas vivendo com HIV/aids (PVHA) vinculadas ao serviço público de saúde no Brasil (2012). Fonte: Boletim Epidemiológico - Aids e DST, 2012. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. Ministério da Saúde.

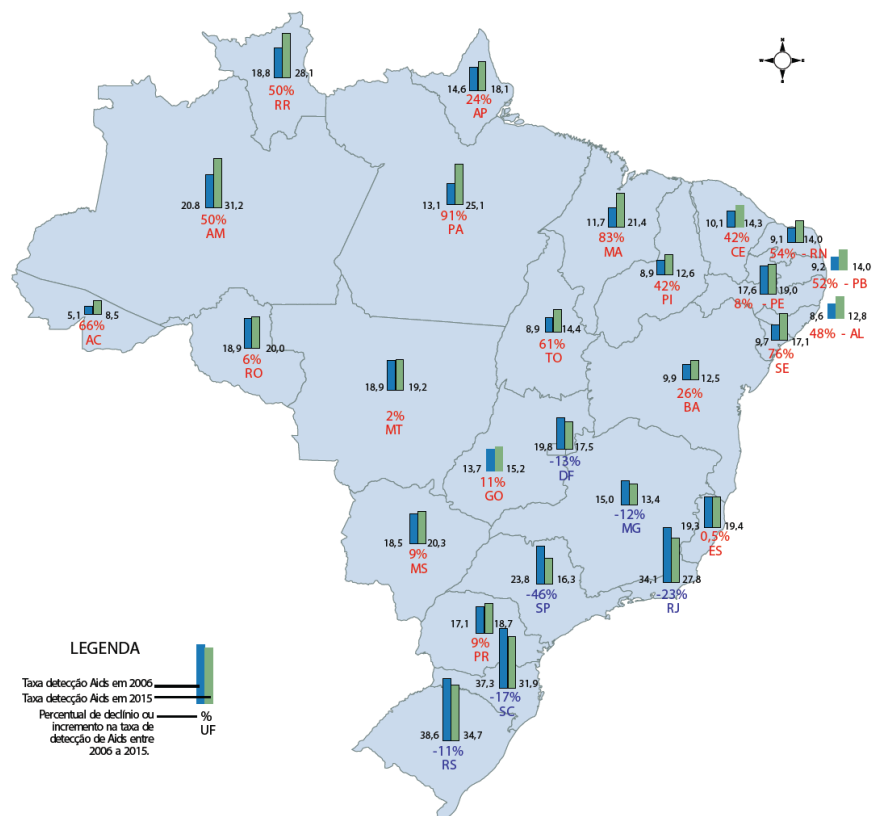


Figura 1.3 Número de detecção de aids (/100 mil habitantes) e percentual de declínio ou incremento entre 2006 e 2015 segundo UF de residência. Fonte: Boletim Epidemiológico - Aids e DST, 2016. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. Ministério da Saúde.

1.3 O HIV

O HIV é membro da família *Retroviridae* e gênero *Lentivirus*. Existem dois tipos de HIV: HIV-1 e HIV-2. Ambos os vírus são resultado de diferentes eventos de transmissão zoonótica de retrovírus de primatas não-humanos para humanos. O HIV-1 resultou de transmissões zoonóticas do vírus da imunodeficiência símia (SIV) de chimpanzés e gorilas para humanos no centro-sul de Camarões [7] [8]. Já o HIV-2 provavelmente se originou a partir da transmissão do SIV da espécie de macaco *Cercocebus atys* para humanos na África Ocidental [9]. Enquanto o HIV-1 se disseminou pelo mundo todo originando a pandemia de aids, o HIV-2 é uma variante menos patogênica e sua distribuição permanece principalmente restrita ao oeste da África.

A partícula viral, com tamanho entre 100-120nm e simetria icosaédrica, é formada por um núcleo protéico envolvido por um envelope lipoprotéico no qual se inserem as glicoproteínas GP120 e GP41, responsáveis pela interação com os receptores celulares e entrada do vírus na célula (Figura 1.4). O núcleo proteico é composto pela matriz (formada pela proteína viral P17) e pelo capsídeo (formado pela proteína viral P24). Dentro do capsídeo encontram-se duas fitas simples de RNA genômico, o nucleocapsídeo (formado pela proteína viral P7) e as enzimas virais Transcriptase Reversa (TR), Protease (PRO) e Integrase (IN) [10].

O genoma viral possui cerca de 10 Kb, e quando integrado no genoma apresenta duas regiões não codificantes em suas extremidades denominadas como Long Terminal Repeats (LTR) e nove regiões codificantes (Figura 1.5) que seguem as seguintes denominações e funções:

gag, pol e env: são genes comuns a todos os retrovírus que codificam proteínas essenciais na estrutura e no ciclo viral incluindo as proteínas do envelope, matriz, capsídeo e nucleocapsídeo, e as enzimas PRO, TR e IN.

tat e rev: são genes regulatórios que codificam proteínas que controlam os processos de transcrição, processamento e exportação dos RNAm virais.

nef, vif, vpr, vpu e/ou vpx: são genes acessórios que codificam proteínas relacionadas a diversas funções incluindo escape do vírus aos mecanismos antivirais do hospedeiro. O gene *vpu* está presente unicamente no HIV-1, enquanto que o gene *vpx* está presente unicamente no HIV-2.

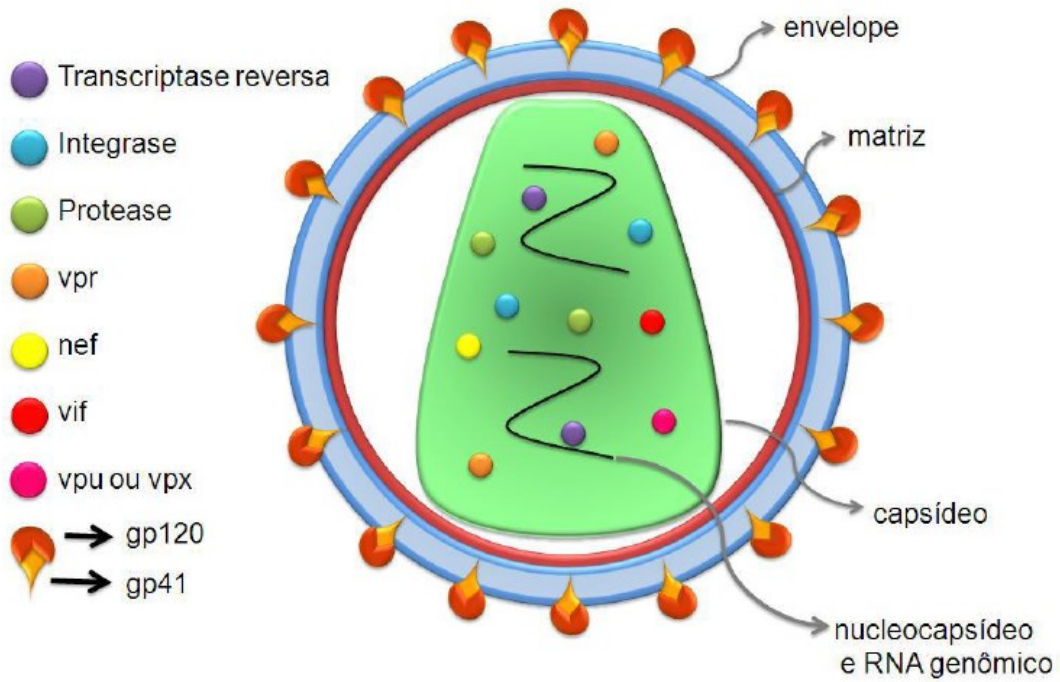


Figura 1.4 Representação esquemática da partícula viral madura do HIV. Fonte: Apostila de curso de inverno – 2015 “HIV: Aspectos virológicos e genética do hospedeiro”. Fiocruz

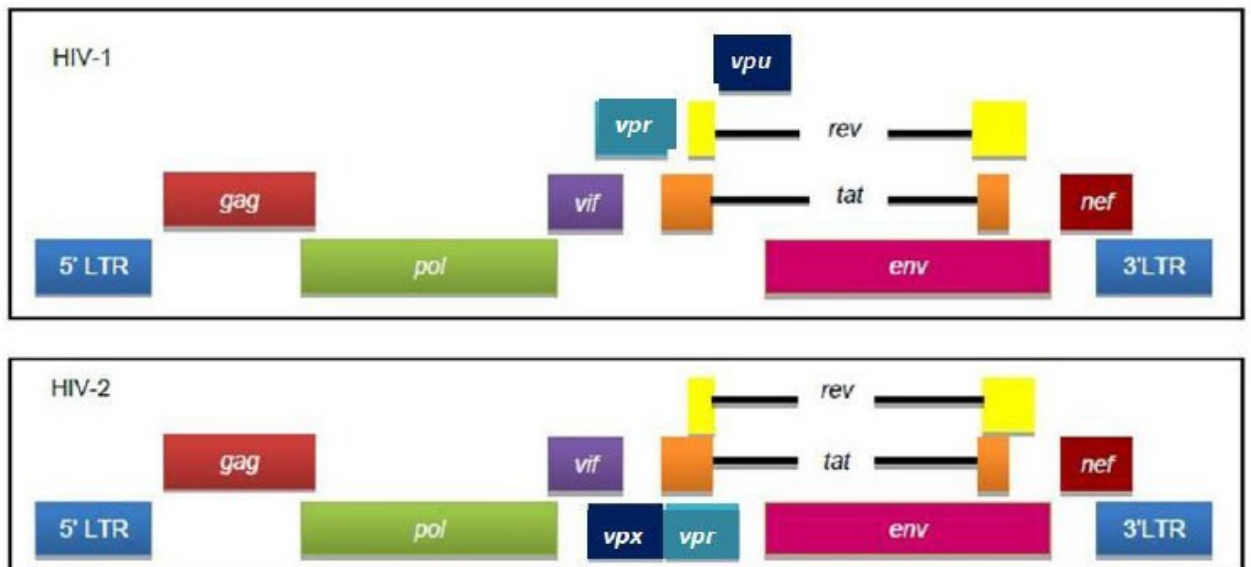


Figura 1.5 Representação esquemática do genoma proviral do HIV dos tipos 1 e 2. Pode-se observar a organização dos nove genes que compõem o genoma, além das sequências LTR nas suas extremidades. Fonte: Apostila de curso de inverno – 2015 “HIV: Aspectos virológicos e genética do hospedeiro”. Fiocruz

1.4 Epidemiologia molecular do HIV-1

O HIV-1 exibe uma extraordinária variabilidade genética e foi classificado, baseado em análises filogenéticas, em quatro grupos denominados M, N, O e P. Enquanto os grupos N, O e P estão principalmente restritos a África Central, o grupo M conseguiu se disseminar no mundo todo. Também com base em relações filogenéticas, o grupo M é dividido em nove subtipos (A, B, C, D, F, G, H, J e K), vários sub-subtipos (F1-F2, A1-A5), e diversas formas recombinantes únicas (URFs) e formas recombinantes circulantes (CRFs).

Cada variante tem uma prevalência global e uma distribuição geográfica diferente (Figura 1.6) [11]. O subtipo C representa aproximadamente metade (48%) de todas as infecções causadas pelo HIV-1 no mundo, seguido pelos subtipos A (12%), B (11%), G (5%) e D (2%). O subtipo C é a variante dominante na África Austrália, em alguns países da África Oriental e na Índia. O subtipo A é encontrado principalmente na África Central e Oriental, Europa Oriental e Ásia Central. O subtipo B é a forma genética mais disseminada no mundo, sendo a mais prevalente nas Américas, na Europa Ocidental e Central, na Austrália e em alguns países da Ásia. O subtipo G está concentrado na África Ocidental e Central e o subtipo D está presente principalmente na África Oriental e Central. Os subtipos F, H, J e K juntos causam menos de 1% de infecções em todo o mundo e se concentram principalmente na África Central, com exceção do subtipo F1 que circula também no Brasil e na Romênia.

Aproximadamente 20% das infecções do HIV-1 no mundo são causadas por recombinantes inter-subtipo, incluindo URFs e CRFs. A CRF02_AG é a quarta variante mais prevalente globalmente (8%) e circula principalmente na África Ocidental, África Central, África do Norte e Oriente Médio. A CRF01_AE é a quinta variante mais prevalente no mundo (5%) e é encontrada principalmente no Sul, Sudeste e Leste da Ásia. Outros CRFs e URFs estão principalmente distribuídos na Ásia Oriental (44%), África Central (32%), África do Norte e Oriente Médio (22%), América Latina (22%), África Ocidental (14%), e África Oriental (11%).

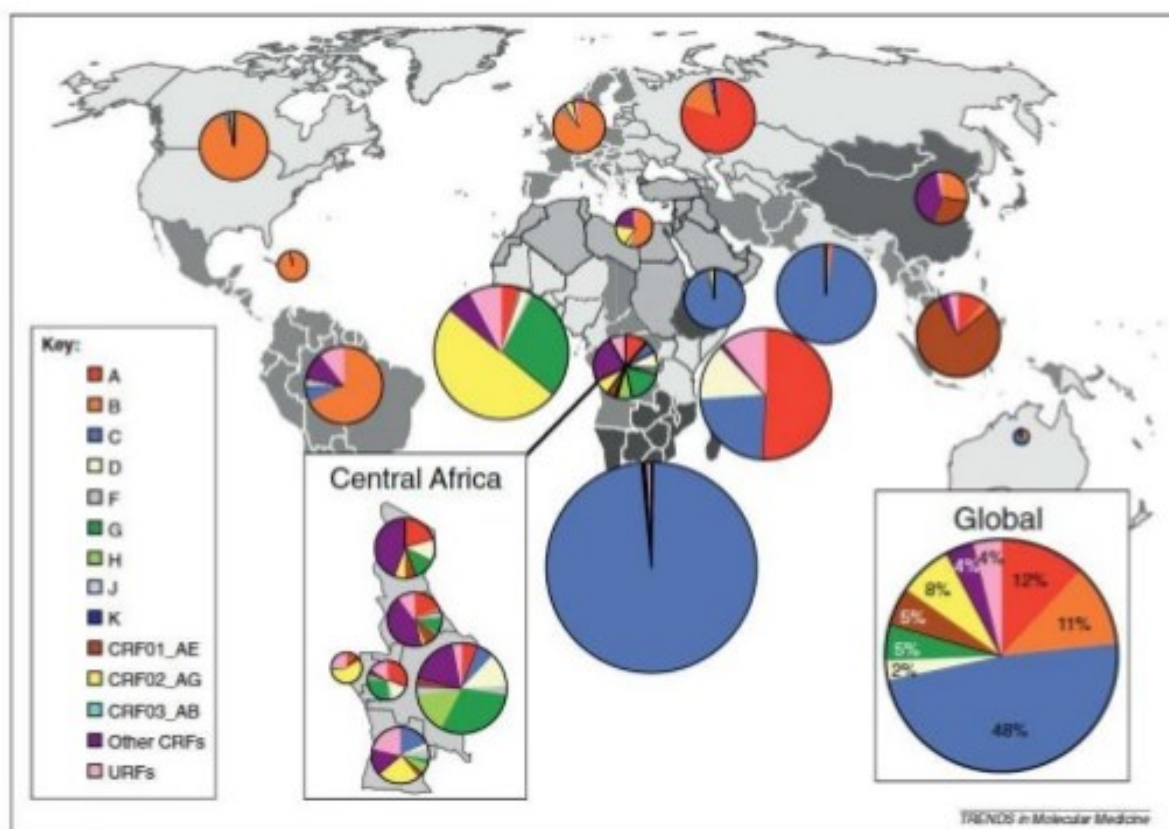


Figura 1.6 Distribuição geográfica e prevalência global dos subtipos do HIV-1 grupo M e formas recombinantes. Fonte: Hemelaar et al., 2011.

1.5 Epidemiologia molecular do HIV-1 no Brasil

No Brasil, a epidemia de aids é impulsionada principalmente pelo HIV-1 subtipo B, seguido pelos subtipos F1, C e formas recombinantes entre esses subtipos, embora a prevalência relativa das diferentes variantes genéticas varie muito entre as regiões brasileiras (Figura 1.7). Nas regiões Sudeste [12]–[17], Centro-Oeste [18]–[22], Norte [23]–[26] e Nordeste [27]–[30] a epidemia de HIV é dominada pelo subtipo B (responsável por 70-90% das infecções) seguido pelo subtipo F1 e recombinantes BF1 (responsáveis por 10-20% das infecções). Na região Sul o cenário epidemiológico é bastante diferente do restante do país devido a uma elevada prevalência do subtipo C nos estados do Paraná (20-30%), Rio Grande do Sul (30-55%) e Santa Catarina (50-80%) [31]–[37]. Estudos recentes documentaram um aumento na prevalência do HIV-1 subtipo C entre indivíduos de diferentes estados do Sudeste, Centro-oeste e Norte, apoiando uma propagação desta linhagem para o norte do Brasil [35].

Atualmente, grande parte das linhagens virais do subtipo F1 que circulam no Brasil fazem parte das diversas formas recombinantes BF1 (URFs e CRFs), sendo poucos os genomas completos “puros” deste subtipo descritos. Entre os CRFs_BF descritos no país destacam-se os CRF28_BF, CRF29_BF e CRF46_BF descritos no estado de São Paulo [38], [39], [40], os CRF39_BF e CRF40_BF descritos no estado do Rio de Janeiro [41], os CRF70_BF e CRF71_BF descritos no estado de Pernambuco [42], e o CRF72_BF descrito no estado de Minas Gerais [43]. Diversas variantes URFs_BC foram detectadas na região Sul assim como um único CRF_BC, denominado CRF31_BC [44], o qual é responsável por aproximadamente 10% das infecções no Rio Grande do Sul [44].

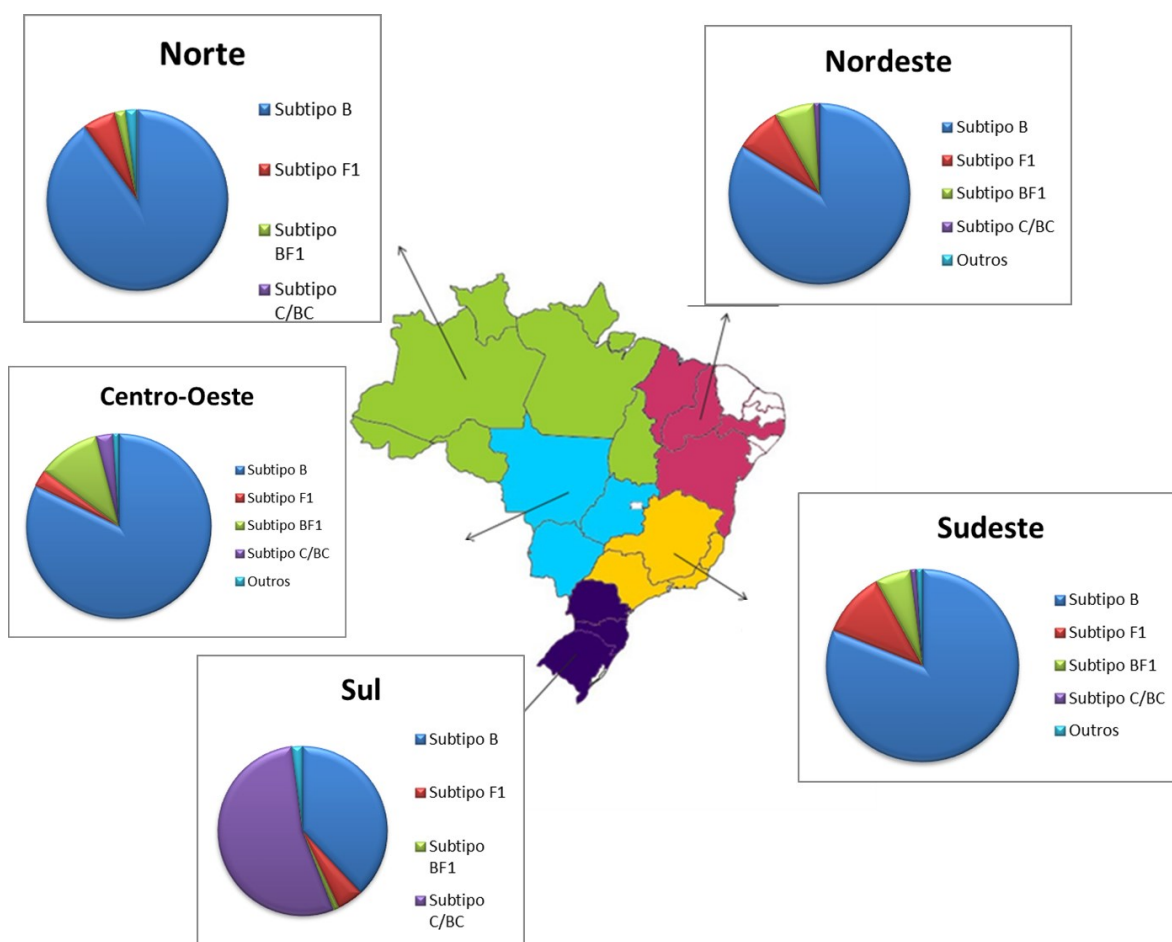


Figura 1.7 Distribuição dos subtipos de HIV-1 e formas recombinantes por região do Brasil. B/F (URFs e CRFs). Fonte: [12]–[35]

1.6 Origem e disseminação da epidemia de HIV-1 subtipo B nas Américas

A alta taxa de mutação e a extrema diversidade genética acumulada no genoma do HIV são um obstáculo para o desenvolvimento de vacinas e estratégias terapêuticas eficientes, ao mesmo tempo possibilitam a reconstrução da origem e das rotas de disseminação geográfica do vírus [45] [46].

A disseminação global do subtipo B do HIV-1 grupo M foi provavelmente iniciada pela introdução desta variante a partir da República Democrática do Congo (RDC) no Haiti em torno dos anos 1960 [47], [48] (Figura 1.8). No final dos anos 60, uma variante do subtipo B foi propagada do Haiti para os EUA e disseminada com grande sucesso dentro deste país e posteriormente para outros países em todo o mundo, levando ao estabelecimento de uma linhagem globalmente distribuída conhecida como variante pandêmica ($B_{\text{PANDEMICO}}$) [47], [48]. Outras variantes do subtipo B permaneceram restritas à região do Caribe e foram nomeadas como variantes não-pandêmicas ou caribenhas (B_{CAR}) [47], [48].

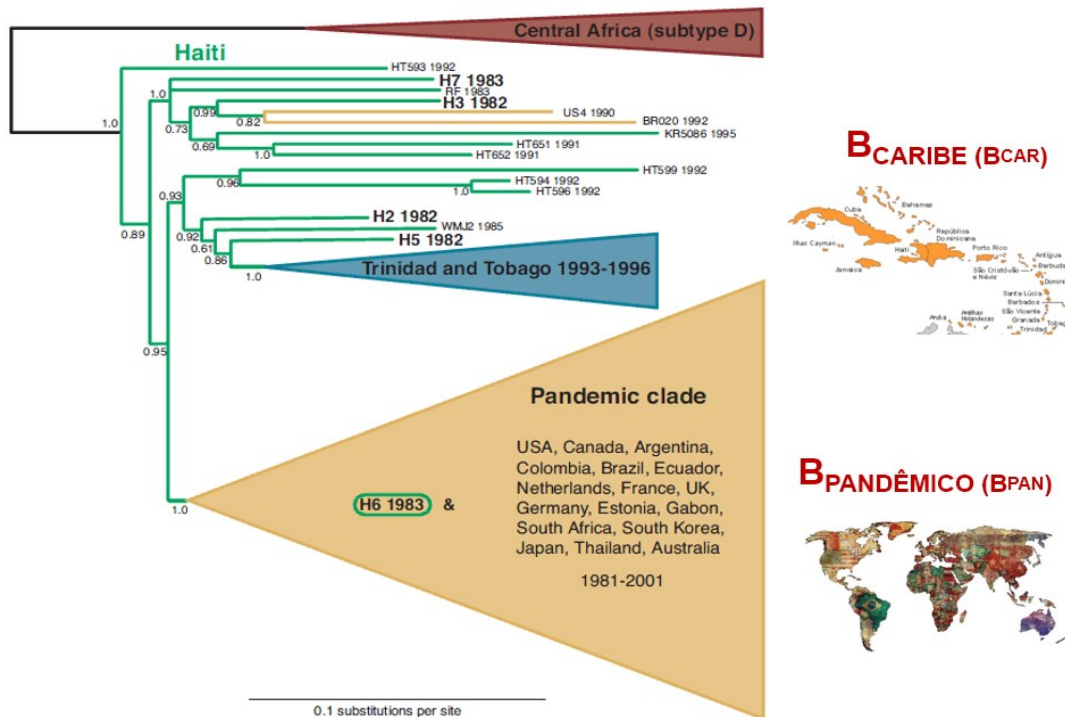


Figura 1.8 Árvore que resume os resultados das análises bayesianas de genes env completos para maximizar as hipóteses de origem e disseminação do HIV-1 subtipo B nas Américas e variantes do subtipo B, Bcaribe e Bpandemico e suas prevalências no cenário global. Fonte: Gilbert et al, 2007.

Estudos recentes conduzidos pelo nosso laboratório demonstraram que as variantes B_{CAR} foram disseminadas desde a ilha Hispaniola (compartilhada pelos países Haiti e República Dominicana) em várias ocasiões independentes desde o início dos anos 70, atingindo alguns países vizinhos do Caribe assim como diversos países das Américas [49] [50]. Diferente da variante $B_{PANDEMICO}$, as variantes B_{CAR} não foram capazes de se disseminar em grande escala e representam uma fração minoritária ($\leq 5\%$) das infecções pelo subtipo B na maioria dos países analisados. As únicas exceções foram alguns países localizados no Caribe (Haiti, República Dominicana, Jamaica, Bahamas e nas Antilhas Menores) e no extremo norte da América do Sul (Guiana Francesa e Suriname) onde as variantes B_{CAR} representam $>40\%$ das infecções pelo subtipo B (Figuras 1.9 e 1.10).

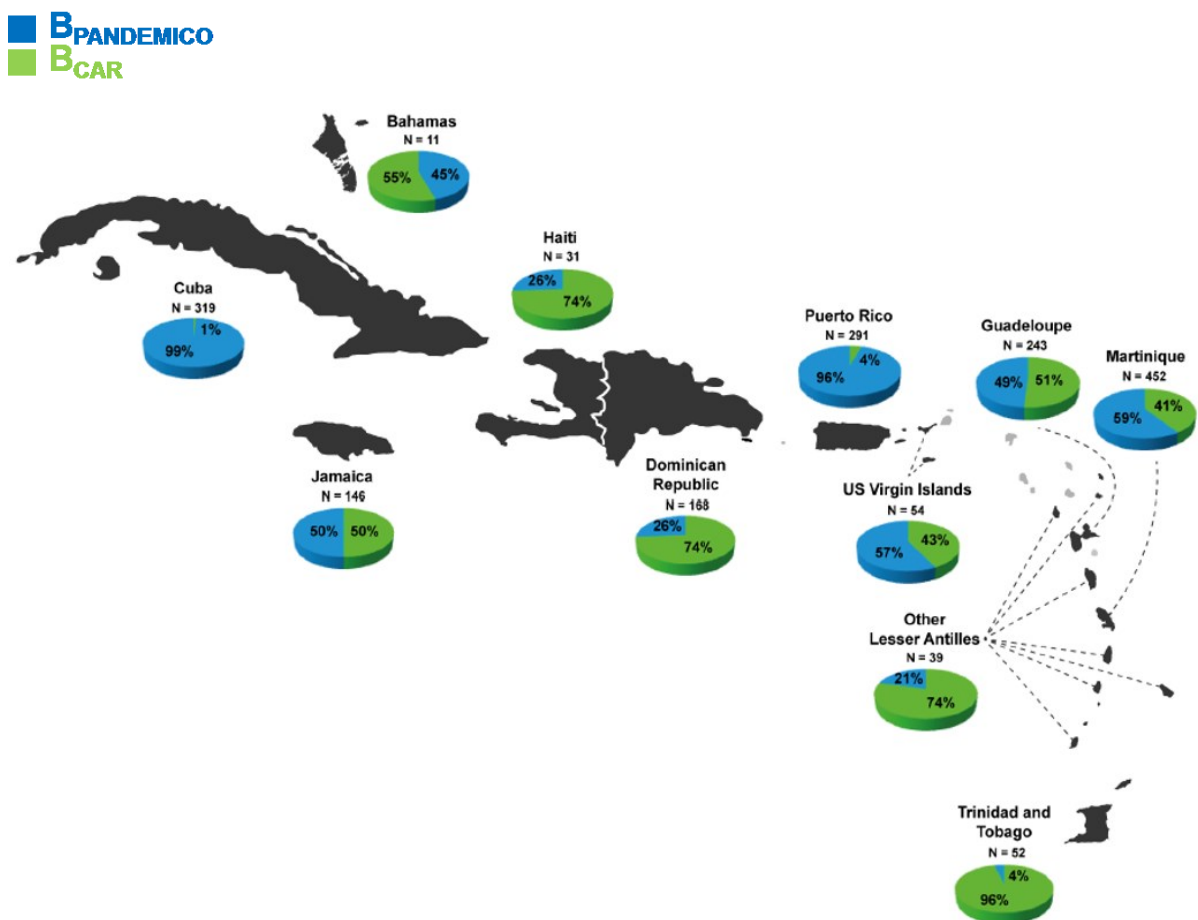


Figura 1.9 Prevalência dos clados $B_{PANDEMICO}$ e B_{CAR} nas infecções pelo HIV-1 subtipo B no Caribe. Fonte: Cabello et al, 2014.

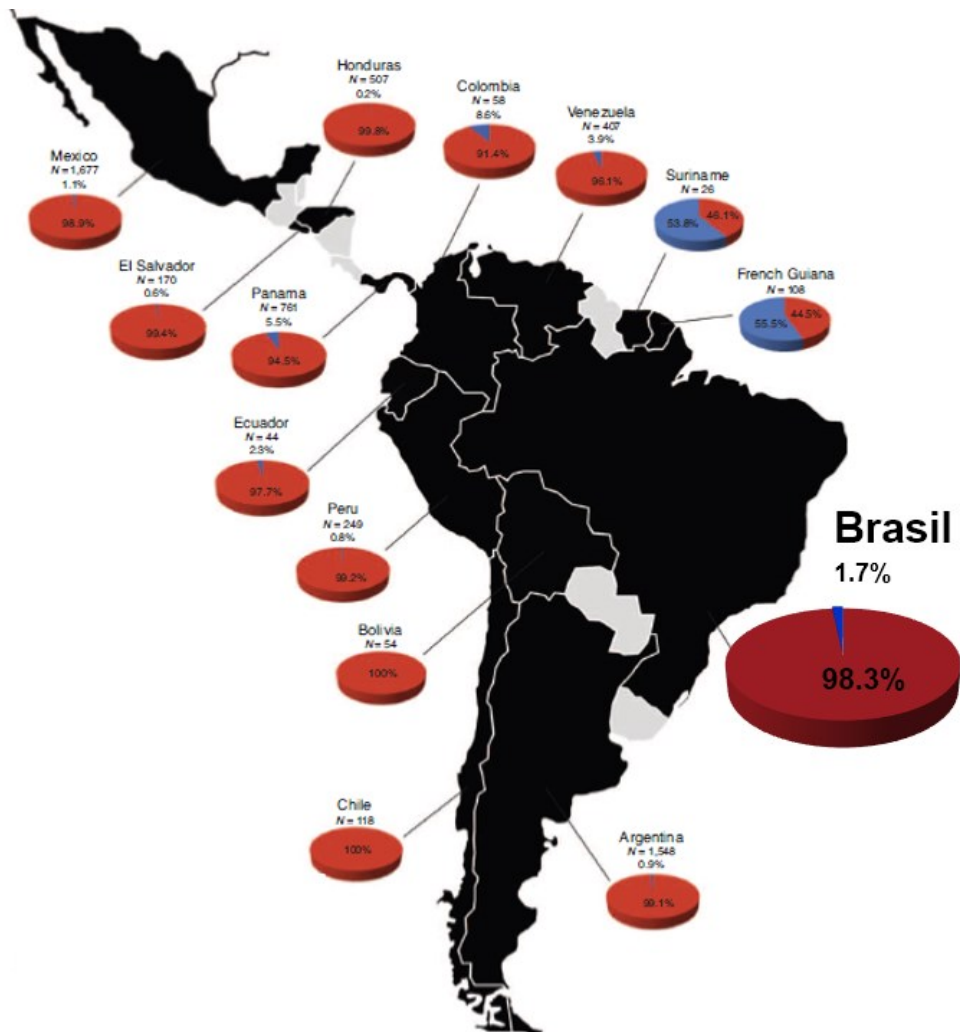


Figura 1.10 Prevalência dos clados B_{PANDEMICO} e B_{CAR} nas infecções pelo HIV-1 subtipo B na América Latina. Fonte: Cabello et al, 2015.

1.7 Origem e disseminação da epidemia de HIV-1 subtipo B no Brasil

Estudos desenvolvidos pelo nosso laboratório, com base em sequências isoladas principalmente nos estados do Rio de Janeiro e São Paulo, sugerem que o subtipo B teria sido o primeiro subtipo de HIV-1 a ser introduzido no Brasil provavelmente entre os anos de 1965 e 1970 [51][52]. Após sua introdução, o subtipo B teria se expandido de forma exponencial na população brasileira por um período de aproximadamente 20 anos, antes de se estabilizar. A taxa média de crescimento da epidemia do subtipo B durante a fase exponencial foi estimada em $0,5 \text{ anos}^{-1}$, o que corresponde a um período médio de duplicação da epidemia de um ano.

Estudos mais recentes conduzidos pelo nosso grupo demonstraram a existência de múltiplas introduções tanto da variante $B_{\text{PANDEMICO}}$ como das variantes B_{CAR} no Brasil. Um dos estudos aponta que as linhagens B_{CAR} foram disseminadas desde a ilha Hispaniola e desde Trinidad e Tobago para o Brasil em múltiplas ocasiões [50]. Algumas dessas migrações virais, ocorridas entre o início dos anos 1970 e início dos anos 1980, semearam epidemias secundárias de pequeno tamanho que resultaram na origem de pelo menos três subclados B_{CAR} no Brasil denominados $B_{\text{CAR-BR-I}}$, $B_{\text{CAR-BR-II}}$ e $B_{\text{CAR-BR-III}}$. Outro estudo também apontam para a existência de múltiplas introduções da variante $B_{\text{PANDEMICO}}$ no Brasil [53]. Quatro destas introduções, ocorridas entre o final dos anos 1960 e início dos anos 1980, originaram epidemias de grande tamanho que resultaram nos subclados pandêmicos brasileiros $B_{\text{PANDEMICO-BR-I}}$, $B_{\text{PANDEMICO-BR-II}}$ e $B_{\text{PANDEMICO-BR-III}}$ e $B_{\text{PANDEMICO-BR-IV}}$. Embora a origem dos clados $B_{\text{PANDEMICO-BR}}$ e $B_{\text{CAR-BR}}$ tenha sido estimada na mesma época, a sua dinâmica de disseminação subsequente foi muito diferente. Enquanto as três linhagens $B_{\text{CAR-BR}}$ identificadas compreendem <2% das infecções pelo subtipo B no Brasil, as quatro linhagens $B_{\text{PANDEMICO-BR}}$ correspondem a aproximadamente 30% das infecções por este subtipo no Brasil.

Estas estimativas, no entanto, estão baseadas em conjuntos de dados unicamente representativos das regiões Sudeste, Sul, e Centro-Oeste já que existiam muito poucas sequências de HIV-1 disponíveis das regiões Norte e Nordeste do Brasil. Diversos estudos voltados para o conhecimento da epidemiologia molecular do HIV-1 foram realizados nos últimos dois anos em vários estados brasileiros das regiões Norte (Acre, Amapá, Amazonas, Para, Rondônia e Roraima) [23]–[26] e Nordeste (Maranhão, Pernambuco e Piauí) [28]–[30]. Estes estudos apontam para uma predominância do subtipo B em todos os estados analisados, embora sua prevalência varie de forma importante entre os diferentes estados, desde 63% em Rondônia até 92% no Acre. Estes resultados confirmam que o padrão epidemiológico molecular da epidemia de HIV-1 pode variar entre diferentes estados brasileiros, refletindo uma epidemia complexa com diferentes fluxos migratórios e múltiplas introduções virais independentes. Desta forma, se faz necessário determinar a prevalência das linhagens $B_{\text{PANDEMICO}}$ e B_{CAR} nas diferentes regiões do Brasil no sentido de compreender a real disseminação das diferentes variantes do subtipo B no país.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Caracterizar a dinâmica de disseminação espaço-temporal das variantes B_{CAR} do HIV-1 subtipo B no Brasil, no sentido de estimar a prevalência e identificar a origem e rotas de disseminação destas variantes no país.

2.2 Objetivos Específicos

1. Estimar a frequência das variantes $B_{PANDEMICO}$ e B_{CAR} em indivíduos infectados pelo subtipo B residentes em distintos estados do Brasil.
2. Estimar a frequência das variantes $B_{PANDEMICO}$ e B_{CAR} em indivíduos infectados pelo subtipo B residentes nos países que fazem fronteira com o extremo norte do Brasil.
3. Reconstruir a dinâmica de disseminação espacial e temporal das variantes B_{CAR} que circulam em diferentes estados do Brasil.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Sequências de HIV-1 subtipo B provenientes do Brasil.

Um total de 2.682 sequências do gene *pol* do HIV-1 subtipo B provenientes das regiões Sudeste ($n = 1.512$), Norte ($n = 457$), Nordeste ($n = 253$), Centro-Oeste ($n = 252$) e Sul ($n = 208$) do Brasil foram utilizadas no presente trabalho (Tabela 3.1).

Tabela 3.1 Sequências do gene *pol* do HIV-1 subtipo B provenientes do Brasil.

Região	Estado	Código	Sequências (Los Alamos)	Sequências (Novas)	Período
Sul	Paraná	PR	50	-	2001-2009
	Rio Grande do Sul	RS	138	-	1998-2009
	Santa Catarina	SC	20	-	2005-2009
Sudeste	Espírito Santo	ES	59	-	1997
	Minas Gerais	MG	69	-	2002-2010
	Rio de Janeiro	RJ	179	-	2002-2010
	São Paulo	SP	1,205	-	1998-2010
Centro-Oeste	Goiás	GO	150	-	2003-2010
	Mato Grosso	MT	64	-	2008-2009
	Mato Grosso do Sul	MS	38	-	2008-2010
Nordeste	Bahia	BA	14	-	2009
	Maranhão	MA	70	-	2012
	Pernambuco	PE	97	-	2009-2010
	Piauí	PI	72	-	2011-2012
Norte	Acre	AC	-	11	2010-2011
	Amapá	AP	-	73	2013
	Amazonas	AM	104	-	2009-2011
	Pará	PA	89	-	2010-2011
	Tocantins	TO	46	-	2008
	Rondônia	RO	-	32	2010-2011
	Roraima	RR	-	102	2010-2013

As sequências utilizadas compreendem um fragmento de aproximadamente 1.000 nucleotídeos correspondente a PRO e parte da TR (posições 2253-3272 referente ao HXB2). Todas as sequências das regiões Sudeste, Sul, Centro-Oeste e Nordeste assim como uma pequena fração ($n = 68$) das sequências da região Norte foram obtidas a partir do banco de dados de HIV de Los Alamos (<http://www.hiv.lanl.gov>). As demais sequências da região Norte ($n = 389$) foram geradas a partir de três estudos conduzidos no Laboratório de AIDS e Imunologia Molecular da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) do Rio de Janeiro em parceria com: 1) o Laboratório Central do Estado de Amapá (LACEN-AP); 2) a Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado de Manaus, e 3) o Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD) da FIOCRUZ de Manaus.

No primeiro estudo, publicado na revista *AIDS Research and Human Retroviruses* em abril de 2016 [25], foram identificadas 73 sequências HIV-1 subtipo B a partir de uma população de indivíduos virgens de terapia antirretroviral provenientes do estado do Amapá que foram atendidos no Serviço de Assistência Especializada do Amapá (SAE-AP) entre 2013 e 2014. As amostras de sangue foram coletadas no SAE-AP, processadas no LACEN-AP e posteriormente encaminhadas para o LABAIDS para amplificação e sequenciamento do DNA viral. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Oswaldo Cruz (número CAAE 35785214.5.1001.5248).

No segundo estudo, publicado na revista *AIDS Research and Human Retroviruses* em setembro de 2016 [26], foram identificadas 245 sequências HIV-1 subtipo B a partir de uma população de indivíduos em tratamento antirretroviral que faziam acompanhamento nos ambulatórios do Sistema Único de Saúde dos estados do Acre, Amazonas, Pará, Rondônia e Roraima entre 2010 e 2011. As amostras de sangue dos pacientes foram enviadas para genotipagem na Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (Manaus) e no LABAIDS, no âmbito da Rede Nacional de Genotipagem do HIV do Ministério da Saúde do Brasil (RENAGENO). Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (Number CAAE: 09121512.8.0000.0005).

No terceiro estudo, submetido para publicação em setembro de 2016, foram identificadas 71 sequências HIV-1 subtipo B a partir de uma população de indivíduos virgens de terapia antirretroviral e em tratamento antirretroviral, atendidos pelo Laboratório Central do Estado de Roraima (LACEN-RR) entre 2012 e 2013. As amostras de sangue foram processadas no LACEN-RR e posteriormente encaminhadas para o ILMD (FIOCRUZ-Manaus) para amplificação e sequenciamento do DNA viral. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Roraima (número CAAE 15629013.8.0000.5302).

3.2 Sequências de HIV-1 subtipo B provenientes do Suriname, Guiana Francesa e Guiana.

No sentido de reconstruir com maior precisão as rotas de disseminação das variantes B_{CAR} no extremo norte da América do Sul, foram obtidas um total de 411 sequências do gene *pol* do HIV-1 subtipo B provenientes da Guiana Francesa, Suriname e Guiana a partir do banco de dados de HIV de Los Alamos (Tabela 3.2). As sequências da Guiana Francesa foram obtidas a partir de indivíduos virgens de terapia antirretroviral atendidos em dois hospitais localizados nas cidades de Caiena e Saint-Laurent-du-Maroni entre 2006 e 2012 [54]. As sequências do Suriname foram obtidas a partir de indivíduos virgens de terapia antirretroviral atendidos em diversos hospitais e ambulatórios da capital Paramaribo e arredores durante 2009 [55]. Sequências B_{CAR} da Guiana classificadas previamente [50] foram obtidas durante o período 2000-2002 a partir de indivíduos virgens de terapia antirretroviral[56].

Tabela 3.2. Sequências do gene *pol* do HIV-1 subtipo B provenientes da Guiana Francesa, Suriname e Guiana.

País	N	Período
Guiana Francesa	304	2006-2012
Suriname	100	2009
Guiana*	7	2000-2013

*Sequências B_{CAR} identificadas por Cabello *et al* (2015).

3.3 Sequências referência dos clados B_{CAR} e B_{PANDEMICO} do HIV-1 subtipo B.

Foram selecionadas 500 sequências de referência do gene *pol* do HIV-1 subtipo B isoladas no Caribe ($n = 200$), EUA ($n = 150$) e França ($n = 150$) representativas dos clados B_{CAR} (Caribe) e B_{PANDEMICO} (EUA e França) anteriormente descritas [49] e que se encontram disponíveis na base de dados de HIV de Los Alamos, devidamente discriminadas na Tabela 3.3. A maior parte das sequências B_{CAR} é proveniente da ilha Hispaniola, que se divide entre os países de Haiti e República Dominicana e foi apontada como a porta de entrada e epicentro da disseminação inicial do HIV-1 subtipo B no continente. Outras ilhas caribenhas representadas são Jamaica, Trinidad e Tobago e várias outras Antilhas menores onde as variantes B_{CAR} atingem uma alta prevalência ($\geq 50\%$) [49]. As sequências correspondentes ao clado B_{PANDEMICO} são provenientes dos EUA, apontado como principal epicentro da disseminação global deste clado [51], e da França, que foi um dos primeiros países da Europa Ocidental a descrever a disseminação do HIV-1 subtipo B na sua população.

Tabela 3.3. Sequências de referência dos clados B_{CAR} e B_{PANDEMICO} do HIV-1 subtipo B provenientes do Caribe, EUA e França.

Clado	País	N	Período
B _{CAR}	República Dominicana	61	2005-2010
	Haiti	8	2004-2005
	Jamaica	62	2005-2010
	Trinidad and Tobago	48	2000-2003
	Outros Países do Caribe*	21	2000-2004
B _{PANDEMICO}	EUA	165	1997-2009
	França	135	1985-2008

*Antiga e Barbuda ($n = 4$), Bahamas ($n = 5$), Dominica ($n = 1$), Granada ($n = 2$), Montserrat ($n = 1$), Santa Lúcia ($n = 4$) e São Vicente e Granadinas ($n = 4$).

3.4 Confirmação do subtipo viral.

O subtipo de todas as sequências utilizadas no presente estudo foi confirmado o através da ferramenta “Rega HIV subtyping tool” (<http://www.bioafrica.net/rega-genotype/html/subtypinghiv.html>) a fim de utilizar somente sequências confirmadas como subtipo B [57].

3.5 Classificação das sequências de HIV-1 subtipo B nos clados B_{CAR} e $B_{PANDEMICO}$.

As sequências de HIV-1 subtipo B *pol* do Brasil foram subdivididas em três subsets contendo sequências das regiões: 1) Sudeste (São Paulo, $n = 1.205$), 2) Sul, Sudeste (menos São Paulo) e Centro-Oeste ($n = 767$), e 3) Norte e Nordeste ($n = 710$). Um quarto subset foi construído com as sequências HIV-1 subtipo B *pol* provenientes da Guiana Francesa e do Suriname. Cada um destes subsets foi alinhado com as 500 sequências do HIV-1 subtipo B representativas dos clados B_{CAR} e $B_{PANDEMICO}$ descritas anteriormente e após retirar as posições de resistências, submetidas a análises filogenéticas por Máxima Verossimilhança (MV) para sua classificação nos respectivos clados.

As árvores de MV foram reconstruídas com o programa PhyML [58] através do servidor web on-line [59]. Foi usado o modelo de substituição nucleotídica mais apropriado para cada subset, selecionado através do programa jModeltest [60], e o algoritmo de busca heurística denominado “SPR branch-swapping”. A confiabilidade da topologia foi avaliada pelo método de “approximate likelihood-ratio test (*aLRT*)” [61] com base no procedimento de Shimodaira-Hasegawa. As arvores foram visualizadas utilizando o programa FigTree v1.4.2 [62]. Sequências que agrupavam com alto suporte (*aLRT* ≥ 0.85) dentro do clado $B_{PANDEMICO}$ foram classificadas como pertencentes a variante pandêmica do subtipo B. Sequências que na arvore filogenética se localizavam junto com as sequencias referencia B_{CAR} , fora do clado $B_{PANDEMICO}$ e mais perto da base da arvore, foram classificadas como variantes não-pandêmicas do subtipo B.

3.6 Análises evolutivas e filogeográficas.

Análises evolutivas e filogeográficas foram realizadas no sentido de avaliar o tempo e número de introduções assim como as possíveis rotas de entrada e disseminação das variantes B_{CAR} no Brasil. Numa primeira análise, todas as sequências de HIV-1 subtipo B do Brasil classificadas como B_{CAR} numa etapa previa e com informação disponível de ano de isolamento foram combinadas com sequências B_{CAR} provenientes da ilha Hispaniola, Jamaica e Trinidad e Tobago e sequências do subtipo D da RDC como grupo externo. As três ilhas caribenhas foram selecionadas por que: 1) são as únicas que apresentam um número de sequências B_{CAR} no fragmento PRO/RT disponíveis relativamente grandes ($n > 10$); 2) compreendem a maioria dos indivíduos infectados pelas variantes B_{CAR} no Caribe; e 3) foram apontadas como os principais centros de disseminação destas linhagens no continente [49] [50]. Numa segunda etapa, as sequências dos principais clados B_{CAR} identificados no Brasil, Guiana Francesa e Suriname foram combinadas com sequências B_{CAR} provenientes da ilha Hispaniola, Jamaica, Trinidad e Tobago e Guiana assim como com sequências do subtipo D como grupo externo.

A reconstrução da história evolutiva e filogeográfica foi realizada simultaneamente usando o método de Cadeia de Markov Monte Carlo (MCMC) implementado no programa *BEAST v1.8.3* [63]. Para estas análises utilizamos o modelo de substituição nucleotídica GTR+I+ Γ_4 , o modelo de coalescência não-paramétrico “*Bayesian Skyline plot*” [64], o modelo de relógio molecular relaxado [65] e o modelo discreto e reversível de dispersão geográfica entre as localidades [66]. As vias de migração mais relevantes foram estimadas usando o método “*Bayesian stochastic search variable selection*” (BSSVS). Os “*priors*” utilizados para os diferentes parâmetros são mostrados na Tabela 3.4. Para cada análise, três cadeias Bayesianas de MCMC foram processadas por 5×10^8 gerações e posteriormente combinadas usando o programa *Logcombiner* do pacote *BEAST v1.8.3*. A convergência dos parâmetros nas análises Bayesianas foi avaliada através do cálculo do tamanho amostral efetivo utilizando o programa *Tracer v1.5* [67], após excluir os 10% iniciais para cada corrida. A árvore Bayesiana de

máxima credibilidade foi gerada a partir da distribuição posterior de árvores (após excluir os 10% iniciais) com o programa *TreeAnnotator* do pacote *BEAST v1.8.3* e visualizada com o programa *Figtree v1.4.2*. Os eventos migratórios e as taxas de fator Bayes (BF) dos mesmos foram visualizados usando o aplicativo *SPREAD* [68].

Tabela 3.4. “Priors” utilizados nas análises Bayesianas para cada um dos parâmetros.

Parâmetro	Prior
ac/ag/at/cg/gt	Gamma [0.05, 10], initial=1
frequências	Uniform [0, 1], initial=0.25
ulpha	Exponential [0.5]], initial=0.5
pInv	Uniform[0, 1], initial=0.5
ucl.d.stdev	Exponential [0.333333], initial=0.333333
ucl.d.mean	Uniform [0.002, 0.003], initial=0.0025*
location.clock.rate	Approx. Reference Prior, initial=1
treeModel.rootheight	Using Tree Prior in [30, infinit]
skyline.popsiz	Uniform [0, 1E100], initial=300
meanRate	Indirectly Specified Through Other Parameter
covariance	Indirectly Specified Through Other Parameter
coefficientOfVariation	Indirectly Specified Through Other Parameter
location.frequencies	Uniform [0, 1], initial =0.25
location.rates	Gamma [1, 1], initial=1

4 RESULTADOS

4.1 Frequência das variantes $B_{\text{PANDEMICO}}$ e B_{CAR} nos distintos estados do Brasil.

As sequências HIV-1 subtipo B do Brasil foram divididas em três subsets: o primeiro contendo sequências do estado de São Paulo ($n = 1.205$), o segundo das regiões Sul, Sudeste (exceto São Paulo) e Centro-Oeste ($n = 767$), e o terceiro das regiões Norte e Nordeste ($n = 710$). Cada subset foi combinado com sequências de referencia dos clados $B_{\text{PANDEMICO}}$ ($n = 300$) e B_{CAR} ($n = 200$). As árvores de MV permitiram comprovar que, como esperado, todas as sequências de referencia do clado $B_{\text{PANDEMICO}}$ formavam um grupo monofilético com alto suporte estatístico ($aLRT \geq 0.90$) (Figura 4.1).

Do total de 2.682 sequencias HIV-1 subtipo B do Brasil analisadas no presente trabalho, 2.580 (96%) foram classificadas dentro do clado $B_{\text{PANDEMICO}}$ e as 102 restantes (4%) como B_{CAR} . Foi observada, no entanto, uma grande variação na frequência relativa das variantes $B_{\text{PANDEMICO}}$ e B_{CAR} entre as diferentes regiões assim como também entre diferentes estados de uma mesma região (Figura 4.2). A maior prevalência das variantes B_{CAR} foi detectada na região Norte (17%), seguida pelas regiões Nordeste (4%), Sudeste (1%), Centro-Oeste (1%) e Sul (1%). Na região Norte se observa também a maior diferença na prevalência das variantes B_{CAR} por estado, variando entre 2% (Tocantins) e 41% (Roraima). Quando analisado por estado, as maiores prevalências de variantes B_{CAR} foram detectadas em Roraima (41%), Amazonas (14%), Maranhão (14%) e Acre (9%). Em nove estados, a prevalência de sequências B_{CAR} foi entre 1-5%, enquanto que nos outros sete estados foi detectada uma prevalência $<1\%$.

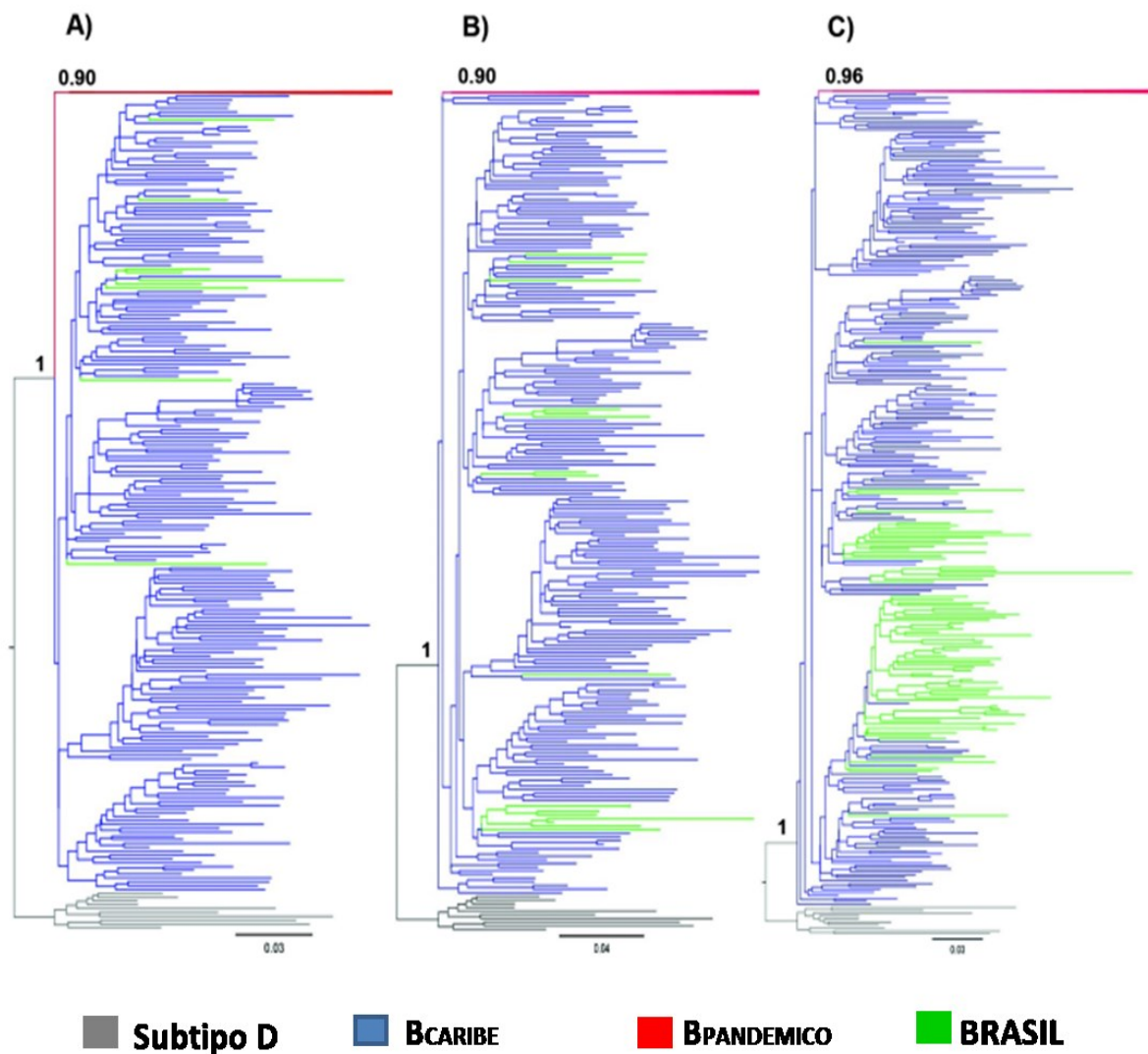


Figura 4.1. Árvores filogenéticas de MV das sequências HIV-1 subtipo B provenientes do estado de São Paulo (A), das regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste (B) e das regiões Norte e Nordeste (C) do Brasil. As sequências brasileiras foram analisadas conjuntamente com sequências referências dos clados B_{PANDEMICO} e B_{CARIBE}. Os ramos são coloridos de acordo com a legenda. O clado B_{PANDEMICO} foi colapsado para melhor clareza visual. Os valores de suporte estão indicados nos nós principais. As árvores foram enraizadas usando sequências de referência HIV-1 subtipo D.

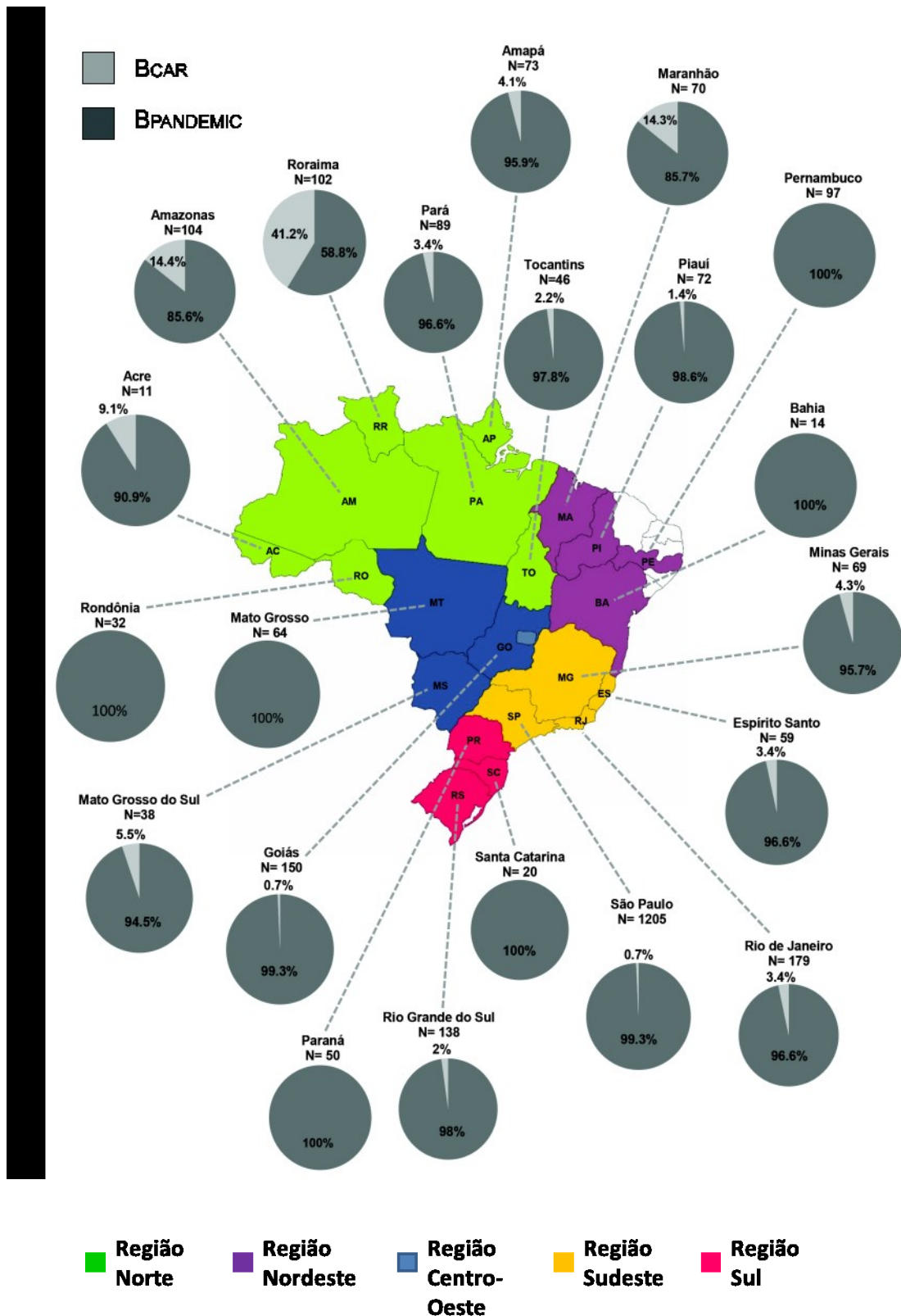


Figura 4.2. Proporção estimada dos clados BPANDEMICO e BCAR nos diferentes estados do Brasil de acordo com as análises filogenéticas de MV. O número total de sequências proveniente de cada estado (N) está indicado no topo de cada gráfico. Os estados incluídos no estudo encontram-se coloridos e com sua respectiva sigla, de acordo com a região de origem como indicado na legenda. Em branco estão indicados os cinco estados sem sequências HIV-1 subtipo B disponíveis para análise (Alagoas, Ceará, Paraíba, Rio Grande do Norte e Sergipe).

4.2 Dinâmica de disseminação espaço-temporal das variantes B_{CAR} do HIV-1 do Caribe para o Brasil.

Das 102 sequências do Brasil classificadas como B_{CAR}, 97 tinham data de amostragem conhecida e foram selecionadas para as próximas análises. As sequências B_{CAR} do Brasil foram classificadas em 15 locais geográficos discretos de acordo com o estado de origem e combinadas com sequências B_{CAR} do Caribe (Hispaniola, Jamaica e Trinidad e Tobago) previamente identificadas (Tabela 4.2). Foram também incluídas na análise sequências do HIV-1 subtipo D provenientes da RDC, que foi apontado como o local mais provável de origem do subtipo B introduzido nas Américas.

A reconstrução filogeográfica Bayesiana confirmou a localização da raiz do subtipo B nas Américas, na ilha da Hispaniola (República Dominicana/Haiti) (*Probabilidade Posterior de Localidade [PSP]* = 0,92) e estimou data de origem da epidemia no continente na década de 1960 (Figura 4.3 e Tabela 4.1), consistente com estudos anteriores [32],[33]. O subtipo B foi então disseminado desde a Hispaniola para outras ilhas do Caribe em torno do início da década de 1970, iniciando epidemias secundárias que resultaram na origem dos subclados B_{CAR-TT} e B_{CAR-JM} em Trinidad e Tobago e Jamaica, respectivamente, descritos anteriormente [32],[33] (Figura 4.3 e Tabela 4.2). A análise Bayesiana também revelou múltiplas introduções independentes das variantes B_{CAR} desde a Hispaniola ($n = 11$) e Trinidad e Tobago ($n = 3$) para o Brasil (Figuras 4.3 e 4.4). Das 14 introduções independentes de variantes B_{CAR} no Brasil identificadas, sete foram pela região Norte, quatro pela região Sudeste, uma pela região Nordeste, uma pela região Centro-Oeste e uma pela região Sul. Esta análise indicou uma disseminação direta de variantes B_{CAR} desde a ilha Hispaniola para estados brasileiros do Sul (Rio Grande do Sul), Sudeste (Rio de Janeiro e São Paulo), Centro-Oeste (Mato Grosso do Sul), Nordeste (Maranhão) e Norte (Acre, Roraima e Tocantins), bem como a disseminação de variantes B_{CAR} desde Trinidad e Tobago para Roraima e São Paulo. Os testes de BF para detecção das migrações mais significativas apoiam uma ligação epidemiológica entre a Hispaniola e alguns estados brasileiros (Acre, Tocantins e São Paulo), bem como entre Trinidad e Tobago e Roraima (Tabela 4.3).

Tabela 4.1. Sequências HIV-1 B_{CAR} *pol* do Brasil e do Caribe utilizadas nas análises filogeográficas Bayesianas.

País	Região	Estado	Localidade	<i>N</i>	Ano
Brasil	Norte	AC	AC	1	2010
		AM	AM	15	2009-2011
		AP	AP	3	2013
		PA	PA	3	2010
		RR	RR	42	2010-2013
		TO	TO	1	2008
	Nordeste	MA	MA	10	2012
		PI	PI	1	2011
	Centro-Oeste	GO	GO	1	2008
		MS	MS	2	2008-2010
	Sudeste	ES	ES	2	1997
		MG	MG	1	2009
		RJ	RJ	3	2004-2009
		SP	SP	9	1999-2008
	Sul	RS	RS	3	1998-2005
Republica Dominicana ^a	-	-	HISP	123	2003-2011
Haiti ^a	-	-	HISP	12	2004-2005
Jamaica ^a	-	-	JM	73	2005-2010
Trinidad e Tobago ^a	-	-	TT	50	2000-2003
RDC ^b	-	-	CD	10	1983-2007

^a Sequências B_{CAR} identificadas anteriormente [49]. ^b RDC: sequencias do subtipo D da Republica Democrática do Congo.

Tabela 4.2. Estimativas Bayesianas do T_{MRCA} dos principais clados B_{CAR} do Brasil e do Caribe.

Clado	T_{MRCA} (Este trabalho)	T_{MRCA} (Cabello et al, 2014)	T_{MRCA} (Gilbert et al, 2007)
Subtipo B	1969 (1964–1974)	1964 (1959–1969)	1966 (1962–1970)
B_{CAR-TT}	1973 (1970–1976)	1969 (1966–1973)	1973 (1970–1976)
B_{CAR-JM}	1974 (1970–1979)	1971 (1967–1975)	-
$B_{CAR-BR-I}$	1978 (1975–1981)	-	-
$B_{CAR-BR-II}$	1978 (1974–1982)	-	-
$B_{CAR-BR-III}$	1979 (1974–1983)	-	-
$B_{CAR-BR-IV}$	1982 (1977–1986)	-	-

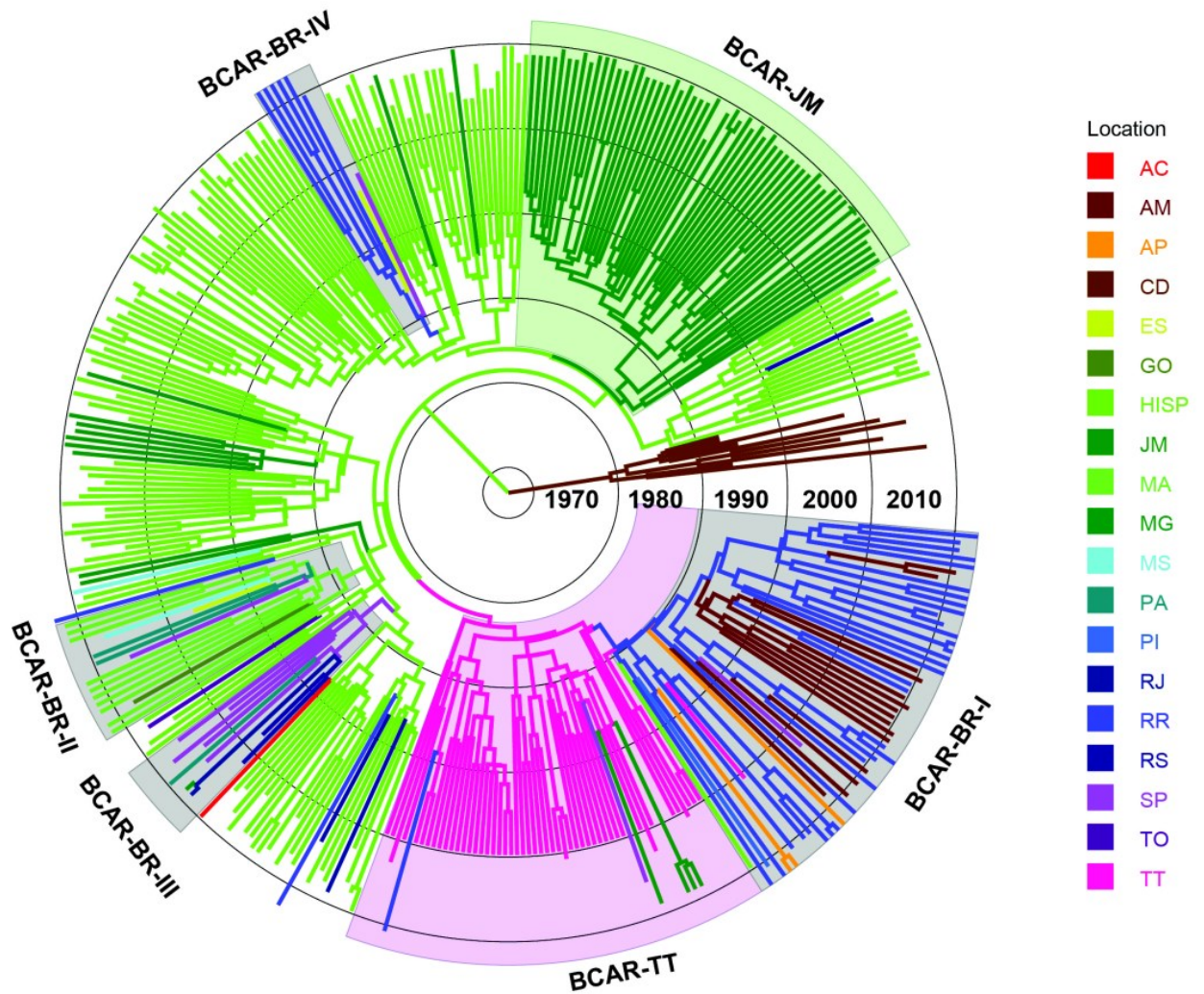


Figura 4.3 Árvore Bayesiana de máxima credibilidade de sequências *pol* de HIV-1 de linhagens B_{CAR} do Brasil ($n = 97$) e Caribe ($n = 258$) e sequências de referência do subtipo D ($n = 10$) da RDC. Os ramos estão coloridos de acordo com o estado de localização mais provável de seus nós descendentes, conforme indicado na legenda à direita. As caixas coloridas indicam as posições dos principais clados B_{CAR} detectados no Brasil, Jamaica e Trinidad e Tobago. Os comprimentos dos ramos estão representados em unidades de tempo (anos). A árvore foi enraizada automaticamente sob a suposição de um relógio molecular relaxado. AC: Acre; AM: Amazonas; AP: Amapá; CD: República Democrática do Congo; ES: Espírito Santo; GO: Goiás; HISP: Hispaniola; JM: Jamaica; MA: Maranhão; MG: Minas Gerais; MS: Mato Grosso do Sul; PA: Pará; PI: Piauí; RJ: Rio de Janeiro; RR: Roraima; RS: Rio Grande do Sul; SP: São Paulo; TO: Tocantins; TT: Trinidad e Tobago.

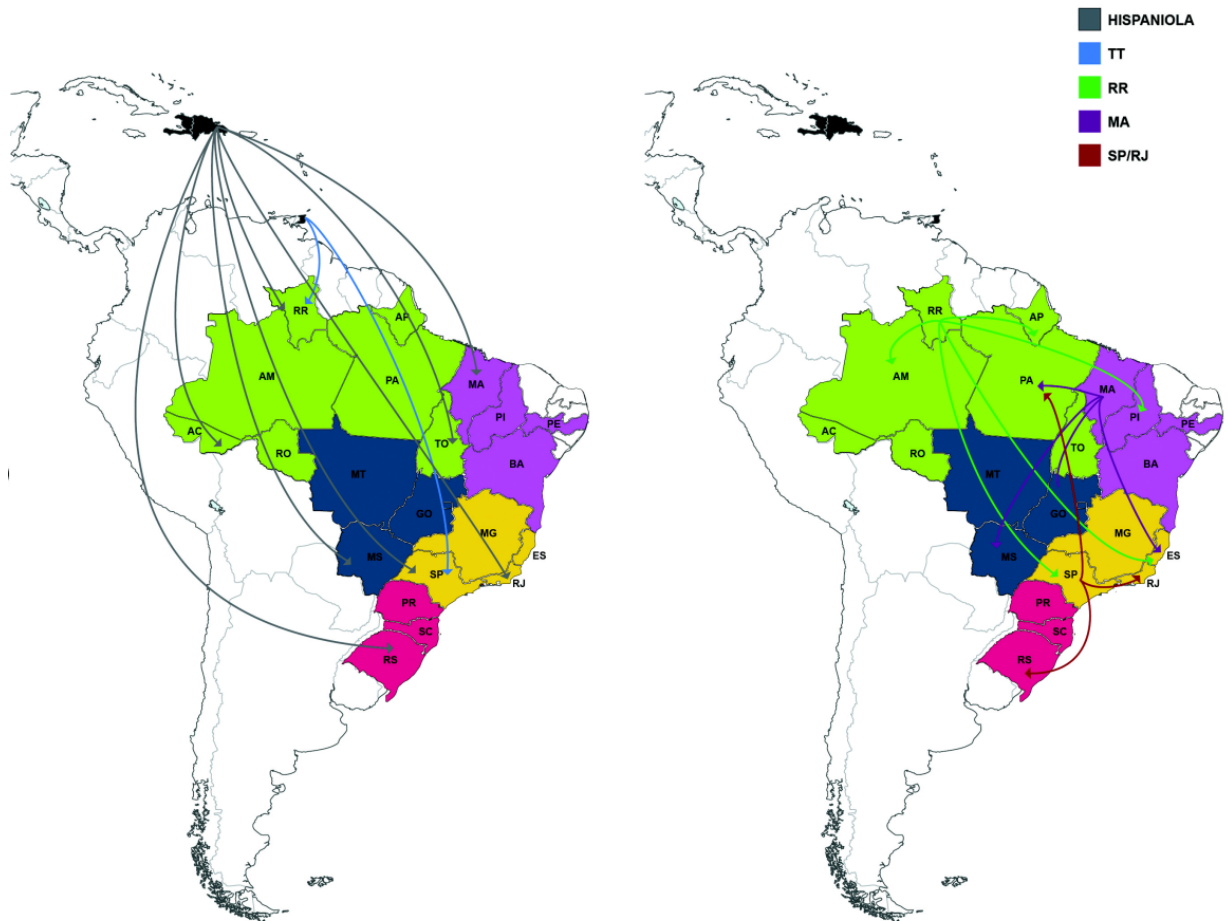


Figura 4. 4 Representação esquemática da dinâmica de disseminação das variantes B_{CAR} do HIV-1 entre o Caribe e Brasil. As linhas entre os locais representam ramos na árvore Bayesiana onde ocorreram transições de localização. As linhas foram coloridas de acordo com o local de origem da transição, conforme indicado na legenda à direita. AC: Acre; AM: Amazonas; AP: Amapá; CD: República Democrática do Congo; ES: Espírito Santo; GO: Goiás; HISP: Hispaniola; JM: Jamaica; MA: Maranhão; MG: Minas Gerais; MS: Mato Grosso do Sul; PA: Pará; PI: Piauí; RJ: Rio de Janeiro; RR: Roraima; RS: Rio Grande do Sul; SP: São Paulo; TO: Tocantins; TT: Trinidad e Tobago.

Tabela 4.2. Taxas de fator de Bayes (BF) das ligações epidemiológicas entre as diferentes localidades do Caribe e do Brasil na dispersão das variantes B_{CAR}.

Regiões	Localidades	BF^a
Caribe-Caribe	HISP-TT	36
	HISP-JM	73,321
	TT-JM	16
Caribe-Brasil	HISP-SP	149
	HISP-AC	10
	HISP-TO	23
	TT-RR	73,321
	Outros	<3
Brasil-Brasil	RR-AM	73,321
	RR-AP	287
	RR-SP	188
	RR-PI	18
	MA-GO	8
	MA-PA	3
	MA-SP	57
	SP-ES	28
	SP-GO	4
	SP-MS	11
	SP-PA	28
	SP-RJ	38
	SP-RS	145
	RJ-MG	334
	Outros	<3

BF > 100 indica suporte decisivo, $30 \leq BF \leq 100$ indica suporte muito forte, $10 \leq BF \leq 30$ indica suporte forte e $6 \leq BF \leq 10$ indica suporte substancial para a migração entre os locais.

4.3 Dinâmica de disseminação espaço-temporal dos clados B_{CAR} do Brasil.

Das 14 introduções independentes de variantes B_{CAR} no Brasil identificadas, quatro originaram epidemias locais que resultaram nos clados brasileiros aqui denominados como $B_{CAR-BR-I}$, $B_{CAR-BR-II}$, $B_{CAR-BR-III}$ e $B_{CAR-BR-IV}$ (Figura 4.3) que compreendem 51%, 16%, 10% e 8% das sequências B_{CAR} brasileiras identificadas nas análises, respectivamente. Todos os clados B_{CAR} brasileiros exibiram um alto suporte ($PP > 0,80$) com exceção do clado $B_{CAR-BR-III}$ ($PP = 0,35$).

O clado $B_{CAR-BR-I}$ inclui a maioria das sequências B_{CAR} de Roraima (79%) e todas as sequências detectadas no Amazonas. Este clado parece ter se originado pela introdução de uma variante B_{CAR-TT} desde Trinidad e Tobago em Roraima ($PSP = 0,82$) no final da década de 1970 (Tabela 4.2), com posterior disseminação para Amazonas, Amapá, Piauí e São Paulo (Figuras 4.3 e 4.4).

O clado $B_{CAR-BR-II}$ compreende todas as sequências B_{CAR} detectadas no estado do Maranhão. Este clado parece ter surgido pela introdução de uma variante B_{CAR} da Hispaniola no Maranhão ($PSP = 0,90$) no final da década de 1970 (Tabela 6), com subsequente disseminação para Pará, Goiás, Mato Grosso do Sul, São Paulo e Espírito Santo (Figuras 4.3 e 4.4).

O clado $B_{CAR-BR-III}$ compreende a maioria das sequências B_{CAR} detectadas no Sudeste. Esta linhagem provavelmente surgiu pela introdução de uma cepa B_{CAR} da Hispaniola no estado de São Paulo ($PSP = 0,35$) no final da década de 1970 (Tabela 6), com posterior disseminação para Rio de Janeiro, Minas Gerais, Rio Grande do Sul e Pará (Figuras 4.3 e 4.4).

O clado $B_{CAR-BR-IV}$ surgiu provavelmente pela introdução de uma variante B_{CAR} da Hispaniola no estado de Roraima ($PSP = 1$) no início da década de 1980 (Tabela 4.2). Desde Roraima esta variante foi disseminada para São Paulo e Espírito Santo (Figuras 4.3 e 4.4).

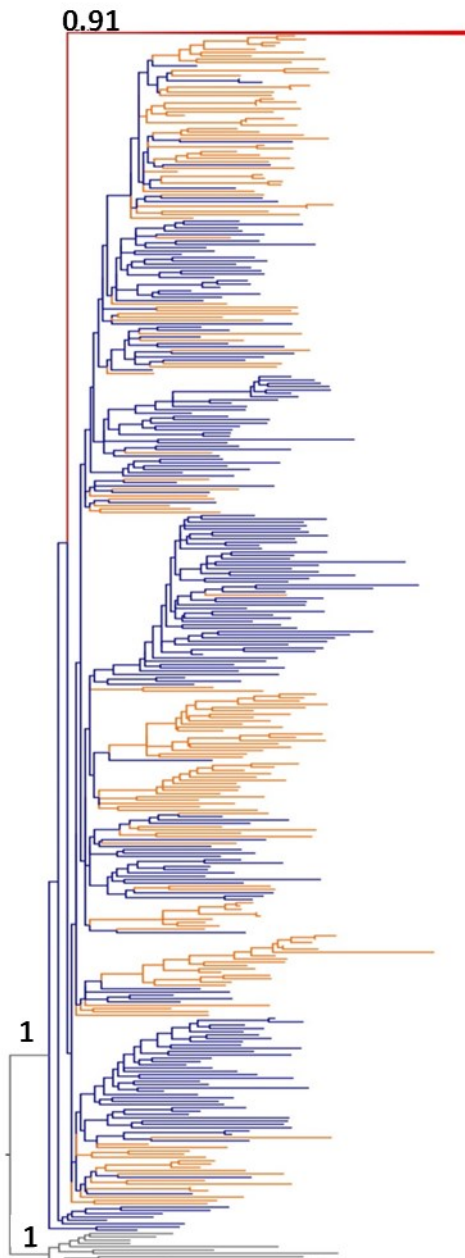
Os testes de BF apoiam uma ligação epidemiológica significativa de Roraima com Amazonas/Amapá/Piauí/São Paulo, do Maranhão com Goiás/Pará/São Paulo, de São Paulo com Espírito Santo/Goiás/Mato Grosso do Sul/Pará/Rio de Janeiro/Rio Grande do Sul, bem como entre Rio de Janeiro e Minas Gerais/ (Tabela 4.3).

4.4 Frequência das variantes B_{PADEMICO} e B_{CAR} e identificação dos principais clados B_{CAR} nos países do extremo norte da América do Sul.

Um estudo anteriormente desenvolvido pelo nosso grupo estimou uma alta prevalência (>40%) de variantes B_{CAR} na Guiana Francesa e Suriname [50], mas a falta de sequências cobrindo o fragmento PRO/TR do gene *pol* impediu uma avaliação mais detalhada da relação destas sequências com as detectadas nos outros países das Américas. Em 2016 foram publicadas sequências da PRO/TR do HIV-1 da Guiana Francesa [54] e Suriname [55], o que permitiria fazer uma reconstrução da dinâmica de disseminação das variantes B_{CAR} entre o Caribe, os países do extremo norte da América do Sul e o Brasil. Para isto, recuperamos um total de 361 sequências HIV-1 subtipo B *pol* provenientes da Guiana Francesa ($n = 271$) e Suriname ($n = 90$) a partir do banco de dados de Los Alamos. Destas, 207 (57%) foram classificadas como variantes B_{CAR} nas análises filogenéticas por MV (Figura 4.5), incluindo 60% ($n = 162$) das sequências da Guiana Francesa e 50% ($n = 45$) das sequências do Suriname.

As 207 sequências B_{CAR} da Guiana Francesa e Suriname foram combinadas com sequências B_{CAR} do Brasil ($n = 86$) correspondentes aos quatro clados descritos na Figura 4.3 e com sequências B_{CAR} do Caribe ($n = 200$). A análise filogenética por MV destas sequências apontam para múltiplas introduções de variantes B_{CAR} desde o Caribe para Guiana Francesa e Suriname (Figura 4.6). Algumas destas introduções deram origem a epidemias locais de grande tamanho que geraram os clados denominados B_{CAR-SA}, B_{CAR-GF/SR-I}, B_{CAR-GF/SR-II} e B_{CAR-GF/SR-III} (Figura 4.6). O clado B_{CAR-SA} compreende 30% ($n = 49$) das sequências B_{CAR} da Guiana Francesa, 9% ($n = 4$) das sequências B_{CAR} do Suriname e todas as sequências brasileiras do clado B_{CAR-BR-I}. O clado B_{CAR-GF/SR-I} compreende 12% ($n = 20$) das sequências B_{CAR} da Guiana Francesa e 51% ($n = 23$) das sequências B_{CAR} do Suriname. O clado B_{CAR-GF/SR-II} compreende 10% ($n = 16$) das sequências B_{CAR} da Guiana Francesa e 20% ($n = 9$) das sequências B_{CAR} do Suriname. O clado B_{CAR-GF/SR-III} compreende 6% ($n = 10$) das sequências B_{CAR} da Guiana Francesa e 4% ($n = 2$) das sequências B_{CAR} do Suriname. Os clados brasileiros B_{CAR-BR-II}, B_{CAR-BR-III} e B_{CAR-BR-IV} aparecem como linhagens independentes, não relacionadas com sequências da Guiana Francesa ou do Suriname.

A)



B)

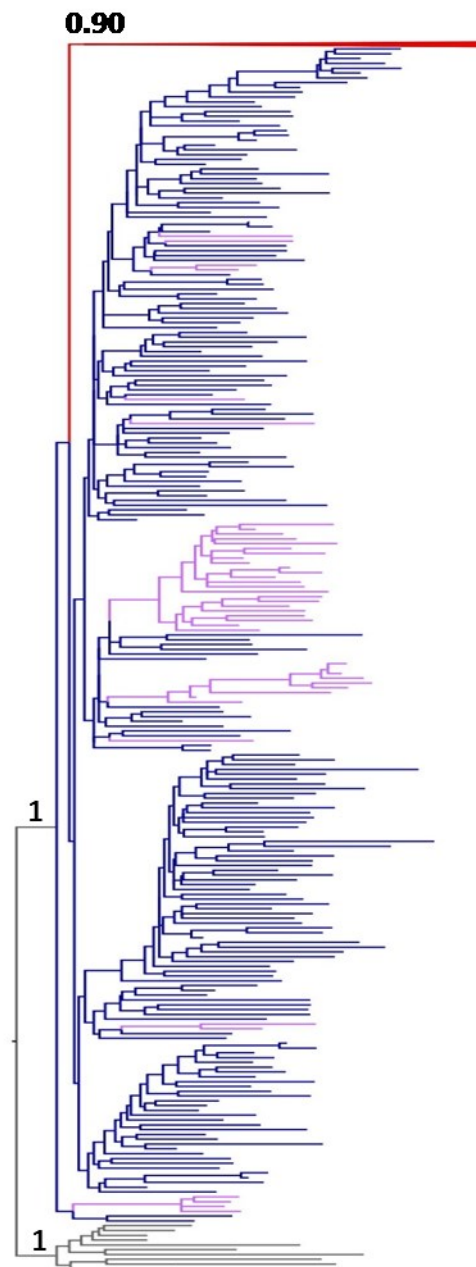


Figura 4.5 Árvores filogenéticas de MV das seqüências HIV-1 subtipo B provenientes da Guiana Francesa (A) e Suriname (B). As seqüências da Guiana Francesa e Suriname foram analisadas conjuntamente com seqüências referências dos clados $B_{\text{PANDEMICO}}$ e B_{CAR} . Os ramos em laranja na árvore A correspondem as seqüências da Guiana Francesa e os ramos em lilás na árvore B correspondem as seqüências do Suriname. O clado $B_{\text{PANDEMICO}}$ (na cor vermelha) foi colapsado para melhor clareza visual. Os ramos em azul são correspondentes as seqüências referências de B_{CAR} . Os valores de suporte estão indicados nos nós principais. As árvores foram enraizadas usando seqüências de referência HIV-1 subtipo D.

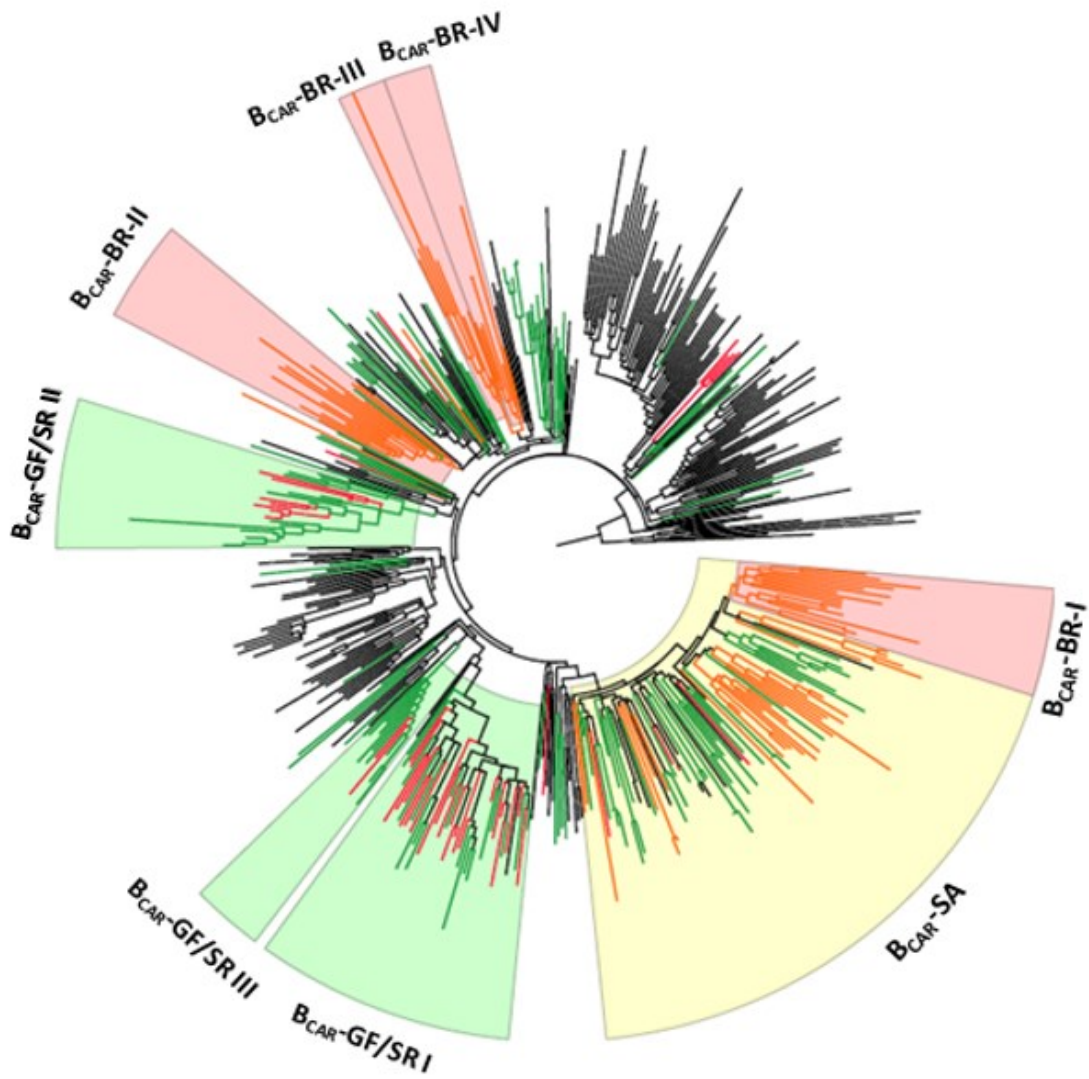


Figura 4.6 Árvore filogenética de MV das sequências HIV-1 subtipo B *pol* de variantes B_{CAR} provenientes do Brasil ($n = 86$), Guiana Francesa ($n = 162$), Suriname ($n = 45$) e diversas ilhas do Caribe ($n = 200$). Os ramos são coloridos segundo o local de origem: em laranja as sequências brasileiras, em verde as sequências da Guiana Francesa, em rosa as sequências do Suriname e em preto sequências das ilhas caribenhas. As caixas coloridas indicam as posições dos principais clados B_{CAR} detectados no Brasil, Guiana Francesa e Suriname. A árvore foi enraizada usando sequências de referência HIV-1 subtipo D.

4.5 Dinâmica de disseminação espaço-temporal dos principais clados B_{CAR} que circulam no extremo norte da América do Sul.

Para a reconstrução da história evolutiva e filogeográfica dos principais clados B_{CAR} que circulam no extremo norte da América do Sul, combinamos as sequências dos clados B_{CAR-SA}, B_{CAR-GF/SR-I}, B_{CAR-GF/SR-II} e B_{CAR-GF/SR-III} e B_{CAR-BRII} com todas as sequências B_{CAR} provenientes da Hispaniola, Jamaica, Trinidad e Tobago e Guiana previamente identificadas assim como com sequências do subtipo D da RDC (Tabela 4.4).

Tabela 4.4. Sequências HIV-1 B_{CAR} *pol* do Brasil, Guiana Francesa, Suriname, Guiana e do Caribe utilizadas nas análises filogeográficas Bayesianas.

País	Região	Estado	Localização	N	Ano
Brasil	Norte	AM	AM	14	2009-2011
		AP	AP	3	2013
		PA	PA	2	2010
		RR	RR	32	2010-2013
	Nordeste	MA	MA	10	2012
		PI	PI	1	2011
		Centro-Oeste	GO	GO	1
	MS		MS	1	2008
	Sudeste	ES	ES	1	1997
		SP	SP	2	2003-2006
Guiana Francesa	-	-	GF	94	2007-2012
Suriname	-	-	SR	41	2009
Guiana ^a	-	-	GY	7	2000
Republica Dominicana ^a	-	-	HISP	123	2003-2011
Haiti ^a	-	-	HISP	12	2004-2005
Jamaica ^a	-	-	JM	73	2005-2010
Trinidad and Tobago ^a	-	-	TT	50	2000-2003
RDC ^b	-	-	CD	10	1983-2007

^a Identificadas em estudo prévio [50] ^b Sequências do Subtipo D referentes à RDC.

A nova reconstrução filogeográfica Bayesiana confirmou mais uma vez a localização da raiz do subtipo B nas Américas, na ilha da Hispaniola na década de 1960 ($PSP = 1$) e estimou a sua disseminação para Trinidad e Tobago e Jamaica no início da década de 1970 (Tabela 4.5 e Figura 4.7) consistente com estudos anteriores[37],[38]. A análise Bayesiana também revelou cinco introduções independentes das variantes B_{CAR} na América do Sul a partir da Hispaniola ($n = 4$) e Trinidad e Tobago ($n = 1$), assim como um intenso fluxo viral entre Guiana Francesa, Suriname, Guiana e o estado de Roraima (Tabela 4.5 e Figuras 4.7 e 4.8).

O primeiro clado foi introduzido desde Trinidad e Tobago ($PSP = 0.98$) na Guiana Francesa ($PSP = 0.95$) por volta de 1977 originando o clado B_{CAR-SA}, que posteriormente se disseminou desde a Guiana Francesa para o Suriname, Guiana e diversos estados brasileiros incluindo Amapá, Piauí e Roraima. Esta variante foi introduzida em Roraima por volta de 1981 onde se disseminou localmente assim como para o Amazonas, Amapá e São Paulo, originando o clado B_{CAR-BR-I}. Também houve uma disseminação local desta variante na Guiana onde foi introduzida por volta de 1982 e originou o clado B_{CAR-GY}, que desde a Guiana se disseminou para Roraima e para Guiana Francesa.

O segundo clado foi introduzido desde a Hispaniola ($PSP = 0.98$) no Suriname ($PSP = 0.95$) por volta de 1978, originando o clado B_{CAR-GF/SR-I}, que posteriormente se disseminou desde o Suriname para Guiana Francesa. No mesmo período, houve uma introdução independente de uma variante B_{CAR} desde a Hispaniola ($PSP = 1$) no Maranhão ($PSP = 1$) onde se disseminou localmente assim como para o Pará, São Paulo, Espírito Santo, Goiás e Mato Grosso do Sul, originando o clado B_{CAR-BR-II}. Finalmente, foram inferidas duas disseminações independentes desde a Hispaniola ($PSP \geq 0.99$) para Guiana Francesa ($PSP \geq 0.96$) entre 1980 e 1984, que geraram os cladogramas B_{CAR-GF/SR-II} e B_{CAR-GF/SR-III}. Ambas linhagens B_{CAR} foram subsequentemente disseminadas desde a Guiana Francesa para o Suriname em múltiplas oportunidades.

Tabela 4.5. Estimativas Bayesianas do T_{MRCA} dos principais clados B_{CAR} do Brasil, Guiana Francesa, Suriname e Guiana.

Clado	T_{MRCA}
Subtype B	1968 (1962-1973)
B_{CAR-TT}	1974 (1970-1978)
B_{CAR-JM}	1975 (1970-1980)
B_{CAR-SA}	1977 (1973-1981)
$B_{CAR-BR-I}$	1981 (1978-1983)
$B_{CAR-BR-II}$	1979 (1975-1984)
$B_{CAR-GF/SR-I}$	1978 (1974-1983)
$B_{CAR-GF/SR-II}$	1980 (1975-1985)
$B_{CAR-GF/SR-III}$	1984 (1979-1988)

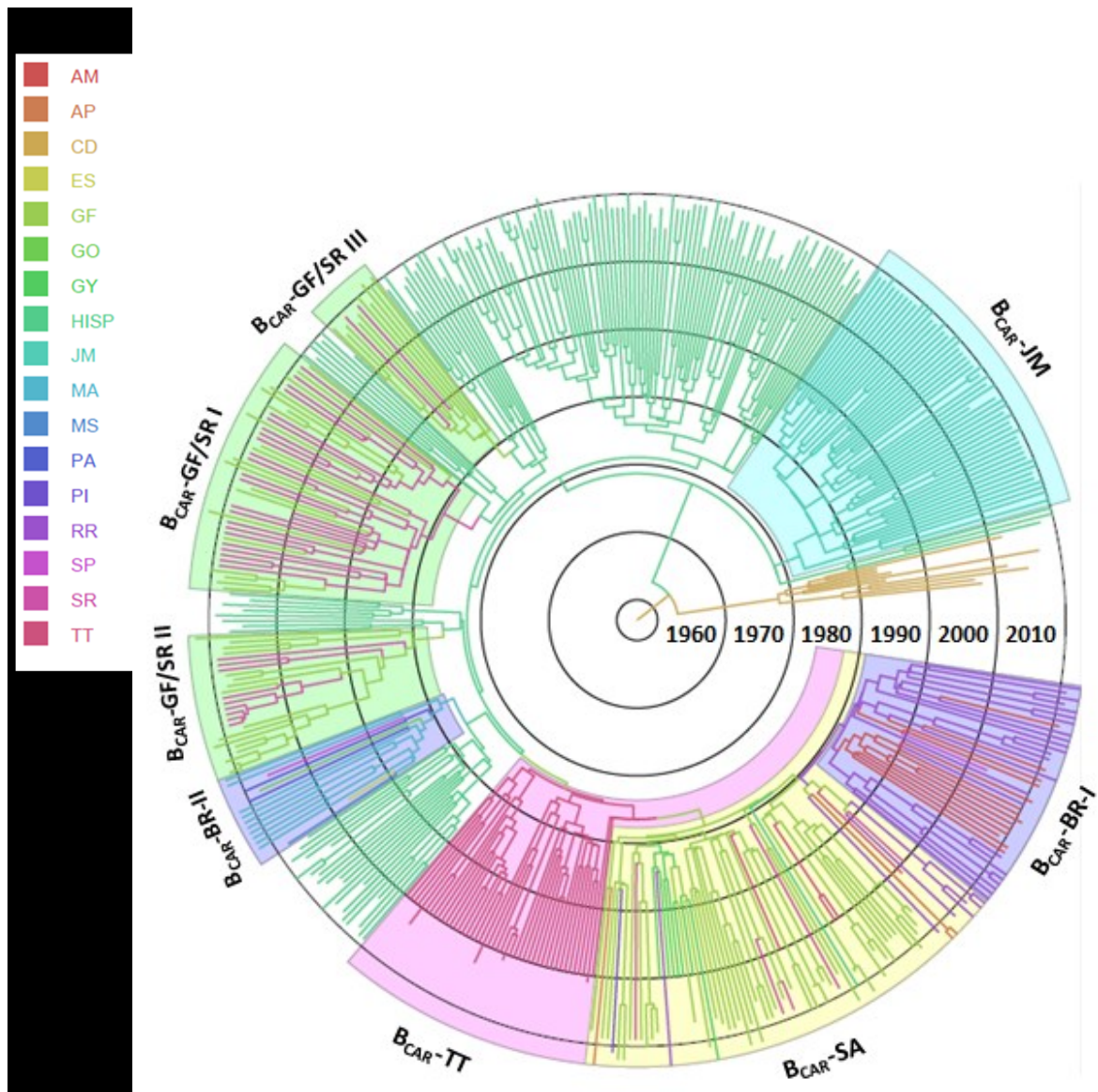


Figura 4.7 Árvore Bayesiana de máxima credibilidade de sequências *pol* de HIV-1 das maiores linhagens B_{CAR} do Brasil ($n = 67$), Guiana Francesa ($n = 94$) e Suriname ($n = 41$), sequências B_{CAR} da Guiana ($n = 7$) e ilhas do Caribe ($n = 258$) e sequências de referência do subtipo D ($n = 10$) da RDC. Os ramos estão coloridos de acordo com o estado de localização mais provável de seus nós descendentes, conforme indicado na legenda à direita. As caixas coloridas indicam as posições dos principais clados B_{CAR} detectados no Brasil, Guiana Francesa, Guiana, Suriname, Jamaica e Trinidad e Tobago. Os comprimentos dos ramos estão representados em unidades de tempo (anos). A árvore foi enraizada automaticamente sob a suposição de um relógio molecular relaxado. AM: Amazonas; AP: Amapá; CD: República Democrática do Congo; ES: Espírito Santo; GO: Goiás; GF: Guiana Francesa; GY: Guiana; HISP: Hispaniola; JM: Jamaica; MA: Maranhão; MS: Mato Grosso do Sul; PA: Pará; PI: Piauí; RR: Roraima; SP: São Paulo; SR: Suriname; TT: Trinidad e Tobago.

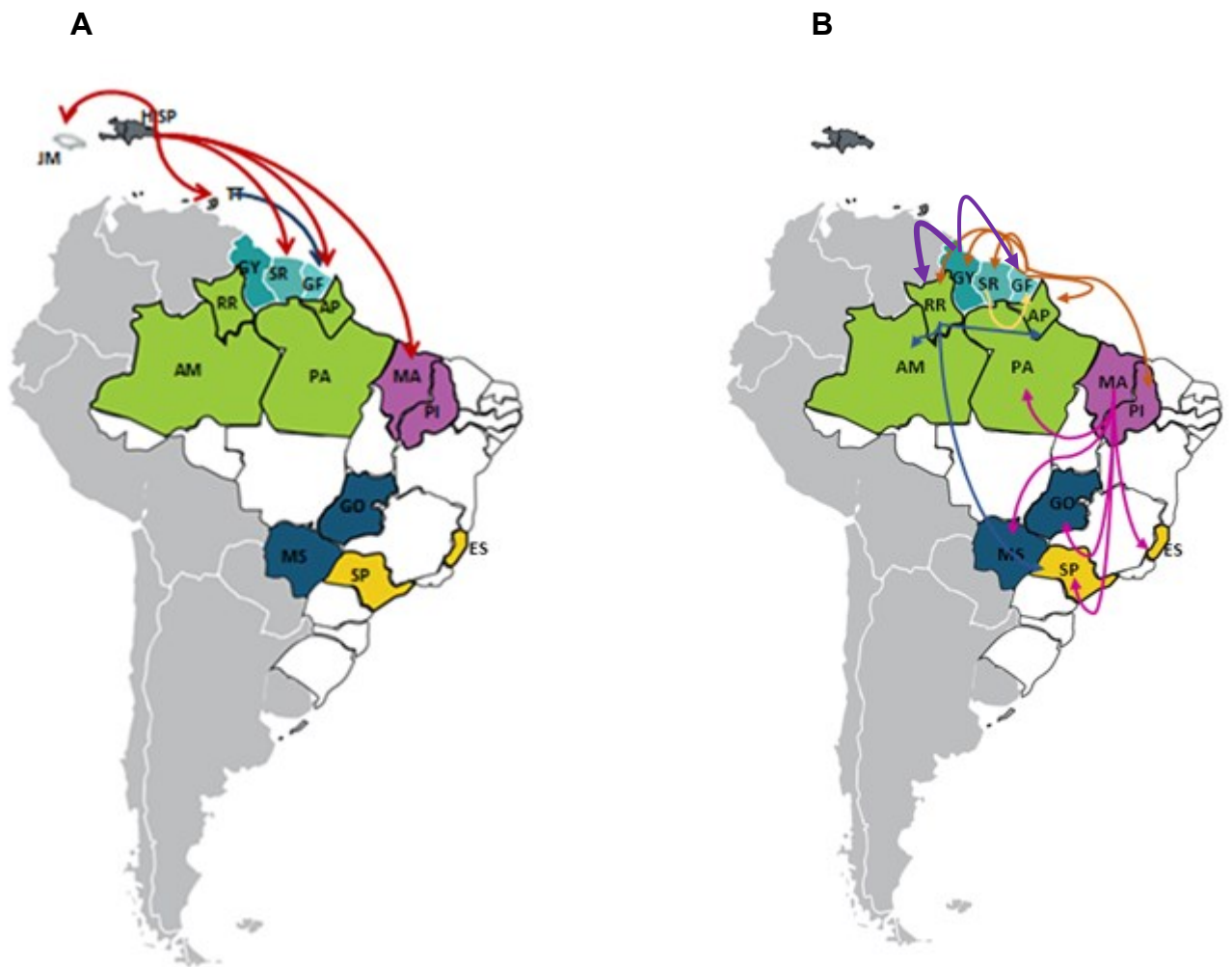


Figura 4 8 Representação esquemática da dinâmica de disseminação das variantes B_{CAR} do HIV-1 entre o Caribe, Brasil, Guiana Francesa, Guiana e Suriname. As linhas entre os locais representam ramos na árvore Bayesiana onde ocorreram transições de localização. A) As linhas coloridas do mapa representam as migrações virais originadas a partir da Hispaniola e Trinidad e Tobago. B) As linhas coloridas do mapa representam as migrações virais originadas a partir da Guiana Francesa, Guiana, Suriname, Roraima e Maranhão. AM: Amazonas; AP: Amapá; ES: Espírito Santo; GO: Goiás; GF: Guiana Francesa; GY: Guiana; HISP: Hispaniola; JM: Jamaica; MA: Maranhão; MS: Mato Grosso do Sul; PA: Pará; PI: Piauí; RR: Roraima; SP: São Paulo; SR: Suriname; TT: Trinidad e Tobago.

5 DISCUSSÃO

Estudos recentes nos permitem ter uma imagem muito mais precisa da dinâmica de disseminação do HIV-1 subtipo B no continente. O subtipo B do HIV-1 foi provavelmente introduzido no Haiti desde a RDC na década de 1960 [47]. Desde o Haiti o vírus se disseminou paralelamente para os EUA (dando origem ao clado $B_{\text{PANDEMICO}}$) e para outras ilhas do Caribe (dando origem aos clados B_{CAR}) [48]–[50]. Embora as variantes B_{CAR} e $B_{\text{PANDEMICO}}$ tenham sido introduzidas simultaneamente na América Latina entre o início dos anos 70 e início dos anos 80, a variante $B_{\text{PANDEMICO}}$ foi disseminada de forma muito mais eficiente e compreende mais de 95% das infecções pelo subtipo B na maioria dos países analisados, incluindo o Brasil [50].

Nosso estudo mostrou que as variantes B_{CAR} foram introduzidas múltiplas vezes no Brasil e circulam em pelo menos 16 dos 21 estados brasileiros aqui analisados. Embora a epidemia do HIV-1 subtipo B na maioria dos estados brasileiros é claramente dominada pelo clado $B_{\text{PANDEMICO}}$, nossas análises demonstram que as variantes B_{CAR} atingem uma alta prevalência em alguns estados do Norte (Roraima = 41% e Amazonas = 14%) e Nordeste (Maranhão = 14%). Uma alta prevalência dos clados B_{CAR} foi também detectada em alguns países do extremo norte da América do Sul como a Guiana Francesa (60%) e Suriname (50%), o que corrobora observações anteriores de nosso grupo [50]. Estes resultados indicam que a epidemia do HIV-1 subtipo B em algumas regiões da América do Sul incluindo Guiana Francesa, Suriname e Roraima está fortemente relacionada com a epidemia do Caribe.

Nossas análises filogeográficas indicam que as ilhas da Hispaniola e Trinidad e Tobago foram provavelmente as principais fontes de linhagens B_{CAR} introduzidas na América do Sul e apontam ainda para um intenso fluxo viral entre a Guiana Francesa, Suriname, Guiana e os estados do Norte do Brasil. Nossas análises também mostraram que vários estados brasileiros do Norte (Roraima, Acre, Amapá e Tocantins), Nordeste (Maranhão e Piauí), Sudeste (Rio de Janeiro e São Paulo), Centro-Oeste (Mato Grosso do Sul) e Sul (Rio Grande do Sul) atuaram como porta de entrada de variantes B_{CAR} no país e que pelo menos três países (Hispaniola, Guiana Francesa e Guiana) foram o epicentro dessas introduções.

A maioria das variantes B_{CAR} introduzidas na América do Sul (principalmente no Brasil) não foi capaz de se estabelecer localmente e ficaram limitadas a um ou uns poucos indivíduos. Algumas poucas variantes, no entanto, estabeleceram epidemias locais e originaram linhagens aqui designadas como B_{CAR-SA} , $B_{CAR-GF/SR-I}$, $B_{CAR-GF/SR-II}$, $B_{CAR-GF/SR-III}$, B_{CAR-GY} , $B_{CAR-BRI}$, $B_{CAR-BRII}$, $B_{CAR-BRIII}$, e $B_{CAR-BRIV}$. Todas estas linhagens parecem ter surgido num curto intervalo de tempo entre o final da década de 1970 e o início da década de 1980, o que coincide com a data estimada de origem das principais linhagens do clado $B_{PANDEMICO}$ na América Latina [50]. Isto confirma que as linhagens B_{CAR} e $B_{PANDEMICO}$ foram introduzidas simultaneamente na América Latina e que a variante $B_{PANDEMICO}$ foi disseminada de forma muito mais eficiente na maioria das regiões analisadas, com exceção da Guiana Francesa, Suriname, o estado de Roraima e possivelmente a Guiana, onde tanto as variantes B_{CAR} como o clado $B_{PANDEMICO}$ foram disseminadas em grande escala.

A linhagem com maior disseminação regional na América do Sul foi a B_{CAR-SA} que compreende 35% de todas as sequências B_{CAR} da América do Sul aqui identificadas. Esta linhagem deriva da linhagem B_{CAR-TT} que circula em Trinidad e Tobago e foi provavelmente introduzida na Guiana Francesa no final da década de 1970. Desde a Guiana Francesa esta variante se disseminou rapidamente para o Suriname, Guiana e para os estados brasileiros de Roraima, Amapá e Piauí. Na Guiana e Roraima, esta linhagem estabeleceu epidemias secundárias que originaram os clados B_{CAR-GY} e $B_{CAR-BR-I}$ respectivamente, no início da década de 1980. Desde Roraima, a linhagem $B_{CAR-BR-I}$ foi disseminada principalmente para o estado do Amazonas. Também foi detectada uma disseminação secundária da linhagem B_{CAR-GY} desde Guiana para Roraima e Guiana Francesa.

As outras linhagens B_{CAR} foram introduzidas nas Américas provavelmente desde a Hispaniola na: Guiana Francesa ($B_{CAR-GF/SR-II}$ e $B_{CAR-GF/SR-III}$), Suriname ($B_{CAR-GF/SR-I}$), Maranhão ($B_{CAR-BRII}$), São Paulo ($B_{CAR-BRIII}$) e Roraima ($B_{CAR-BRIV}$). Foi detectado um intenso fluxo das variantes $B_{CAR-GF/SR-I}$, $B_{CAR-GF/SR-II}$, $B_{CAR-GF/SR-III}$ entre a Guiana Francesa e Suriname, assim como uma disseminação da variante $B_{CAR-BRII}$ desde o Maranhão para outros estados brasileiros das regiões Norte, Sudeste e Centro-Oeste, da variante $B_{CAR-BRIII}$ desde São Paulo para outros estados das regiões Sudeste, Norte e Sul, e da variante $B_{CAR-BRIV}$ desde Roraima para estados da região Sudeste.

As múltiplas introduções e a elevada prevalência de variantes B_{CAR} observada na Guiana Francesa e no Suriname coincidem com um intenso fluxo migratório entre estes países e as ilhas do Caribe [69], mobilidade essa facilitada não somente pela proximidade geográfica, mas também por questões culturais, linguísticas e económicas. A Guiana Francesa, assim como o Suriname e a Guiana, são países essencialmente povoados na faixa atlântica, isolados dos demais países da América do Sul pela floresta amazônica e que falam idiomas (francês, inglês, neerlandês, e diversas línguas crioulas como o papiamento) comuns com as ilhas do Caribe [70]. Suriname e Guiana são também membros do Mercado Comum do Caribe (CARICOM), organização de 15 nações e dependências caribenhas que inclui também Bahamas, Belize, Haiti, Jamaica, Trinidad e Tobago e várias outras ilhas das Antilhas menores. O CARICOM não apenas promove a integração econômica e política, mas também facilita a livre circulação de pessoas para o turismo ou trabalho entre os países. Por sua vez, a Guiana Francesa tem uma forte conexão com as ilhas caribenhas que fazem parte das Antilhas francesas (Martinica, Guadalupe, São Bartolomeu e São Martinho).

A Guiana Francesa foi apontada pelas nossas análises como o principal epicentro da disseminação regional da linhagem B_{CAR-SA} na América do Sul. Algumas evidências, no entanto, sugerem que a Guiana pode ter se desempenhado como um importante ponto de entrada e disseminação desta variante, mas que sua participação pode ter sido subestimada devido ao pequeno número de sequências do HIV-1 disponíveis deste país. Primeiro, note-se que uma proporção significativa (10%) de imigrantes em Trinidad e Tobago são da Guiana [69], o que poderia explicar a disseminação da variante B_{CAR-TT} desde esta ilha caribenha para América do Sul. Segundo, todas as sequências B_{CAR} *pol* da Guiana disponíveis ($n = 7$) agruparam dentro do clado B_{CAR-SA} o que aponta para uma alta prevalência desta linhagem no país. Terceiro, existe um fluxo migratório muito mais intenso entre o estado de Roraima e a vizinha Guiana, do que entre Roraima e a Guiana Francesa com a qual não faz fronteira[71]–[78]. De fato, uma das estirpes B_{CAR} detectadas em Roraima foi isolada de um indivíduo da cidade guianense de Lethem, localizada na fronteira com Roraima, que era acompanhado na capital Boa Vista. Por tanto, a geração de um maior número de sequências do HIV-1 subtipo B da Guiana será fundamental para reconstruir com maior precisão as rotas de disseminação do clado B_{CAR-SA} no extremo norte da América do Sul.

Dados históricos podem nos auxiliar a entender a introdução de variantes B_{CAR} tanto em Roraima como no Maranhão. A data estimada de origem dos clados B_{CAR} em Roraima coincide com um período de rápido crescimento populacional e maior acessibilidade geográfica no estado. A população de Roraima aumentou de 41.000 para cerca de 220.000 habitantes entre 1970 e 1990 [79][80]. Muitos desses migrantes brasileiros inicialmente atraídos pelo surgimento de atividades de mineração legal/ilegal em Roraima migraram posteriormente para a Guiana e o Brasil é hoje um dos principais países de origem de migrantes para aquele país[71]. A crise econômica na Guiana também produziu um fluxo migratório crescente do povo guianês para Roraima desde a década de 1960, particularmente para o município vizinho do Bonfim e a capital do estado Boa Vista[71]. Estas mudanças drásticas na estrutura demográfica de Roraima e na mobilidade da população podem ter alimentado a introdução de linhagens B_{CAR} desde Guiana para Roraima. Por sua vez, a disseminação do clado $B_{CAR-BR-I}$ desde Roraima para o Amazonas é esperado considerando que estes dois estados vizinhos mantêm um fluxo populacional muito intenso através da rodovia BR-174 que foi também inaugurada na década de 1970.

O Brasil também sofreu no início da década de 1980 uma grave crise econômica que motivou um aumento no processo de emigração aos países fronteiriços. Guiana, Suriname e Guiana Francesa contabilizam hoje aproximadamente 42 mil brasileiros imigrantes, particularmente dos estados de Maranhão, Pará e Amapá [71]–[78]. A migração através da fronteira com a Guiana, Suriname e Guiana Francesa esteve (e ainda está) diretamente relacionado ao movimento de garimpeiros e profissionais do sexo [71]. Relatos históricos demonstram um ambiente promiscuo e com redes de prostituição amplamente disseminadas nos garimpos dessas regiões de fronteira. Estudos também mostram que os migrantes são frequentemente mais vulneráveis do que as populações locais a contrair infecção pelo HIV e enfrentam maiores obstáculos no acesso a cuidados médicos. Ao mesmo tempo, muitos desses garimpeiros e profissionais do sexo retornam ao Brasil de tempos em tempos [71] gerando assim uma alta interconectividade entre os estados do Norte e Nordeste do Brasil com a Guiana, Suriname e Guiana Francesa, o que pode ter facilitado a propagação das variantes B_{CAR} desde esses países.

Embora a alta prevalência de variantes B_{CAR} detectadas no Norte e Nordeste do Brasil pode estar correlacionada com o intenso fluxo migratório para a Guiana, Suriname e Guiana Francesa nas décadas passadas, os resultados das nossas análises apontam algumas inconsistências para esta hipótese. Primeiro, as nossas análises filogeográficas suportam uma disseminação direta de variantes B_{CAR} desde o Caribe para o Maranhão, e não uma disseminação desde a Guiana, Suriname ou Guiana Francesa. Segundo, muitas pessoas dos estados do Amapá e Pará migraram para a Guiana Francesa, Suriname e Guiana desde meados da década de 1960 [71]–[78]. Apesar disso, detectamos uma baixa proporção (3-4%) de variantes B_{CAR} nesses estados e escassas evidências de uma propagação direta de variantes B_{CAR} desde esses países do extremo norte da América do Sul para o Amapá ou Pará. Isto sugere que outros fatores, além das migrações históricas através da fronteira norte do Brasil, desempenharam um importante papel na introdução e na disseminação de variantes B_{CAR} do HIV-1 no Norte e Nordeste do Brasil.

A importância de fatores estocásticos na disseminação de variantes B_{CAR} para o Brasil pode ser exemplificada através da linhagem $B_{CAR-BR-III}$. O clado $B_{CAR-BR-III}$ parece ter sido a única linhagem brasileira não-pandêmica de subtipo B que se originou fora das regiões Norte/Nordeste. Este clado foi provavelmente introduzido do Caribe no estado de São Paulo e de lá foi disseminado ao Rio de Janeiro, Minas Gerais, Rio Grande do Sul e Pará. Um estudo anterior realizado pelo nosso grupo indica que este clado (anteriormente denominado $B_{CAR-BR-I}$) também foi disseminado do Brasil para a Argentina [50], o que aponta para a existência de uma linhagem B_{CAR} com origem em São Paulo e circulando principalmente na região sul da América do Sul. A relevância de São Paulo como potencial porta de entrada e disseminação de novas cepas de HIV-1 pode ser explicada pela alta interconectividade deste estado com outros países e estados brasileiros já que São Paulo recebe um grande número de visitantes através do seu aeroporto internacional e hospeda uma alta proporção dos imigrantes que chegam ao Brasil. Por outra parte, estes resultados devem ser interpretados com cautela porque o clado $B_{CAR-BR-III}$ foi o único a ter um baixo suporte estatístico.

6 CONCLUSÕES

- As linhagens B_{CAR} representam uma elevada proporção (>10%) das infecções pelo HIV-1 subtipo B em alguns estados das regiões Norte (Roraima e Amazonas) e Nordeste (Maranhão) do Brasil.
- A epidemia de HIV-1 subtipo B em Roraima apresenta um perfil molecular singular caracterizado por uma elevada proporção (>40%) de variantes B_{CAR} e B_{PANDEMICO}, similar aquele observado em países do extremo norte da América do Sul (Guiana Francesa e Suriname) e em algumas ilhas do Caribe (Bahamas e Jamaica).
- Vários estados de todas as regiões do Brasil atuaram como porta de entrada de variantes B_{CAR} no país e pelo menos três locais (Hispaniola, Guiana Francesa e Guiana) foram apontados como epicentros dessas introduções.
- Um poucas variantes B_{CAR} introduzidas nos estados de Roraima, Maranhão e São Paulo entre o final da década de 1970 e o início da década de 1980 conseguiram se disseminar e estabelecer epidemias locais no Brasil.
- O processo de emigração relacionada ao garimpo para Guiana, Suriname e Guiana Francesa, ocorrido durante as décadas de 1970 e 1980, podem explicar parcialmente a elevada prevalência das variantes B_{CAR} em estados das regiões Norte e Nordeste do Brasil.
- As populações de migrantes através das fronteiras do extremo norte do Brasil podem representar uma fonte de introdução de novas variantes do HIV no país e devem um importante alvo de campanhas de prevenção da transmissão do vírus.
- A relevância de eventos estocásticos (não relacionados a processos históricos de migrações de grande escala) na disseminação de variantes B_{CAR} para o Brasil deve ser também considerada.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] E. Fee and T. M. Brown, "Michael S. Gottlieb and the Identification of AIDS," *Am. J. Public Health*, vol. 96, no. 6, pp. 982–983, 2006.
- [2] E. Al Barre-Sinoussi, F., J. C. Chermann, "Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS).," *Science (80-.)*, vol. 220(4599), pp. 868–71, 1983.
- [3] M. Popovic, M. G. Sarngadharan, E. Read, and R. C. Gallo, "Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS.," *Science*, vol. 224, no. 4648, pp. 497–500, 1984.
- [4] Programa Conjunto das Nações Unidas sobre HIV/AIDS "UNAIDS report on the global AIDS epidemic 2013", 2013.
- [5] "Brasil Ministério da Saúde - Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais," 2016. [Online]. Disponível: <http://www.aids.gov.br/>.
- [6] Brasil Ministério da Saúde "Boletim Epidemiológico HIV AIDS," 2016. Disponível http://www.aids.gov.br/sites/default/files/anexos/publicacao/2016/59291/boletim_2016_1_pdf_16375.pdf 2016
- [7] F. Gao *et al.*, "Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes troglodytes*," *Nature*, vol. 397, no. 6718, pp. 436–441, 1999.
- [8] J.-C. C. Plantier *et al.*, "A new human immunodeficiency virus derived from gorillas.," *Nat Med*, vol. 15, no. 8, pp. 871–872, 2009.
- [9] A. Hughes and T. Corrah, "Human immunodeficiency virus type 2 (HIV2)," *Blood Rev.*, vol. 4, no. 3, pp. 158–164, 1990.
- [10] A. Engelman and P. Cherepanov, "The structural biology of HIV-1: mechanistic and therapeutic insights.," *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 10, no. 4, pp. 279–90, 2012.
- [11] J. Hemelaar, E. Gouws, P. D. Ghys, and S. Osmanov, "Global trends in molecular epidemiology of HIV-1 during 2000– 2007," *AIDS*, vol. 25, no. 5, pp. 679–689, 2011.
- [12] A. Proietti, E. F. Barbosa, J. G. Silva, A. F. de Carvalho, E. G. Kroon, and P. C.

- P. Ferreira, "Genetic variability of HIV-1 isolates from Minas Gerais, Brazil," *Rev. Microbiol.*, vol. 30, no. 2, pp. 141–143, 1999.
- [13] J. C. Couto-Fernandez *et al.*, "Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) genotyping in Rio de Janeiro, Brazil: assessing subtype and drug-resistance associated mutations in HIV-1 infected individuals failing highly active antiretroviral therapy.," *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, vol. 100, no. 1, pp. 73–8, 2005.
- [14] M. G. Morgado *et al.*, "Molecular epidemiology of HIV-1 in Brazil: High prevalence of HIV-1 subtype B and identification of an HIV-1 subtype D infection in the city of Rio de Janeiro, Brazil," *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.*, vol. 18, p. 488–494 ST–Molecular epidemiology of HIV–1 in B, 1998.
- [15] W. a Eyer-Silva, J. C. Couto-Fernandez, and M. G. Morgado, "Molecular epidemiology of HIV type 1 in inner Rio De Janeiro State, Brazil.," *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, vol. 23, no. 2, pp. 303–8, 2007.
- [16] V. P. Cabral *et al.*, "Human immunodeficiency virus type-1 subtypes of infected patients in Espírito Santo, Brazil," *Mem Inst Oswaldo Cruz Rio Janeiro*, vol. 101, no. 8, pp. 881–885, 2006.
- [17] S. S. Sanabani *et al.*, "Near full-length genome analysis of low prevalent human immunodeficiency virus type 1 subclade F1 in São Paulo, Brazil.," *Virology*, vol. 6, no. 1, p. 78, 2009.
- [18] K. C. Alcântara, M. N. G. Reis, L. P. V. Cardoso, G. Bello, and M. M. A. Stefani, "Increasing heterosexual transmission of HIV-1 subtype C in Inland Central Western Brazil," *J. Med. Virol.*, vol. 85, no. 3, pp. 396–404, 2013.
- [19] M. M. A. Stefani *et al.*, "Molecular screening shows extensive HIV-1 genetic diversity in Central West Brazil," *J. Clin. Virol.*, vol. 39, no. 3, pp. 205–209, 2007.
- [20] L. P. V. Cardoso, A. A. da Silveira, R. B. L. Francisco, M. N. da Guarda Reis, and M. M. de Araújo Stefani, "Molecular Characteristics of HIV Type 1 Infection Among Prisoners from Central Western Brazil," *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, vol. 27, no. 0, pp. 1349–1353, 2011.
- [21] S. M. Ferreira, Cardoso LP, "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 Aug;83(8)1301-7. doi 10.1002/jmv.22128.

- [22] A. A. da Silveira, L. P. V. Cardoso, R. B. L. Francisco, and M. M. de Araújo Stefani, "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*, vol. 28, no. 0, pp. 304–307, 2012.
- [23] S. E. Lopes, Soares MA, Falci DR, "The Evolving Genotypic Profile of HIV-1 Mutations Related to Antiretroviral Treatment in the North Region of Brazil.," *Biomed Res Int.* 2015;2015738528. doi 10.1155/2015/738528. Epub 2015 Oct 12.
- [24] L. F. Machado *et al.*, "Molecular epidemiology of HIV type 1 in northern Brazil: identification of subtypes C and D and the introduction of CRF02_AG in the Amazon region of Brazil.," *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, vol. 25, no. 10, pp. 961–966, 2009.
- [25] L. Dos Anjos Silva *et al.*, "HIV-1 genetic diversity and transmitted drug resistance in antiretroviral treatment-naive individuals from Amapá State, Northern Brazil," *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, vol. 32, no. 4, pp. 1–4, 2016.
- [26] C.F.J. da Costa, Costa de Oliveira, Chehuan de Melo YF, Delatorre E, Bello G, "High HIV-1 Genetic Diversity in Patients from Northern Brazil.," *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2016 Sep;32(9)918-22. doi 10.1089/AID.2016.0044. Epub 2016 May 11.
- [27] A. M. S. Cavalcanti, H. R. Lacerda, A. M. De Brito, S. Pereira, D. Medeiros, and S. Oliveira, "Antiretroviral resistance in individuals presenting therapeutic failure and subtypes of the human immunodeficiency virus type 1 in the Northeast Region of Brazil," *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, vol. 102, no. 7, pp. 785–792, 2007.
- [28] L. H. Lima K1, de Souza Leal É2, Cavalcanti AM3, Salustiano DM3, de Medeiros LB4, da Silva SP3, "Epidemiological, Clinical and Antiretroviral Susceptibility Characterization of Human Immunodeficiency Virus Subtypes B and Non-B in Pernambuco, Northeast Brazil.," *PLoS One.* 2016 May 24;11(5)e0155854. doi 10.1371/journal.pone.0155854. eCollection 2016.
- [29] S. M. Moura, da Guarda Reis MN, Lima YA, Eulálio KD, Cardoso LP, "HIV-1 transmitted drug resistance and genetic diversity among patients from Piauí State, Northeast Brazil.," *J Med Virol.* 2015 May;87(5)798-806. doi 10.1002/jmv.24087. Epub 2015 Feb 3.
- [30] M. E. S. Moura, M. N. D. G. Reis, Y. A. R. Lima, K. D. Eulálio, L. P. V.

- Cardoso, and M. M. D. A. Stefani, "Low Rate of Transmitted Drug Resistance May Indicate Low Access to Antiretroviral Treatment in Maranhão State, Northeast Brazil.," *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, vol. 30, no. 0, pp. 1–5, 2014.
- [31] K. V. Gaspareto *et al.*, "Genetic diversity and primary resistance among HIV-1-positive patients from Maringá, Paraná, Brazil," *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*, vol. 54, no. 4, pp. 207–213, 2012.
- [32] T. Gräf *et al.*, "HIV-1 genetic diversity and drug resistance among treatment naïve patients from Southern Brazil: An association of HIV-1 subtypes with exposure categories," *J. Clin. Virol.*, vol. 51, no. 3, pp. 186–191, 2011.
- [33] J. Silveira *et al.*, "Heterosexual transmission of human immunodeficiency virus type 1 subtype C in southern Brazil," *J. Clin. Virol.*, vol. 54, no. 1, pp. 36–41, 2012.
- [34] S. E. Almeida *et al.*, "Temporal dynamics of HIV-1 circulating subtypes in distinct exposure categories in southern Brazil.," *Viol. J.*, vol. 9, p. 306, 2012.
- [35] T. Gräf and A. R. Pinto, "The increasing prevalence of HIV-1 subtype C in Southern Brazil and its dispersion through the continent," *Virology*, vol. 435, no. 1. pp. 170–178, 2013.
- [36] I. M. Prellwitz *et al.*, "HIV behind Bars: Human Immunodeficiency Virus Cluster Analysis and Drug Resistance in a Reference Correctional Unit from Southern Brazil," *PLoS One*, vol. 8, no. 7, 2013.
- [37] M. a Soares *et al.*, "A specific subtype C of human immunodeficiency virus type 1 circulates in Brazil.," *AIDS*, vol. 17, no. 1, pp. 11–21, 2003.
- [38] J. L. De Sá Filho DJ1, Sucupira MC, Caseiro MM, Sabino EC, Diaz RS, "Identification of two HIV type 1 circulating recombinant forms in Brazil.," *AIDS Res Hum Retroviruses.*, 2006.
- [39] S. E. Sanabani S1, Kleine Neto W, Kalmar EM, Diaz RS, Janini LM, "Analysis of the near full length genomes of HIV-1 subtypes B, F and BF recombinant from a cohort of 14 patients in São Paulo, Brazil.," *Infect Genet Evol*, 2006.
- [40] S. Sanabani, É. de Souza Pastena, W. Neto, V. Martinez, and E. Sabino, "Characterization and frequency of a newly identified HIV-1 BF1 intersubtype circulating recombinant form in São Paulo, Brazil," *Viol. J.*, vol. 7, no. 1, p. 74, 2010.
- [41] M. M. Guimaraes ML, Eyer-Silva WA, Couto-Fernandez JC, "Identification of two new CRF_BF in Rio de Janeiro State," *AIDS Res. Hum. Retroviruses*.

- [42] S. S. I. C. of the N. R. E. and D. E. S.-I. Pessôa R, Watanabe JT, Calabria P, Felix AC, Loureiro P, Sabino EC, Busch MP, “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.
- [43] S. S. Pessôa, Carneiro Proietti, Busch, “Identification of a Novel HIV-1 Circulating Recombinant Form (CRF72_BF1) in Deep Sequencing Data from Blood Donors in Southeastern Brazil.,” *Genome Announc.* 2014 Jun 12;2(3). pii e00386-14. doi 10.1128/genomeA.00386-14.
- [44] A. F. Santos *et al.*, “Characterization of a new circulating recombinant form comprising HIV-1 subtypes C and B in southern Brazil.,” *AIDS*, vol. 20, no. 16, pp. 2011–2019, 2006.
- [45] A. J. Drummond, O. G. Pybus, A. Rambaut, R. Forsberg, and A. G. Rodrigo, “Measurably evolving populations,” *Trends in Ecology and Evolution*, vol. 18, no. 9. pp. 481–488, 2003.
- [46] E. C. Holmes and E. C. Holmes, “Evolutionary history and phylogeography of human viruses.,” *Annu. Rev. Microbiol.*, vol. 62, pp. 307–28, 2008.
- [47] M. T. P. Gilbert, A. Rambaut, G. Wlasiuk, T. J. Spira, A. E. Pitchenik, and M. Worobey, “The emergence of HIV/AIDS in the Americas and beyond,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 104, no. 47, pp. 18566–18570, 2007.
- [48] D. M. Junqueira and S. E. de Matos Almeida, “HIV-1 subtype B: Traces of a pandemic,” *Virology*, vol. 495. pp. 173–184, 2016.
- [49] M. Cabello, Y. Mendoza, and G. Bello, “Spatiotemporal dynamics of dissemination of non-pandemic HIV-1 subtype B clades in the caribbean region,” *PLoS One*, vol. 9, no. 8, 2014.
- [50] M. Cabello, D. M. Junqueira, and G. Bello, “Dissemination of nonpandemic Caribbean HIV-1 subtype B clades in Latin America.,” *AIDS*, vol. 29, no. 4, pp. 483–92, 2015.
- [51] G Bello; Guimaraes, M. L.; Morgado, “Evolutionary history of HIV-1 subtype B and F infections in Brazil.,” *AIDS*, vol. 20, no. 5, pp. 763–8, 2006.
- [52] G. Bello *et al.*, “Demographic history of HIV-1 subtypes B and F in Brazil,” *Infect. Genet. Evol.*, vol. 7, no. 2, pp. 263–270, 2007.
- [53] D. Mir, M. Cabello, H. Romero, and G. Bello, “Phylodynamics of major HIV-1 subtype B pandemic clades circulating in Latin America.,” *AIDS*, vol. 29, no. 14,

- pp. 1863–1869, 2015.
- [54] E. Darcissac *et al.*, “HIV-1 *Pol* Gene Polymorphism and Antiretroviral Resistance Mutations in Treatment-Naive Adult Patients in French Guiana Between 2006 and 2012,” *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, vol. 0, no. 0, p. aid.2016.0048, 2016.
- [55] F. Abdoel Wahid, R. Sno, E. Darcissac, A. Lavergne, M. R. Adhin, and V. Lacoste, “HIV-1 Genetic Diversity and Drug Resistance Mutations Among Treatment-Naive Adult Patients in Suriname.,” *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, 2016.
- [56] et al. de Oliveira T, Deforche K, Cassol S, Salminen M, Paraskevis D, Seebregts C, “An automated genotyping system for analysis of HIV-1 and other microbial sequences.,” *Bioinformatics*, vol. 21, pp. 3797–3800, 2005.
- [57] A. B. Abecasis *et al.*, “Comparative performance of the REGA subtyping tool version 2 versus version 1,” *Infect. Genet. Evol.*, vol. 10, no. 3, pp. 380–385, 2010.
- [58] S. Guindon and O. Gascuel, “A Simple, Fast, and Accurate Method to Estimate Large Phylogenies by Maximum Likelihood,” *Syst. Biol.*, vol. 52, no. 5, pp. 696–704, 2003.
- [59] S. Guindon, F. Lethiec, P. Duroux, and O. Gascuel, “PHYML Online - A web server for fast maximum likelihood-based phylogenetic inference,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 33, no. SUPPL. 2, 2005.
- [60] D. Posada, “jModelTest: Phylogenetic model averaging,” *Mol. Biol. Evol.*, vol. 25, no. 7, pp. 1253–1256, 2008.
- [61] M. Anisimova and O. Gascuel, “Approximate likelihood-ratio test for branches: A fast, accurate, and powerful alternative.,” *Syst Biol*, vol. 55, no. 4, pp. 539–552, 2006.
- [62] A. Rambaut, “FigTree v1. 3.1: Tree figure drawing tool,” *Website <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>*, 2009.
- [63] A. J. Drummond and A. Rambaut, “BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees.,” *BMC Evol. Biol.*, vol. 7, no. 1, p. 214, 2007.
- [64] A. J. Drummond, A. Rambaut, B. Shapiro, and O. G. Pybus, “Bayesian coalescent inference of past population dynamics from molecular sequences,” *Mol. Biol. Evol.*, vol. 22, no. 5, pp. 1185–1192, 2005.
- [65] A. J. Drummond, S. Y. W. Ho, M. J. Phillips, and A. Rambaut, “Relaxed

- phylogenetics and dating with confidence,” *PLoS Biol.*, vol. 4, no. 5, pp. 699–710, 2006.
- [66] P. Lemey, A. Rambaut, A. J. Drummond, and M. A. Suchard, “Bayesian phylogeography finds its roots,” *PLoS Comput. Biol.*, vol. 5, no. 9, 2009.
- [67] A. Rambaut and A. J. Drummond, “Tracer,” Available from <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>. 2007.
- [68] F. Bielejec, A. Rambaut, M. A. Suchard, and P. Lemey, “SPREAD: Spatial phylogenetic reconstruction of evolutionary dynamics,” *Bioinformatics*, vol. 27, no. 20. pp. 2910–2912, 2011.
- [69] et al Borland R, “HIV/AIDS and mobile populations in the Caribbean: a baseline assessment,” *Int. Organ. Migr.*, 2004.
- [70] Stéphane Ganger, “<http://confins.revues.org/>,” <http://confins.revues.org/>.
- [71] V. Leonardi, “Fronteiras Amazônicas do Brasil: saúde e história social.” Brasília: Paralelo 15 São Paulo: Marco Zero 2000
- [72] Arouck R, “Brasileiros na Guianafrancesa. Novas migrações internacionais ou exportação de tensões sociais na Amazônia [em Portugues],” *.Lusotopie:67–78*. Available:[http:// www.lusotopiesciencespobordeauxfr/arouckpdf.](http://www.lusotopiesciencespobordeauxfr/arouckpdf.), 2000.
- [73] de Souza Pinto MJ Soares CL, de Souza Oliveira B, “Trabalhadores brasileiros na Guiana Francesa: entre a invisibilidade e o desemprego (em Portugues).,” *Pr. Curso de Ciências Sociais da UNIFAP 4129–142*. Disponível [https://periodicosunifapbr/indexphp/ Pr.](https://periodicosunifapbr/indexphp/Pr.), 2011.
- [74] Martins CC, “Migração transfronteiriça na Amazônia: Brasileiros na Guiana Francesa(em Portugues).,” *.Anais do III Simpósio de Pós-Graduação em Relações Internacionais do Programa “San Tiago Dantas” (UNESP, UNICAMP e PUC/SP)* Disponível [:http://www.unespbr/santiagodantassp.](http://www.unespbr/santiagodantassp.), 2011.
- [75] PereiraMC, “Processos migratórios na fronteira Brasil-Guiana (em Portugues).,” *.Estudos Avançados 20:209–219*. disponível [:http://www.scielo.br/pdf/ea/v20n57/a16v2057pdf.](http://www.scielo.br/pdf/ea/v20n57/a16v2057pdf.), 2006.
- [76] Corbin HP, “Brazilian migration to Guyana as a livelihood strategy: a case study approach,” Disponível [:http://www.repositoriufpabr/jspui/bitstream/2011/1966/1/Dissertacao_BrazilianMigrationGuyanapdf.](http://www.repositoriufpabr/jspui/bitstream/2011/1966/1/Dissertacao_BrazilianMigrationGuyanapdf.), 2007.
- [77] H. DeTheijeM, “Moving Frontiers in the Amazon: Brazilian Small-Scale Gold

- Miners in Suriname. *European Review of Latin American and Caribbean Studies*:5–25. *Disponível*
[:http://www.cedla.uva.nl/50_publications/pdf/revista/87RevistaEuropea/87-DETHEIJE&HEEMSKERK-ISSN0924-0608.pdf](http://www.cedla.uva.nl/50_publications/pdf/revista/87RevistaEuropea/87-DETHEIJE&HEEMSKERK-ISSN0924-0608.pdf)., 2009.
- [78] D. Heemskerk M, “Suriname Migration Profile: a study on emigration from, and immigration into Suriname.” *International Organization for Migration (IOM)* *Disponível* http://www.migration-eulaceu/documents/keydocs/MP_Surinam/MP_Suriname.pdf., 2014.
- [79] dos Santos RO Diniz AMA, “O vertiginoso crescimento populacional de Roraima e seus impactos socio ambientais(em Portugues).” *Cad. 1523–44.*, 2005.
- [80] Vale A L F, “Imigração de nordestinos para Roraima (em Portugues).” *.Estudos Avançados 20 255–261. Disponível* <http://www.scielo.br/pdf/ea/v20n57/a19v2057.pdf>., 2006.

ANEXO