

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas

**Associação da mutação K65R com Subtipo C do HIV-1 em pacientes com falha virológica no Brasil: um estudo transversal do Sistema Nacional de Genotipagem (SISGENO)**

Ronaldo Campos Hallal

Porto Alegre

2019

Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Faculdade de Medicina  
Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas

**Associação da mutação K65R com Subtipo C do HIV-1 em pacientes com falha virológica  
no Brasil: um estudo transversal do Sistema Nacional de Genotipagem (SISGENO)**

Ronaldo Campos Hallal  
Ingresso em março de 2017

Orientador: Prof. Dr. Diego Rodrigues Falci  
Dissertação de tese apresentada como requisito parcial para obtenção de Mestre em Medicina:  
Ciências Médicas, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-  
Graduação em Medicina: Ciências Médicas

Porto Alegre  
2019

## **AGRADECIMENTOS**

**Ao Ministério da Saúde pela disponibilização de sua base de dados, que foi utilizada para as análises que compõe esta dissertação.**

**À Alexsana Sposito, que esteve sempre disposta a auxiliar meu acesso às informações.**

**Nêmora Barcellos, Maria Letícia Ikeda e Jussara Silveira por compartilharem as formulações que deram origem a este projeto.**

**Ricardo Kuchenbecker, com quem compartilho reflexões sobre a epidemia de Aids e cujo apoio ajudou no amadurecimento desta dissertação.**

**Anderson Alvarenga, sempre gentil e disponível para apoiar a produção dos dados.**

**A Otávio Hallal Ferreira Raro, meu afilhado, pela amizade, carinho e permanente disponibilidade para me socorrer na organização da dissertação e do artigo.**

**Ao meu orientador, Diego Rodrigues Falci, mais que orientador, sempre solidário para acolher e indicar os caminhos que viabilizaram estas análises, amigo para todas ocasiões.**

**A todos aqueles que buscam construir a utopia de um mundo livre, justo, generoso e inclusivo, com muita poesia e sem violência.**

## RESUMO

**Base teórica:** O Rio Grande do Sul se caracteriza por padrões epidemiológicos específicos, no que diz respeito a transmissão, prevalência e mortalidade. Possui como característica, a circulação predominante do Subtipo C do HIV-1, pouco observado em outros estados. Este subtipo viral possui predisposição para emergência mais rápida e frequente da mutação K65R, a qual reduz a atividade da classe de Inibidores Nucleosídios da Transcriptase Reversa (INTR), exceto da zidovudina (AZT).

**Objetivo:** Examinar a associação do Subtipo C e variáveis sócio demográficas com a mutação K65R em pacientes em falha virológica.

**Métodos:** Análise de uma grande base de dados do Sistema Nacional de Genotipagem (SISGENO) do Ministério da Saúde, incluímos pacientes em falha virológica que realizaram testes de genotipagem no período 2010-2017. Identificamos os subtipos virais circulantes, a prevalência da mutação K65R e fatores sócio-demográficos. Testamos a associação destas variáveis utilizando testes de qui-quadrado e utilizamos um modelo multivariado de regressão logística para medir o efeito do subtipo C na prevalência da mutação K65R, ajustando para outros fatores que podem estar associados com sua ocorrência.

**Resultados:** Identificamos na base de dados, 58.155 pacientes que haviam realizado genotipagem no período. Excluímos gestantes, indivíduos com idade inferior a 16 anos e testes sem data de resultado, permanecendo com uma amostra de 32.111 pacientes em falha virológica. Subtipo B (72%) e subtype C (14%) foram os mais frequentes no Brasil. Subtipo B foi o mais prevalente em todas regiões, exceto na região sul, onde o subtipo C chegou a taxa de 48%. O estado de Santa Catarina apresentou a maior taxa entre os estados. Também observamos uma expansão do subtipo C para a região Centro-oeste, Ceará, Bahia e Rondônia. A prevalência da mutação K65R foi de 6,1% no período e aumentou ao longo do tempo. Na análise multivariada, encontramos associação independente da mutação K65R com subtipo C, sexo masculino e maior nível educacional.

**Conclusões:** O subtipo C é o mais prevalente na região sul do Brasil e está se expandindo para a região Centro-oeste e outros estados. Encontramos uma associação independente entre a mutação K65R e subtipo C, gênero masculino e maior nível educacional. Este é o primeiro estudo que encontrou associação entre subtipo C e K65R em uma grande amostra de pacientes brasileiros.

**Palavras chave:** "HIV-1"; "Subtipo C"; "K65R"; "tratamento antirretroviral"; "resistência"

## **ABSTRACT**

**Background:** HIV-1 subtype B is the most prevalent HIV subtype in Brazil, except in South region where subtype C predominates. A possible association between subtype C and K65R mutation have been proposed. This mutation can reduce the antiviral activity of inhibitors transcriptase reverse nucleoside (INTR), particularly tenofovir.

**Objective:** To evaluate the association between HIV-1 subtype C and K65R mutation in patients with virological failure in Brazil.

**Methods:** We analysed a large public dataset from the Ministry of Health, of patients undertaking genotypic tests during virological failure. Descriptive statistics were used to describe HIV-1 subtypes distribution, prevalence of K65R mutation and sociodemographic factors. Association between K65R mutation and socio-demographic factors, and HIV-1 subtypes were tested using chi-square tests. A multivariate logistic regression model measured the effect of subtype on the prevalence of K65R, adjusting for other factors significantly associated with its occurrence.

**Results:** Results: We found 58,155 patients with available genotypic tests in the dataset. Excluding pregnant females and patients under 16 years old, we included 32,11 patients with virological failure. Subtype B (72%) and Subtype C (14%) was the more common clades in Brazil. Subtype B was the most prevalent in all regions, except in South Region, that Subtype C reached 48%. Santa Catarina State had the most prevalence of Subtype C. We also identified its expansion to Center-west Region, Ceará, Bahia and Rondônia. The K65R prevalence in Brazil was 6,1% increasing overtime. In a univariate analysis, we found a subtype C association with female gender, ethnicity and K65R mutation. In a multivariate analysis, we found a independent association between K65R mutation and subtype C, male gender and higher educational level.

**Conclusion:** Subtype C is the most prevalent subtype in Brazilian South, and is expanding to Center-west and other states. We found a independent association between K65R mutation and subtype C, male gender and higher educational level. This is the first study in Brazil with a large sample that found an association between Subtype C and K65R mutation.

**Keywords:** HIV-1; Subtype C; Clade C; K65R mutation; virological failure; resistance;

## **LISTA DE FIGURAS**

Figura 1 – Estratégias para localizar e selecionar as informações

Figura 2 – Distribuição global de pessoas vivendo com HIV ou Aids, 2018.

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

Aids – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

AZT – zidovudina

ddl – didanosina

d4T – estavudina

EFZ - efavirenz

3TC – lamivudina

NVP - nevirapina

TDF - tenofovir

HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana

HIVBResNet - Brazilian Network for HIV Drug Resistance Surveillance Resistance

INTR - Inibidores Nucleosídeos da Transcriptase Reversa

INNTR - Inibidores Não Nucleosídeos da Transcriptase Reversa

IP - Inibidores da Protease

MS – Ministério da Saúde

TARV- Tratamento antirretroviral

OMS – Organização Mundial de Saúde

SVS – Secretaria de Vigilância em Saúde

RS - Rio Grande do Sul

SC- Santa Catarina

UDS - Ultra-Deep Sequencing

UNAIDS – Escritório das Organizações das Nações Unidas para Aids

## SUMÁRIO

1-Introdução .....	9
2- Revisão da Literatura .....	10
2.1- Estratégias para localizar e selecionar as informações .....	10
2.2- Epidemiologia .....	11
2.3- Vigilância da diversidade genética do HIV-1 no Brasil .....	13
2.4- Subtipo C e mutações de resistência .....	14
2.4.1- Subtipo C e mutação K65R .....	14
2.4.2- Subtipo C e seleção de K65R na primeira linha de tratamento: associação com uso de INTR .....	15
2.4.3- Subtipo C e Mutações a Análogos Timidínicos (TAM): associação com uso de INTR .....	17
2.4.4- Mutações a INNTR e Subtipo C: associação com uso de INNTR .....	18
2.4.5- Subtipos virais e risco de falha virológica .....	18
2.4.6- Subtipos virais, falha virológica e padrões mutacionais .....	19
2.4.7- Aspectos étnicos e acesso a serviços de saúde .....	20
3- Marco Conceitual .....	22
4- Justificativa .....	22
5- Objetivos .....	23
5.1- Objetivo principal .....	23
5.2- Objetivos específicos .....	23
6- Referências .....	23
7- Artigo .....	32
8- Considerações Finais .....	47
9- Perspectivas Futuras .....	48
10- Strobe .....	49
11- Anexos .....	53



## **1-Introdução**

Rio Grande do Sul (RS) e Santa Catarina (SC) são os estados brasileiros com maiores taxas de detecção de casos de Aids e transmissão vertical, além disso, onze de seus municípios estão entre aqueles que tem mais de 100 mil habitantes e maior carga de doença (1).

Estima-se que a prevalência da infecção pelo HIV no RS seja de 0.8% na população em geral, correspondendo ao dobro da prevalência nacional além de uma concentração de casos nos grandes centros urbanos, como a Região Metropolitana de Porto Alegre (2).

A circulação do subtipo C do HIV-1, é um dos fatores que vem sendo associado à gravidade da epidemia no sul do Brasil, considerada a mais grave do país. Estudos prévios sugerem que o subtipo C possui propensão para o desenvolvimento de mutação na posição 65 da transcriptase reversa, devido ao polimorfismo de nucleotídeos (3). Estudos clínicos realizados em regiões com elevados níveis de prevalência do subtipo C, encontraram associação com a mutação K65R, especialmente em pacientes tratados com tenofovir (3–7).

O objetivo deste estudo é analisar, em uma grande base de dados do Ministério da Saúde, o Sistema Nacional de Genotipagem (SISGENO), a prevalência da mutação K65R e investigar sua associação com Subtipo C.

## 2- Revisão da Literatura

### 2.1- Estratégias para localizar e selecionar as informações

Realizou-se uma revisão a respeito do padrão específico de resistência ao tratamento que envolve o Subtipo C do HIV-1, sua associação com a mutação K65R da transcriptase reversa, fatores relacionados a falha virológica e perfil mutacional. Não houve limitação em relação ao período de busca.

Foi realizada uma busca no Pubmed, além de consulta a outras bases de dados, como Scielo e *sítes*, tais como da Organização Mundial de Saúde (OMS), Seção das Nações Unidas para Aids (UNAIDS), Ministério da Saúde do Brasil (MS), Secretaria Estadual de Saúde do Rio grande do Sul (SES), com objetivo de identificar dados e documentos.

A primeira busca no Pubmed incluiu os descritores “HIV” AND “Subtype C OR “CLADE C”, foram encontradas 3.354 publicações. A inclusão do descritor “tenofovir resistance”, ocasionou redução para 1.689 publicações e com a adição do descritor “K65R”, identificou-se 427 publicações. A definição dos descritores “HIV-1” AND (“Subtype C OR CLADE C”) AND “tenofovir resistance” AND “K65R”, estabeleceu a identificação de 79 publicações.

Conforme demonstrado na Figura 1, a busca foi realizada com os seguintes descritores: (((("tenofovir"[MeSH Terms] OR "tenofovir"[All Fields]) AND resistance[All Fields]) OR K65R[All Fields]) AND ((("hiv"[MeSH Terms] OR "hiv"[All Fields]) AND ((Subtype[All Fields] AND C[All Fields]) OR (Clade[All Fields] AND C[All Fields])))

Foram deletadas e revisadas 79 publicações e definimos como elegíveis ensaios clínicos, estudos de coorte, estudos transversais, revisões sistemáticas e metaanálises que associaram subtipos virais, em especial Subtipo C, com observação da mutação/ K65R, em pacientes com falha virológica a esquemas de primeira linha de tratamento.

Adicionalmente, revisamos estudos de prevalência que incluíram pacientes virgens de tratamento, uma vez que permitiam estabelecer uma possível relação entre subtipo C e presença da mutação K65R pré-tratamento.

No final, selecionamos 41 e excluímos 38 publicações, por diversas razões, de forma geral, devido a abordagem a temas diferentes do objeto deste trabalho, tais como desenvolvimento de testes laboratoriais de detecção de resistência (5), modificações em algoritmos de resistência (2) , concentração de antirretrovirais *in vitro*, resistência antirretroviral, uso de novos antirretrovirais ou esquemas de resgate (8), estudos estritamente virológicos (16), população com idade inferior a 16 anos (1), estudos em animais (1) ou por razões diversas (5).

Também foram analisadas publicações que poderiam contribuir com o assunto, seja pelo conhecimento da equipe ou em discussões com *experts* do tema.

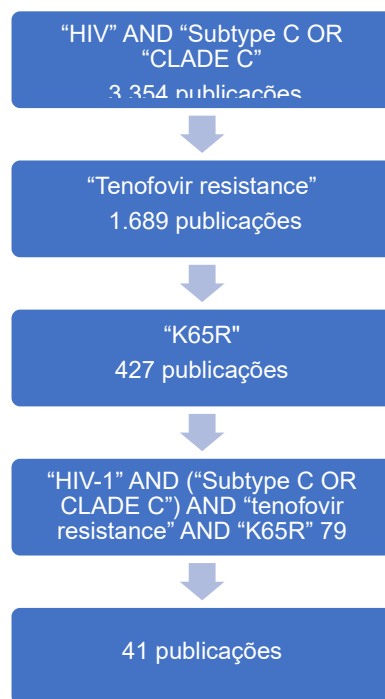


Figura 1- Estratégia de busca e seleção das publicações para revisão da literatura.

## 2.2- Epidemiologia

A organização Mundial de Saúde, estima 37,8 milhões de pessoas vivendo com HIV ou Aids em 2018, quase 26 milhões delas estão no continente africano (World Health Organisation. HIV/AIDS Data and Statistics; 2018 [internet] Genebra [Acessado em 02/11/2019]. Disponível em <https://www.who.int/hiv/data/en/>). A prevalência global estimada é de 0,8/100.000 habitantes, na África chega a 3,9 e nas Américas se situa em 0,4/100.000 (<http://apps.who.int/gho/data/view.main.22500WHOREG?lang=en>).

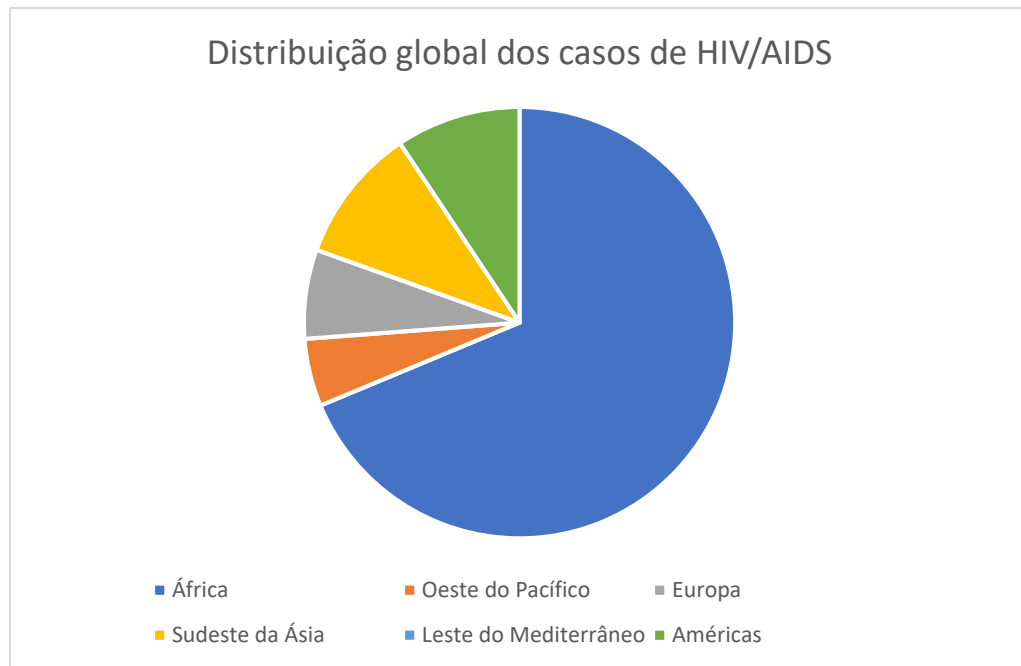


Figura 2- Distribuição global de pessoas vivendo com HIV ou Aids, 2018. World Health Organisation. HIV/AIDS Data and Statistics; 2018. Geneva [acessado em 02/11/2019].  
(Disponível em <https://www.who.int/hiv/data/en/>)

Foram descritos três grupos do HIV-1: *Major* (Grupo M), *Outlier* (Grupo O) e *Non-Major e Non-Outlier* (Grupo N). O Grupo M emergiu e se expandiu no Oeste da África, atualmente é dividido em subtipos (A, B, C, D, E, F, G...) e subsubtipos (A1-A4, F1-F2...), que possuem relação filogenética, epidemiológica e geográfica (8). Os subtipos podem também dar origem a misturas identificadas pelo sequenciamento do genoma viral e denominadas formas recombinantes (CRF) e formas recombinantes únicas (URF), quando ocorrem em apenas um indivíduo (8).

A epidemia de Aids pode ser classificada como concentrada, quando apresenta prevalência inferior a 1% na população em geral, e maior contribuição epidemiológica de grupos populacionais específicos, tais como como homens que fazem sexo com homens (HSH), profissionais do sexo ou usuários de drogas (9). A prevalência na população em geral, habitualmente é estabelecida por resultados de estudos em gestantes e parturientes; no Brasil também são utilizados resultados de estudos em conscritos, caracterizando a prevalência entre mulheres e homens, respectivamente.

A Epidemia Generalizada, por sua vez, é aquela que está bem estabelecida na população em geral, atingindo prevalência superior a 1% e patamares ainda mais elevados nas populações vulneráveis (10).

Na região metropolitana de Porto Alegre observa-se, desde 1980, diminuição da transmissão homossexual e bissexual e aumento progressivo da transmissão heterossexual, chegando a atingir 45% das novas transmissões, no período entre 2001 e 2015 (11). Em 2014, a prevalência da infecção pelo HIV em gestantes e parturientes no Rio Grande do Sul era de 2,0% (12), identificando-se, portanto, critérios que a classificam como Epidemia Generalizada, sobretudo quando considerada em conjunto com as elevadas taxas de prevalência, transmissão

vertical, seu padrão de transmissão heterossexual com elevados patamares de mortalidade.

A rota de introdução do Subtipo C no Brasil, provavelmente ocorreu a partir de uma única população viral oriunda do Burundi, no Oeste da África (13), embora exista a hipótese de sua origem na Índia e os vírus recombinantes gerados localmente, ao invés de introdução externa (14). Nos últimos anos, foi descrito um recombinante dos subtipos B e C, denominado CRF31\_BC, cujo aparecimento possivelmente ocorreu após a entrada do subtipo C na região sul do Brasil (15).

Análises por reconstrução filogenética, sugerem que o Subtipo C tenha chegado ao RS no sentido de Florianópolis para Porto Alegre (16) e o fluxo populacional tenha acarretado sua circulação entre os municípios da Região Metropolitana de Porto Alegre (17).

Chama a atenção, a alta contribuição da transmissão por uso injetável de drogas, que atingiu 23% das notificações de Aids no período entre 1991 a 2000. (11), bem mais elevada que o observado nos outros estados. Em 2009, a prevalência do Subtipo C entre usuários de drogas injetáveis (UDI), era de 86% no sul do Brasil (18), possivelmente este grupo contribuiu para a expansão do Subtipo C através de um padrão de transmissão heterossexual, estabelecendo “pontes” para a população em geral e uma conformação de Epidemia Generalizada na Região Metropolitana de Porto Alegre.

### **2.3- Vigilância da diversidade genética do HIV-1 no Brasil**

O Ministério da Saúde realiza periodicamente, estudos de vigilância molecular do HIV no Brasil (*Brazilian Network for HIV Drug Resistance Surveillance Resistance - HIVBResNet*), realizando testes de genotipagem em amostras de pacientes virgens de tratamento, com a finalidade de monitorar a evolução e distribuição de subtipos virais e resistência transmitida no país.

Entre 535 amostras coletadas em 2001, o subtipo B foi o mais prevalente (62,5%), seguido do Subtipo C (8%), exceto pelo RS que mostrou cenário diverso: o Subtipo C foi encontrado na maioria (44.8%) de 139 amostras (19). No período 2007-2008, com amostra menor (N=210), novamente houve predomínio nacional do subtipo B (72%), oposto da situação em Porto Alegre, capital em que Subtipo C foi encontrado em 69% de 34 amostras (20), sugerindo seu estabelecimento no sul do país.

Entre 2013 e 2015, o Subtipo B se manteve como mais prevalente (66,8%), em uma amostra de 1.568 pacientes virgens de tratamento, seguido pelo Subtipo C (14%), mais uma vez a exceção foi o sul, região que observou-se sua expansão, atingindo quase 54% entre 147 amostras, seguido pelo subtipo B em 84 (30,8%), mostrando ainda o estabelecimento do recombinante CRF31\_BC, presente em 22 (8%) e subtipo F em 9 (3,3%) (21).

Em 18.849 sequências genômicas de pacientes em falha virológica, coletadas entre 2001 e 2009, a distribuição de subtipos no Brasil foi semelhante: o Subtipo B foi o mais prevalente (75,3%), seguido pelos Subtipos Recombinantes B/F (12,2%), Subtipo C (5,8%), F (5,3%) e Recombinantes B/C (1,5%), exceto no sul, região em que os Subtipos B e C representaram, respectivamente, 42,5% e 34,5% (22).

Outros estudos transversais realizados em municípios da região sul, também chamaram a atenção para o estabelecimento do Subtipo C. Em 2004 e 2005, entre 128 pessoas recém diagnosticadas em Porto Alegre, foi observado predomínio do Subtipo C (29%), estabelecimento do recombinante CRF31\_BC (23.4%) e Subtipo B identificado em taxas semelhantes (22.6%) (21). Na região metropolitana de Porto Alegre, o Subtipo C também tem emergido como principal subtipo circulante: entre 80 amostras do município de Canoas, foi encontrado em 43,8%, o recombinante CRF31\_BC em 35% e subtipo B em apenas 18,8% (23).

No município de Rio Grande, cidade portuária, a identificação do Subtipo C atingiu 56% de 245 amostras de pessoas diagnosticadas entre 2005 e 2008, com uma associação significativa com transmissão heterossexual (17).

O estado de Santa Catarina, mostra situação semelhante a do RS. Análise genotípica de amostras coletadas entre 2002 e 2008, em um Centro de Testagem e Aconselhamento (CTA) em Itajaí, identificou predomínio do Subtipo C, tanto em 38 infecções recentes (71%), quanto em 38 “infecções cronicamente estabelecidas” (76%) (24).

#### **2.4- Subtipo C e mutações de resistência**

A diversidade genética do HIV, pode representar uma barreira para o controle da epidemia de Aids, já que os conceitos sobre prevenção, tratamento e resistência viral foram estabelecidos tendo-se como base os conceitos e evidências provenientes do Subtipo B (3). É possível que a progressão da infecção para Aids e morte, pode ser influenciada pela presença de subtipos específicos (25), embora o papel da falha virológica e o desenvolvimento de padrões de resistência específicos aos subtipos, seja um tema ainda controverso. Alguns dados, sugerem que a resistência do HIV-1 não ocorre na mesma magnitude entre todos seus subtipos, ainda que se tenha semelhante pressão seletiva, imposta pelos mesmos esquemas de tratamento, talvez em decorrência da existência de vias mutacionais específicas aos subtipos virais (26,27).

##### **2.4.1- Subtipo C e mutação K65R**

Em cultura de células, o subtipo C apresenta um padrão de “assinatura” específico de polimorfismo de nucleotídeos nas posições 64, 65 e 66 da transcriptase reversa<sup>13</sup>. Ainda que quase todos Subtipos não-B tenham semelhante padrão de nucleotídeos nos códons 64 a 66 (28), o prolongamento da poliadenina entre as posições 63 e 65 do Subtipo C, acarreta um modelo de deslizamento e pausa na posição 65 (29), que desloca o nucleotídeo e determina baixa barreira genética de resistência.

A consequência, é a substituição de uma lisina por uma arginina, desenvolvendo assim a mutação K65R, de forma geral, selecionada pela exposição do subtipo C ao tenofovir (TDF), com maior frequência do que observado com subtipo B (3). Este modelo estabelece maior propensão para emergência mais rápida e frequente da mutação K65R com o subtipo C, por esta razão considerada, por alguns autores, uma mutação “subtipo dependente” (3).

O aparecimento da substituição de aminoácidos neste códon da transcriptase reversa acarreta em diminuição da atividade antiviral do TDF, abacavir (ABC), estavudina (d4T),

didanosina (ddl) e lamivudina (3TC) (30).

Em crianças recentemente infectadas pelo subtipo C, a mutação K65R pode ser gerada em níveis até 4 vezes superiores àqueles observados em gestantes cronicamente infectadas, o que mostra sua influência para produção espontânea de mutações na posição 65, sugerindo que esta região da transcriptase reversa, seja um “hot spot” para mutagênese no Subtipo C (31).

Baixos níveis de K65R são mais encontrados no Subtipo C do que no Subtipo B em pacientes virgens de tratamento, quando se utiliza testes de genotipagem com alta sensibilidade para populações virais minoritárias, como *ultra-deep sequencing* (UDS) (32). Na avaliação prospectiva, utilizando-se UDS, pacientes com Subtipo C virgens de tratamento e reavaliados em sua falha virológica, a K65R foi a mutação mais frequentemente identificada, ocasionando algum nível de resistência a INTR (33). Entretanto, estudos que utilizam métodos convencionais de genotipagem, como aqueles empregados na vigilância da resistência transmitida no Brasil, mostram que a prevalência de K65R em pacientes virgens de tratamento é inferior a 1% (19–21).

De fato, análises genotípicas em populações virgens de tratamento, mostram baixas taxas de K65R. Uma análise de uma base de dados de 19.823 sequências coletadas antes de 2010, provenientes de pacientes virgens de tratamento oriundos de todos continentes, cujos subtipos mais prevalentes foram o Subtipo B (N= 9.783) e C (N= 3.198), observou 20 amostras com presença de K65R (0.1%,) e não houve associação com o subtipo viral (34). Resultado semelhante foi observado na África do Sul, em 352 sequências coletadas em 2010, em uma população de mulheres virgens de tratamento e infectadas pelo Subtipo C (35). As baixas prevalências de K65R, observadas em pessoas infectadas pelo Subtipo C e não expostas ao tratamento, também são observadas em outros subtipos Não-B (36,37).

Entretanto, desde o final da década de 90, vem se observando aumento na circulação de K65R entre pacientes que desenvolvem falha virológica. Na América do Norte, entre 62.200 sequências, observou-se aumento na prevalência da K65R, a qual variou entre 0,4% em 1998 e 3,6% em 2003 (38). Uma Revisão Sistemática de estudos que incluíram pacientes em falha virológica a esquemas de primeira linha, indicou aumento progressivo da circulação de K65R na Índia, desde seu surgimento em 2004, atingindo prevalência de 15% em 2014 (39).

A incidência cumulativa desta mutação em uma grande base de dados britânica, constituída por 6.149 sequências compostas por diversos subtipos (Subtipo B= 4.123, Subtipo C= 823 e Subtipo Não-B/C = 1.203), mostrou associação da presença de K65R com Subtipo C (4), sua frequência chegou a atingir o dobro daquela observada no Subtipo B e Não-B/C (7,40)

Recentemente, a mutação E138A, que determina resistência a rilpivirina, também foi significativamente associada ao Subtipo C, comparado ao Subtipo B, incluindo pacientes virgens e expostos ao tratamento antirretroviral (41).

#### **2.4.2- Subtipo C e seleção de K65R na primeira linha de tratamento: associação com uso de INTR**

Existe maior probabilidade de identificar-se K65R na presença do subtipo C em relação

ao subtipo B, quando há exposição ao TDF em combinação a ABC ou ddl (5). Entre os INTR, o TDF exerce a mais forte pressão seletiva para aparecimento de K65R em pessoas infectadas pelo subtipo C, sua ocorrência chega a ser cinco vezes superior em relação a exposição a outros INTR (7). Já uma análise retrospectiva de pacientes sul-africanos infectados pelo subtipo C, em uso de TDF/3TC/INNTR, identificou K65R em taxa extremamente elevada, atingindo 69,7% (23 entre 33) das sequências analisadas (42).

Análise de uma amostra de 40 sequências - entre 270 que haviam desenvolvido falha virológica - de pacientes infectados pelo subtipo C e que haviam realizado genotipagem quando estavam em uso de TDF (tendo uma mediana de 152 dias de exposição ao TDF antes da identificação da falha) em substituição a AZT ou d4T, em esquemas de combinação com 3TC e INNTR, K65R foi identificada em 5 (12%) das genotipagens analisadas (43). Resultado semelhante foi obtido entre 69 sequências de genotipagens de sul-africanos provenientes da zona rural, majoritariamente infectados pelo Subtipo C (94,2%), tendo sido TDF o INTR mais utilizado: foram observadas mutações a INTR em 60,8% dos pacientes e apenas 12,0% apresentaram K65R (44).

Ao comparar TDF e AZT, em combinação com 3TC e INNTR (N=844), observou-se entre 80 sequências de pacientes infectados pelo subtipo C em falha virológica após 12 meses de tratamento, presença de K65R em 22,5% e significativamente associada ao uso de TDF em relação ao uso de AZT (45). Também quando comparado ao d4T, o aparecimento de K65R é mais associado ao TDF: em sul-africanos infectados pelo subtipo C e tratados com TDF (N=80) ou d4T (N=80) em combinação com 3TC e INNTR, a mutação K65R foi observada cinco vezes mais frequentemente naqueles expostos a TDF (58%) em relação a d4T (14%) (46).

Por outro lado, também já foi estabelecida a associação do uso de d4T com surgimento de K65R e subtipo C: pacientes de Botswana tratados com d4T combinado a ddl e nevirapina ou efavirenz, com mediana de 8 meses de tratamento, observou-se K65R em 30% (7/23) dos casos (47).

Uma análise de 338 sequências genotípicas de nigerianos em falha virológica e infectados por subtipos Não-B/C, tratados preferencialmente com d4T ou AZT em esquemas de combinação com 3TC e INNTR (apenas 12% tiveram exposição prévia a TDF), identificou K65R em somente 37 pacientes (10,9%), destes, 64,8% (24/37) haviam sido expostos a TDF e 35,2% (13/37) haviam recebido d4T ou AZT (48). Já entre 1.825 sequências genotípicas de 35 estudos, 65% das genotipagens provenientes da população africana - cujo esquema de primeira linha era d4T/3TC/NVP (67%) ou d4T/3TC/EFV (33%) - e os subtipos mais comuns foram Subtipo C (42.3%), CRF01\_AE (23.6%), CRF02\_AG (9.0%) e B (7.2%), a presença de K65R foi associada apenas com CRF01\_AE, já a presença da mutação K65R combinada ou não à mutação Q151M, foi associada com Subtipo C e CRF01\_AE (6).

Por outro lado, a mutação K65R pode ser detectada em pacientes infectados pelo Subtipo C, ainda que não tenham sido expostos ao uso de TDF, desde que submetidos a pressão seletiva estabelecida por outros INTR (48). Em 65 pacientes infectados pelo Subtipo C que usavam AZT, d4T ou ddl associado a INNTR ou IP/r, a mutação K65R foi identificada em 14%



das sequências (49).

Além do TDF e do d4T, o ABC associado ou não ao ddl, também pode induzir o aparecimento da mutação K65R, em subtipos Não-B, com mais frequência do que se observa com Subtipo B (50).

É possível que o Subtipo C possua uma predisposição para aparecimento da K65R. Por outro lado, existe um efeito ocasionado pela exposição prolongada a terapia sub ótima e permanência em falha virológica por períodos prolongados, já que os estudos que mostraram baixa frequência da K65R, ofereciam controle virológico frequente e utilizavam AZT entre a dupla de nucleosídeos (51).

#### **2.4.3- Subtipo C e Mutações a Análogos Timidínicos (TAM): associação com uso de INTR**

Mutações denominadas TAM - M41L, D67N, K70R, L210W, T215Y/F e K219Q/E – reduzem a sensibilidade a todos INTR (30), com maior impacto à medida que há acúmulo destas mutações (52). O aparecimento das mutações D67N, K70R e T215Y é associado ao uso de AZT e d4T e são observadas com maior frequência no subtipo B do que no subtipo C (53). O uso de AZT, d4T ou ddl em 65 pacientes com subtipo C, acarretou na identificação das seguintes TAM: D67N (32%), T215Y/F (25%), K70R (21%), M41L (20%), K219Q/E (14%) (49).

Existe uma forte associação negativa entre a presença de K65R e TAM (M41L, D67N, L210W, T215Y/F e K219Q/E), sugerindo antagonismo bidirecional entre estes padrões mutacionais (38,48,50)., entretanto se observa, em subtipos Não-B (48), presença de K65R com outras mutações a INTR, como ocorre em relação ao complexo Q151M (38,48). O que parece ocorrer, é o estabelecimento de padrões distintos de mutações de resistência a INTR, em pacientes infectados por subtipos Não-B: observa-se as mutações A62V, Y115F, Q151M, T69del e 219R na presença da mutação K65R, por outro lado, observa-se as mutações M184V e TAM (M41L e K219Q) na sua ausência (48), indicando antagonismo entre K65R e TAM também em Subtipos Não-B.

No subtipo C, pode ser observado padrão semelhante quando há exposição a AZT ou d4T, ocasionando na presença de TAM e raramente na observação de K65R (54). Tratamento com AZT e ddl pode ocasionar no aparecimento de vias mutacionais distintas daquelas observadas em relação ao subtipo B, gerando uma mistura de mutações das vias mutacionais TAM-1 e TAM-2, ocasionado pelo surgimento do conjunto 67N, 70R e 215Y (55).

Menos frequentemente, foi descrito no Subtipo C, combinação de TAM com K65R entre 7.5% dos pacientes que usavam TDF e 2.5% que usavam d4T no momento da falha virológica (46). Entre 69 sequências de pacientes, majoritariamente infectados subtipo C (94,2%), TDF utilizado em 68% daqueles que realizaram genotipagem, entre aqueles que apresentavam altos níveis de resistência a INTR, identificação de TAM coincidiu com K65R em apenas 1 paciente e as mutações mais frequentes foram D67N (13.8%), K219Q/E (12.1%), K70R (12.1%), T215Y/F (6.9%) (44).

Observa-se acúmulo de mais de 3 TAM, em pacientes em falha virológica por mais que 48 semanas, devido a inexistência de monitoramento virológico sistemático, (56),

comprometendo a estruturação do esquema de resgate.

Por outro lado, um sub estudo realizado em uma coorte multicêntrica de pacientes infectados por vários subtipos (subtipo C em 41% e subtipo B em 25%) que desenvolveram falha virológica, o subtipo C foi menos frequentemente associado à presença de 3 ou mais TAM, comparado ao subtipo B (57).

#### **2.4.4- Mutações a INNTR e Subtipo C: associação com uso de INNTR**

A frequência que se observa mutações a INNTR na infecção pelo Subtipo C é variável. A mutação V106M tem sido descrita com mais frequência no subtipo C, quando comparado a subtipo B, após exposição a EFZ (58). Entre sul-africanos com elevada prevalência de K65R e tratados com INNTR (88% dos esquemas de tratamento), a prevalência de alguma mutação a INNTR chegou a 97%: V106M foi identificada em 18 (54,5%) e K103N em 8 (24,2%) pacientes (42). Pacientes com subtipo C e alta prevalência de K65R, expostos a esquemas estruturados com EFZ, frequentemente tiveram identificadas as mutações K103N (58,7%) e Y181C (47%), assim como 225H e V106M, foram significativamente associadas ao uso de EFZ em relação a NVP (46). Contudo, mesmo no cenário de baixa prevalência de K65R, mutações a INNTR foram frequentemente encontradas em pacientes em falha virológica: alguma mutação para INNTR foi observada em 24/40 (57%), K103N foi identificada em 15/40, V106M em 4 amostras, Y181C e P225H em 3 amostras cada (43).

Entre 65 testes de genotipagem de crianças e adultos em esquemas de primeira linha com dupla de INTR e INNTR ou IP/r, a mutação K103N foi identificada em 25%, já entre 18 pacientes em falha e uso de EFZ, V106M foi observada em 12 (67%) (49).

Na Índia, pacientes em falha virológica com 12 meses de tratamento e resultado de genotipagem disponível em 80 amostras, mutações a INNTR foram encontradas em 78%: as mais frequentes foram K103N (36,2%), Y181C (32%), G190A/E/S (26%) e V106A/M (13,7%) (45). Entre 69 sequências de sul-africanos (Subtipo C em 94,2%), mutações a INNTR foram observadas em 65.2%: K103N (50%), V106M (20.6%), G190A (13.8%) foram as mais comuns (44).

Entre 338 sequências genotípicas de nigerianos em falha virológica, em sua maioria infectados por Subtipos Não-B/C, as mutações mais frequentemente observadas foram Y181C (49.7%), K103N (36.4%), G190A (26.3%), A98G (19.5%) (48).

A coorte multicêntrica TenoRes, constituída por pacientes de 36 países incluiu 1.926 pacientes em falha virológica e mostrou maior resistência relacionada ao Subtipo C em relação ao Subtipo B e associação com mutações a INNTR (65%) (59).

#### **2.4.5- Subtipos virais e risco de falha virológica**

Existem limitações na literatura para compreensão integral dos fatores associados à falha virológica e resistência relacionada ao Subtipo C. Tais limitações envolvem, por exemplo, tamanho e representatividade amostral, definições adotadas de falha virológica, desenho de estudo, heterogeneidade nos esquemas de tratamento, ausência de informações sobre resistência pré-tratamento, níveis de adesão aos medicamentos não reportados (51). Tais

lacunas, determinam incertezas para compreender as diferenças na durabilidade do tratamento entre diferentes subtipos, mesmo quando a adesão ao tratamento é semelhante (60).

A durabilidade da supressão viral nos diferentes subtipos virais, também é influenciada por fatores clínicos, relacionados à condição imunológica e magnitude da carga viral pré-tratamento e ao esquema de tratamento utilizado: falha virológica é mais frequente quando a contagem pré-tratamento de Linfócitos T-CD4 é inferior a 100 células/mm<sup>3</sup> e menos frequente quando a carga viral pré-tratamento é inferior a 100.000 cópias/ml (4).

As definições de falha terapêutica são heterogêneas entre os estudos, incluindo o critério virológico mais tardio, definido pelo aparecimento de carga viral > 1.000 cópias/ml em 2 resultados consecutivos (42,61) ou identificação mais precoce, com 2 resultados consecutivos de carga viral > 200 cópias/ml (4), o que, provavelmente, influencia as diferentes taxas de falha virológica e perfil mutacional encontrados na literatura (62). O monitoramento utilizando apenas critérios clínicos e imunológicos, encontrou prevalência de mutações principais a INTR e INNTR (acima de 98%), além de associação de algumas mutações específicas, tais como K65R, E138A, V106M e Y181C com Subtipo C (27), alto nível de resistência a AZT e produção de K65R associada a exposição a TDF, no contexto de pacientes infectados por diversos subtipos (63) provavelmente relacionado a permanência durante longo tempo em falha virológica.

Um estudo que avaliou a durabilidade da supressão viral em uma amostra de 2.116 pacientes estratificados pelos subtipos (subtipo B em 73%, subtipo C em 13%, subtipo A em 3%), na maioria tratados com AZT em combinação com 3TC e EFZ, não observou associação da falha virológica com subtipo viral, mas com dificuldades na adesão e com interrupção do tratamento (64).

#### **2.4.6- Subtipos virais, falha virológica e padrões mutacionais**

A realização de genotipagem mais precoce (4) ou mais tardia (42,61), provavelmente influencia as diferentes taxas de produção de K65R e outras mutações a INTR e INNTR (62). Em pacientes predominantemente infectados por subtipos Não-B, em uso de esquemas de primeira linha, foi observada presença de pelo menos uma TAM, em 50% naqueles que realizaram genotipagem em até 1 ano da identificação de replicação viral e em 88%, quando o fizeram em período superior a 1 ano de duração da falha virológica (65). A manutenção da exposição a d4T/3TC/ INNTR na presença de replicação viral e infecção pelo subtipo C, acarreta incremento na detecção de TAM, quando a genotipagem é realizada em até 180 dias ou após este período, variando de 19% para 32%, respectivamente (66).

Em uma população de pacientes oriundos da África Central e oeste africano, infectados por diversos subtipos e tratados com AZT ou d4T/3TC/ INNTR, os quais não realizavam monitoramento virológico e se mantiveram expostos ao mesmo esquema de tratamento por mais de 48 semanas, foram observadas novas mutações na transcriptase reversa (I94L e L109I), que ainda não haviam sido descritas, além de alta frequência de identificação de M184V, TAM, A98G, K101H, V108I, P225H, K238T e de pelo menos 3 TAM (56).

Análise genotípica longitudinal, em pacientes infectados pelo subtipo C, também tratados

com AZT ou d4T/3TC/ INNTR e que permaneceram utilizando o mesmo esquema de tratamento após a detecção de falha virológica, identificou rápido acúmulo de resistência, com acréscimo em 54% no número de mutações de resistência após cerca de 1 ano em falha virológica (67).

Em pacientes infectados por diversos subtipos (somente 5% eram do subtipo C), tratados com esquemas baseados em INNTR observou-se presença significativa de mutações a INNTR (A98G, K101H, V108I, P225H, K238T), quando expostos ao tratamento por mais de 48 semanas sem monitoramento virológico periódico (56). O tempo longo em falha virológica pode aumentar em até 36% após o período de 1 ano em falha, a mutação K103N pode aumentar de 46% para 63% (67).

#### **2.4.7- Aspectos socioeconômicos e acesso a serviços de saúde**

Tendo em vista as informações disponíveis, existem incertezas para determinar o efeito da presença do subtipo C no aparecimento de K65R, devido a sua associação com outras variáveis, como etnia, estilo de vida, imigração, acesso a serviços de saúde, além de condições sociais, demográficas e econômicas. As populações infectadas com diferentes subtipos, possuem marcada diferença em suas características demográficas.

De forma geral, grupos populacionais infectados pelo subtipo B se caracterizam, em sua maioria por serem brancos, oriundos da Europa e América do Norte e cuja transmissão do HIV foi homossexual, por sua vez, os grupos infectados pelo subtipo C, são em sua maioria negros - africanos e imigrantes que vivem na Comunidade Européia – cuja transmissão foi heterossexual. (4,7,64).

Análise de dados secundários de 8.749 pacientes que iniciaram tratamento com TDF, mostrou que a taxa de falha virológica em pacientes com Subtipo C foi duas vezes superior em relação ao Subtipo B, mas seu efeito desapareceu no ajuste para fatores clínicos e demográficos (4). A condição étnica, portanto, influencia as taxas de falha virológica mais precoce (64,68). Em populações infectadas com diversos subtipos, negros tem mais falha virológica que brancos e asiáticos; grupos com aquisição heterossexual tem mais falha virológica em relação aqueles que tiveram transmissão homossexual, estes fatores parecem possuir maior influência nas taxas de falha virológica do que os subtipos virais (4).

Análises de populações com subtipos conhecidos, observa-se que negros africanos e mulheres heterossexuais, apresentam maior risco de falha virológica precoce quando se compara a brancos e homens que fazem sexo com outros homens (HSH), independentemente do subtipo viral (64).

Uma revisão sistemática, que incluiu estudos da América do Norte e Reino Unido, mostra que HSH negros têm menor acesso a serviços de saúde, menor adesão ao tratamento e mais baixas taxas de supressão viral, comparado a HSH brancos (69). Na América do Norte, a redução da mortalidade devido a Aids não é homogênea entre os segmentos populacionais: é menor entre negros em relação a brancos, entre menos escolarizados em relação a mais escolarizados, inexistindo impacto na mortalidade em populações mais excluídas, como mulheres negras pouco escolarizadas (70).

Também as taxas de resistência a TDF, sofrem influência de condições sociais e demográficas: é mais frequente em pacientes com falha virológica provenientes da África Subsaariana (57%) em relação à Europa (20%) e é encontrada mais ampla resistência relacionada ao subtipo C (59).

Quando se compara frequência de realização de testes de carga viral em pacientes infectados pelo subtipo C na África, aqueles que vivem em zonas rurais realizam 1,4 teste ano ao ano, enquanto que pacientes de zonas urbanas tem acesso a 3 testes ao ano, acarretando em tempo de falha virológica superior a 24 meses e inferior a 6 meses, respectivamente (71). Pacientes oriundos de áreas urbanas tem seu esquema de tratamento mais frequentemente modificado por efeitos adversos, menor número de mutações (< 2 mutações) em relação a pacientes de áreas rurais que apresentam com maior frequência 2 a 6 mutações na genotipagem, maior frequência de mutações a INTR e INNTR, maior número de TAM (incluindo a presença de 3 ou mais TAM) (71).

O baixo acesso a serviços de saúde e a exames de carga viral, menor adesão ao tratamento e realização tardia do teste de genotipagem, provavelmente estão implicados na progressão da resistência viral, influenciando os padrões de resistência observados no subtipo C. Portanto, em parte, as diferenças podem estar associadas a frequência de realização de carga viral e suporte na adesão, posto que a observação de K65R é infrequente em ensaios clínicos, possivelmente relacionado ao “ambiente controlado” e detecção precoce da falha virológica.

Agrega-se a isso, a característica dos esquemas de tratamento, que na maior parte envolveram uso de INNTR, cuja barreira genética de resistência é baixa, o que pode potencializar a progressão da resistência à dupla de INTR.

Modelos de intervenção com integração de sistemas de informações clínicas e laboratoriais, à partir de variáveis sociodemográficas (raça/cor, sexo, idade, situação de pobreza) e clínicas (contagem LT-CD4, número de atendimentos clínicos no período), permitem identificar grupos de maior risco para desfechos não desejados e reduzir as taxas de falha virológica e as diferenças de desfecho entre grupos populacionais, como negros e brancos. (72).

A maior parte das evidências que relaciona subtipo C e K65R, origina-se de estudos realizados em países africanos ou na Índia – os quais possuem epidemias generalizadas e recursos limitados - além de estudos que incluíram imigrantes destas regiões, que vivem na Comunidade Européia e enfrentam situação de exclusão.

Nesse sentido, incertezas a respeito da associação do subtipo C e K65R, estão relacionadas aos aspectos metodológicos, tais como populações incluídas nos estudos, tamanho amostral, planejamento e delineamento dos estudos, critérios heterogêneos de definição e duração da falha virológica, esquemas antirretrovirais empregados, nível de adesão pouco informado, escassas de informações a respeito de escolaridade e renda, estratégias de análise estatística, utilização de dados secundários, entre outros fatores.

Por estas razões, além do subtipo C, outros fatores podem contribuir para sua associação com altas taxas de falha virológica e de prevalência da mutação K65R. A interação de aspectos regionais, étnicos, acesso a serviços de saúde - incluindo exames de carga viral e

genotipagem - com fatores clínicos e imunológicos, dificultam a “percepção do real efeito” do subtipo C nos desfechos virológicos e limitam a interpretação do tamanho do efeito de cada variável no aparecimento de falha virológica e de mutações de resistência, particularmente da mutação K65R.

### **3- Marco Conceitual**

Os conceitos sobre resistência ao tratamento, foram estabelecidos, considerando-se o subtipo B do HIV-1, por esta razão, os padrões de resistência do subtipo C do HIV-1, podem ser diversos, já que este subtipo possui predisposição para resistência aos INTR, exceto zidovudina. A fragilidade na posição 65 da transcriptase reversa, estabelece maior risco de resistência ao tenofovir, cada vez mais utilizado em esquemas de tratamento, acarretando em maior risco de falha virológica, comprometendo a eficácia do tratamento. Por outro lado, fatores como adesão ao tratamento, condições sócio-econômicas e identificação da falha virológica e acesso precoce ao teste de genotipagem, influenciam a prevalência das mutações de resistência, incluindo a mutação K65R.

### **4- Justificativa**

Informações sobre padrões de resistência relacionadas ao subtipo C são importantes para avaliar se as escolhas terapêuticas devem ser individualizadas de acordo com o subtipo viral. A Organização Mundial de Saúde recomenda TDF nos esquemas de primeira linha, independentemente da epidemiologia molecular de cada região. O Brasil adotou o TDF como opção para iniciar o tratamento em 2008 (73) e passou a recomendar a dose fixa coformulada (DFC) TDF/lamivudina/EFZ em 2013 (74). Em 2017, substituiu EFZ por dolutegravir (DTG) na primeira linha de tratamento (75).

Se desconhece potenciais efeitos que os esquemas que utilizam TDF, podem acarretar na resistência viral em populações infectadas pelo subtipo C no Brasil. Da mesma forma, os esquemas para Profilaxia Pós-exposição, inclui a dupla TDF/3TC associado a DTG, podendo resultar em menor eficácia e maior risco de resistência ao DTG. A dupla TDF e emtricitabina é utilizada na Profilaxia Pré-exposição, se desconhece se existe impacto em sua eficácia no contexto de epidemias com elevada circulação do subtipo C.

Não está claro se existem diferenças na supressão viral em esquemas de primeira linha no Brasil, quando se compara os subtipos do HIV-1 circulantes e se estas diferenças podem responder, em parte, as maiores taxas de mortalidade e carga de doença observados no sul do Brasil, pois parte das evidências atuais propõe que a diversidade viral, está associada a diferenças na sequência de códons, em posições associadas com mutações de resistência e pode, desta forma, predispor diferentes subtipos a codificar substituições de aminoácidos na presença de pressão seletiva devido à exposição antirretroviral.

Diante deste cenário, cabem os seguintes questionamentos:

- o surgimento da mutação K65R em pacientes infectados pelo Subtipo C está associado a aspectos raciais ou genéticos?

- A mutação K65R é subtipo dependente?
- O subtipo C tem maiores taxas de falha virológica quando comparado ao subtipo B?
- Qual a influência dos fatores virológicos e sociais nas diferenças relativas à falha virológica e perfil de resistência?
- Qual a influência do acesso ao controle virológico frequente e ao exame de genotipagem nas taxas de mutações de resistência entre os subtipos virais?

## **5- Objetivos**

### **5.1- Objetivo principal**

- Estabelecer associação entre mutação da transcriptase reversa K65R, e o subtipo C do HIV-1 no Brasil.

### **5.2- Objetivos específicos**

- Conhecer a frequência e distribuição da mutação K65R entre subtipos virais.
- Conhecer a distribuição de subtipos virais no Brasil.
- Identificar modificações na prevalência da mutação K65R ao longo do período.
- Estabelecer a prevalência do Subtipo C na região sul do Brasil, em pacientes em falha virológica.
- Identificar modificações na distribuição dos subtipos virais ao longo do período.
- Analisar a associação entre subtipo C e variáveis sócio-demográficas no Brasil.
- Analisar a associação entre mutação K65R e variáveis sócio-demográficas no Brasil.

## **6- Referências**

1. Secretaria da Saúde - Ministério da Saúde. Boletim epidemiológico HIV AIDS [Internet]. 2018. Available from: <http://www.aids.gov.br/pt-br/pub/2018/boletim-epidemiologico-hivaid-2018>
2. Secretaria do estado do Rio Grande do Sul. Coleção Ações em Saúde, Série Boletim Epidemiológico 2. Boletim Epidemiológico HIV e AIDS 2017. [Internet]. 2017. Available from: <https://saude.rs.gov.br/upload/arquivos/carga20180508/11140851-boletim-2017.pdf>
3. Brenner BG, Coutsinos D. The K65R mutation in HIV-1 reverse transcriptase: genetic barriers, resistance profile and clinical implications. HIV Ther [Internet]. 2009 Nov;3(6):583–94. Available from: <https://www.futuremedicine.com/doi/10.2217/hiv.09.40>
4. White E, Smit E, Churchill D, Collins S, Booth C, Tostevin A, et al. No Evidence That HIV-1 Subtype C Infection Compromises the Efficacy of Tenofovir-Containing Regimens: Cohort Study in the United Kingdom. J Infect Dis [Internet]. 2016 Nov 1;214(9):1302–8. Available from: <https://academic.oup.com/jid/article-lookup/doi/10.1093/infdis/jiw213>

5. Theys K, Vercauteren J, Snoeck J, Zazzi M, Camacho RJ, Torti C, et al. HIV-1 Subtype Is an Independent Predictor of Reverse Transcriptase Mutation K65R in HIV-1 Patients Treated with Combination Antiretroviral Therapy Including Tenofovir. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2013 Feb 1;57(2):1053–6. Available from: <http://aac.asm.org/cgi/doi/10.1128/AAC.01668-12>
6. Tang MW, Rhee S-Y, Bertagnolio S, Ford N, Holmes S, Sigaloff KC, et al. Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor Resistance Mutations Associated with First-Line Stavudine-Containing Antiretroviral Therapy: Programmatic Implications for Countries Phasing Out Stavudine. *J Infect Dis* [Internet]. 2013 Jun 15;207(suppl\_2):S70–7. Available from: <https://academic.oup.com/jid/article-lookup/doi/10.1093/infdis/jit114>
7. Smit E, White E, Clark D, Churchill D, Zhang H, Collins S, et al. An association between K65R and HIV-1 subtype C viruses in patients treated with multiple NRTIs. *J Antimicrob Chemother* [Internet]. 2017 Jul 1;72(7):2075–82. Available from: <https://academic.oup.com/jac/article/72/7/2075/3098563>
8. Tebit DM, Arts EJ. Tracking a century of global expansion and evolution of HIV to drive understanding and to combat disease. *Lancet Infect Dis* [Internet]. 2011 Jan;11(1):45–56. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21126914>
9. WHO & UNAIDS. 2007 AIDS epidemic update. 2007;60.
10. WHO. Guidance on provider-initiated HIV testing and counselling in health facilities. *Health Affairs (Millwood)*. 2007;26(1):1–60.
11. Pereira GFM, Shimizu HE, Bermudez XP, Hamann EM. Epidemiologia do HIV e aids no estado do Rio Grande do Sul, 1980-2015. *Epidemiol e Serv Saude Rev do Sist Unico Saude do Bras*. 2018;27(4):e2017374.
12. United Nations Programme on HIV/AIDS – UNAIDS. Local epidemics issues brief. Vol. 140, *The Lancet*. 2014. 52 p.
13. Bello G, Passaes CPB, Guimara ML, Lorete RS, Matos SE, Medeiros RM, et al. Origin and evolutionary history of HIV-1 subtype C in Brazil. 2008;(June).
14. Soares MA, de Oliveira T, Brindeiro RM, Diaz RS, Sabino EC, Brigido L, et al. A specific subtype C of human immunodeficiency virus type 1 circulates in Brazil. *AIDS* [Internet]. 2003 Jan;17(1):11–21. Available from: <https://insights.ovid.com/crossref?an=00002030-200305020-00016>
15. Santos AF, Schrago CG, Martinez AMB, Mendoza-Sassi R, Silveira J, Sousa TM, et al. Epidemiologic and Evolutionary Trends of HIV-1 CRF31\_BC-Related Strains in Southern Brazil. *JAIDS J Acquir Immune Defic Syndr* [Internet]. 2007 May;PAP. Available from: <https://insights.ovid.com/crossref?an=00126334-900000000-99731>



16. Bello G, Zanotto PM de A, Iamarino A, Gräf T, Pinto AR, Couto-Fernandez JC, et al. Phylogeographic Analysis of HIV-1 Subtype C Dissemination in Southern Brazil. Sandstrom P, editor. PLoS One [Internet]. 2012 Apr 18;7(4):e35649. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0035649>
17. Simon D, Béria JU, Tietzmann DC, Carli R de, Stein AT, Lunge VR. Prevalência de subtipos do HIV-1 em amostra de pacientes de um centro urbano no sul do Brasil. Rev Saude Publica [Internet]. 2010 Dec;44(6):1094–101. Available from: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-89102010000600015&lng=pt&tng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-89102010000600015&lng=pt&tng=pt)
18. Guimarães ML, Marques BCL, Bertoni N, Teixeira SLM, Morgado MG, Bastos FI. Assessing the HIV-1 Epidemic in Brazilian Drug Users: A Molecular Epidemiology Approach. Carr JK, editor. PLoS One [Internet]. 2015 Nov 4;10(11):e0141372. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0141372>
19. Brindeiro RM, Diaz RS, Sabino EC, Morgado MG, Pires IL, Brigido L, et al. Brazilian Network for HIV Drug Resistance Surveillance (HIV-BResNet). AIDS [Internet]. 2003 May;17(7):1063–9. Available from: <https://insights.ovid.com/crossref?an=00002030-200305020-00016>
20. Inocencio LA, Pereira AA, Sucupira M, Fernandez J, Jorge CP, Souza DF, et al. Brazilian Network for HIV Drug Resistance Surveillance: a survey of individuals recently diagnosed with HIV. J Int AIDS Soc [Internet]. 2009;12(1):20. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1186/1758-2652-12-20>
21. Arruda MB, Boullosa LT, Cardoso CC, da Costa CM, Brites C, de Lima ST, et al. Brazilian network for HIV Drug Resistance Surveillance (HIV-BresNet): a survey of treatment-naïve individuals. J Int AIDS Soc [Internet]. 2018 Mar;21(3):e25032. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/jia2.25032>
22. Diaz RS, Inocencio LA, Sucupira MCA, Pereira AA, Hunter J, Ferreira JE, et al. The Virological and Immunological Characteristics of the HIV-1-Infected Population in Brazil: From Initial Diagnosis to Impact of Antiretroviral Use. López-Galíndez C, editor. PLoS One [Internet]. 2015 Oct 28;10(10):e0139677. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0139677>
23. Silveira J, Santos AF, Martínez AMB, Góes LR, Mendoza-Sassi R, Muniz CP, et al. Heterosexual transmission of human immunodeficiency virus type 1 subtype C in southern Brazil. J Clin Virol [Internet]. 2012 May;54(1):36–41. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1386653212000236>
24. Grinberg G, Giron LB, Knoll RK, Galinskas J, Camargo M, Arif MS, et al. High prevalence and incidence of HIV-1 in a counseling and testing center in the city of Itajaí, Brazil. Brazilian J Infect Dis [Internet]. 2015 Nov;19(6):631–5. Available from:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1413867015001397>

25. Kiwanuka N, Laeyendecker O, Robb M, Kigozi G, Arroyo M, Mccutchan F, et al. Effect of Human Immunodeficiency Virus Type 1 ( HIV-1 ) Subtype on Disease Progression in Persons from Rakai , Uganda , with Incident HIV-1 Infection. 2008;1:707–13.
26. Santoro MM, Alteri C, Ronga L, Flandre P, Fabeni L, Mercurio F, et al. Comparative Analysis of Drug Resistance Among B and the Most Prevalent Non-B HIV Type 1 Subtypes (C, F, and CRF02\_AG) in Italy. *AIDS Res Hum Retroviruses* [Internet]. 2012 Oct;28(10):1285–93. Available from: <http://www.liebertpub.com/doi/10.1089/aid.2011.0142>
27. Kityo C, Thompson J, Nankya I, Hoppe A, Ndashimye E, Warambwa C, et al. HIV Drug Resistance Mutations in Non-B Subtypes After Prolonged Virological Failure on NNRTI-Based First-Line Regimens in Sub-Saharan Africa. *JAIDS J Acquir Immune Defic Syndr* [Internet]. 2017 Jun;75(2):e45–54. Available from: <http://insights.ovid.com/crossref?an=00126334-201706010-00018>
28. Coutsinos D, Invernizzi CF, Xu H, Moisi D, Oliveira M, Brenner BG, et al. Template Usage Is Responsible for the Preferential Acquisition of the K65R Reverse Transcriptase Mutation in Subtype C Variants of Human Immunodeficiency Virus Type 1. *J Virol* [Internet]. 2009 Feb 15;83(4):2029–33. Available from: <http://jvi.asm.org/cgi/doi/10.1128/JVI.01349-08>
29. Brenner BG, Oliveira M, Doualla-Bell F, Moisi DD, Ntemgwa M, Frankel F, et al. HIV-1 subtype C viruses rapidly develop K65R resistance to tenofovir in cell culture. *AIDS* [Internet]. 2006 Jun;20(9):F9–13. Available from: <https://insights.ovid.com/crossref?an=00002030-200606120-00001>
30. Wensing AM, Calvez V, Ceccherini-Silberstein F, Charpentier C, Günthard HF, Paredes R, et al. 2019 update of the drug resistance mutations in HIV-1. *Top Antivir Med* [Internet]. 2019;27(3):111–21. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31634862>
31. Li JF, Lipscomb JT, Wei X, Martinson NA, Morris L, Heneine W, et al. Detection of low-level K65R variants in nucleoside reverse transcriptase inhibitor-naive chronic and acute HIV-1 subtype C infections. *J Infect Dis*. 2011;203(6):798–802.
32. Kozal MJ, Chiarella J, St John EP, Moreno EA, Simen BB, Arnold TE, et al. Prevalence of low-level HIV-1 variants with reverse transcriptase mutation K65R and the effect of antiretroviral drug exposure on variant levels. *Antivir Ther*. 2011;16(6):925–9.
33. Zhou Z, Tang K, Zhang G, Wadonda-Kabondo N, Moyo K, Rowe LA, et al. Detection of minority drug resistant mutations in Malawian HIV-1 subtype C-positive patients initiating and on first-line antiretroviral therapy. *Afr J Lab Med* [Internet]. 2018 May 30;7(1):1–9. Available from: <http://www.ajlmonline.org/index.php/AJLM/article/view/708>

34. Chan PA, Huang A, Kantor R. Low prevalence of transmitted K65R and other tenofovir resistance mutations across different HIV-1 subtypes: implications for pre-exposure prophylaxis. *J Int AIDS Soc* [Internet]. 2012 Oct 15;15(2):1–5. Available from: <http://doi.wiley.com/10.7448/IAS.15.2.17701>
35. Parikh UM, Kiepiela P, Ganesh S, Gomez K, Horn S, Eskay K, et al. Prevalence of HIV-1 Drug Resistance among Women Screening for HIV Prevention Trials in KwaZulu-Natal, South Africa (MTN-009). Venter WDF, editor. *PLoS One* [Internet]. 2013 Apr 9;8(4):e59787. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0059787>
36. Kiwelu IE, Novitsky V, Kituma E, Margolin L, Baca J, Manongi R, et al. HIV-1 pol diversity among female bar and hotel workers in Northern Tanzania. *PLoS One*. 2014;9(7).
37. Lihana RW, Khamadi SA, Lubano K, Lwembe R, Kiptoo MK, Lagat N, et al. HIV type 1 subtype diversity and drug resistance among HIV Type 1-infected kenyan patients initiating antiretroviral therapy. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2009;25(12):1211–7.
38. Parikh UM, Bachelier L, Koontz D, Mellors JW. The K65R Mutation in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Reverse Transcriptase Exhibits Bidirectional Phenotypic Antagonism with Thymidine Analog Mutations. *J Virol* [Internet]. 2006 May 15;80(10):4971–7. Available from: <http://jvi.asm.org/cgi/doi/10.1128/JVI.80.10.4971-4977.2006>
39. Karade S, Chaturbhuj DN, Sen S, Joshi RK, Kulkarni SS, Shankar S, et al. HIV drug resistance following a decade of the free antiretroviral therapy programme in India: A review. *Int J Infect Dis* [Internet]. 2018;66:33–41. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijid.2017.10.020>
40. Alemán-Campos Y, Kourí-Cordellá V, Pérez-Santos L, Fonseca-Gómez C, Pérez-Ávila J, Ortega-González LM, et al. HIV-1 Antiretroviral Resistance in Cuba, 2009-2014. *MEDICC Rev* [Internet]. 2018 Jul;20(3):15–21. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31242157>
41. Sluis-Cremer N, Jordan MR, Huber K, Wallis CL, Bertagnolio S, Mellors JW, et al. E138A in HIV-1 reverse transcriptase is more common in subtype C than B: Implications for rilpivirine use in resource-limited settings. *Antiviral Res* [Internet]. 2014 Jul;107:31–4. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166354214001077>
42. Sunpath H, Wu B, Gordon M, Hampton J, Johnson B, Moosa M-YS, et al. High rate of K65R for antiretroviral therapy-naive patients with subtype C HIV infection failing a tenofovir-containing first-line regimen. *AIDS* [Internet]. 2012 Aug;26(13):1679–84. Available from: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00002030-201208240-00011>

43. Hoffmann CJ, Ledwaba J, Li J, Johnston V, Hunt G, Fielding KL, et al. Resistance to tenofovir-based regimens during treatment failure of subtype C HIV-1 in South Africa. *Antivir Ther* [Internet]. 2013;18(7):915–20. Available from: <http://www.intmedpress.com/journals/avt/abstract.cfm?id=2652&pid=48>
44. Etta EM, Mavhandu L, Manhaeve C, McGonigle K, Jackson P, Rekosh D, et al. High level of HIV-1 drug resistance mutations in patients with unsuppressed viral loads in rural northern South Africa. *AIDS Res Ther* [Internet]. 2017 Dec 27;14(1):36. Available from: <http://aidsrestherapy.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12981-017-0161-z>
45. Karade SK, Ghate M V., Chaturbuj DN, Kadam DB, Shankar S, Gaikwad N, et al. Cross-sectional study of virological failure and multinucleoside reverse transcriptase inhibitor resistance at 12 months of antiretroviral therapy in Western India. *Med (United States)*. 2016;95(37).
46. Skhosana L, Steegen K, Bronze M, Lukhwareni A, Letsoalo E, Papathanasopoulos MA, et al. High Prevalence of the K65R Mutation in HIV-1 Subtype C Infected Patients Failing Tenofovir-Based First-Line Regimens in South Africa. Maga G, editor. *PLoS One* [Internet]. 2015 Feb 6;10(2):e0118145. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0118145>
47. Doualla-Bell F, Avalos A, Brenner B, Gaolathe T, Mine M, Gaseitsiwe S, et al. High Prevalence of the K65R Mutation in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Subtype C Isolates from Infected Patients in Botswana Treated with Didanosine-Based Regimens. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2006 Dec 1;50(12):4182–5. Available from: <http://aac.asm.org/cgi/doi/10.1128/AAC.00714-06>
48. Hawkins CA, Chaplin B, Idoko J, Ekong E, Adewole I, Gashau W, et al. Clinical and Genotypic Findings in HIV-Infected Patients With the K65R Mutation Failing First-Line Antiretroviral Therapy in Nigeria. *JAIDS J Acquir Immune Defic Syndr* [Internet]. 2009 Oct;52(2):228–34. Available from: <https://insights.ovid.com/crossref?an=00126334-200910010-00009>
49. Pillay V, Pillay C, Kantor R, Venter F, Levin L, Morris L. HIV Type 1 Subtype C Drug Resistance among Pediatric and Adult South African Patients Failing Antiretroviral Therapy. *AIDS Res Hum Retroviruses* [Internet]. 2008 Nov;24(11):1449–54. Available from: <http://www.liebertpub.com/doi/10.1089/aid.2008.0180>
50. Turner D, Shahar E, Katchman E, Kedem E, Matus N, Katzir M, et al. Prevalence of the K65R resistance reverse transcriptase mutation in different HIV-1 subtypes in Israel. *J Med Virol* [Internet]. 2009 Sep;81(9):1509–12. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/jmv.21567>
51. Martinez-Cajas JL, Pai NP, Klein MB, Wainberg MA. Differences in resistance mutations among HIV-1 non-subtype B infections: a systematic review of evidence (1996–2008). *J*

- Int AIDS Soc [Internet]. 2009;12(1):11. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1186/1758-2652-12-11>
52. Miller MD, Margot N, Lu B, Zhong L, Chen S, Cheng A, et al. Genotypic and Phenotypic Predictors of the Magnitude of Response to Tenofovir Disoproxil Fumarate Treatment in Antiretroviral-Experienced Patients. *J Infect Dis* [Internet]. 2004 Mar;189(5):837–46. Available from: <https://academic.oup.com/jid/article-lookup/doi/10.1086/381784>
  53. Grossman Z, Vardinon N, Chemtob D, Alkan ML, Bentwich Z, Burke M, et al. Genotypic variation of HIV-1 reverse transcriptase and protease : comparative analysis of clade C and clade B. 2001;(April):1453–60.
  54. Deshpande A, Jeannot AC, Schrive MH, Wittkop L, Pinson P, Fleury HJ. Analysis of RT Sequences of Subtype C HIV-Type 1 Isolates from Indian Patients at Failure of a First-Line Treatment According to Clinical and/or Immunological WHO Guidelines. *AIDS Res Hum Retroviruses* [Internet]. 2010 Mar;26(3):343–50. Available from: <http://www.liebertpub.com/doi/10.1089/aid.2009.0217>
  55. Invernizzi CF, Coutsinos D, Oliveira M, Schildknecht RS, Xu H, Gaseitsiwe S, et al. The preferential selection of K65R in HIV-1 subtype C is attenuated by nucleotide polymorphisms at thymidine analogue mutation sites. *J Antimicrob Chemother* [Internet]. 2013 Jun 7; Available from: <https://academic.oup.com/jac/article-lookup/doi/10.1093/jac/dkt204>
  56. Villabona-Arenas CJ, Vidal N, Guichet E, Serrano L, Delaporte E, Gascuel O, et al. In-depth analysis of HIV-1 drug resistance mutations in HIV-infected individuals failing first-line regimens in West and Central Africa. *AIDS* [Internet]. 2016 Nov;30(17):2577–89. Available from: <http://insights.ovid.com/crossref?an=00002030-201611130-00003>
  57. Lam EP, Moore CL, Gotuzzo E, Nwizu C, Kamarulzaman A, Chetchotisakd P, et al. Antiretroviral Resistance After First-Line Antiretroviral Therapy Failure in Diverse HIV-1 Subtypes in the SECOND-LINE Study. *AIDS Res Hum Retroviruses* [Internet]. 2016 Sep;32(9):841–50. Available from: <http://www.liebertpub.com/doi/10.1089/aid.2015.0331>
  58. Brenner B, Turner D, Oliveira M, Moisi D, Detorio M, Carobene M, et al. A V106M mutation in HIV-1 clade C viruses exposed to efavirenz confers cross-resistance to non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *AIDS* [Internet]. 2003 Jan;17(1):F1–5. Available from: <https://insights.ovid.com/crossref?an=00002030-200301030-00001>
  59. Gregson J, Tang M, Ndembu N, Hamers RL, Rhee S-Y, Marconi VC, et al. Global epidemiology of drug resistance after failure of WHO recommended first-line regimens for adult HIV-1 infection: a multicentre retrospective cohort study. *Lancet Infect Dis* [Internet]. 2016 May;16(5):565–75. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00536-8](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00536-8)

60. Häggblom A, Svedhem V, Singh K, Sönnernborg A, Neogi U. Virological failure in patients with HIV-1 subtype C receiving antiretroviral therapy: an analysis of a prospective national cohort in Sweden. *Lancet HIV* [Internet]. 2016 Apr;3(4):e166–74. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2352301816000230>
61. Kantor R, Smeaton L, Vardhanabhuti S, Hudelson SE, Wallis CL, Tripathy S, et al. Pretreatment HIV Drug Resistance and HIV-1 Subtype C Are Independently Associated With Virologic Failure: Results From the Multinational PEARLS (ACTG A5175) Clinical Trial. *Clin Infect Dis* [Internet]. 2015 May 15;60(10):1541–9. Available from: <https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1093/cid/civ102>
62. Günthard HF, Scherrer AU. HIV-1 Subtype C, Tenofovir, and the Relationship With Treatment Failure and Drug Resistance. *J Infect Dis* [Internet]. 2016 Nov 1;214(9):1289–91. Available from: <https://academic.oup.com/jid/article-lookup/doi/10.1093/infdis/jiw214>
63. Takou D, Fokam J, Teto G, Santoro M-M, Ceccherini-Silberstein F, Nanfack AJ, et al. HIV-1 drug resistance testing is essential for heavily-treated patients switching from first- to second-line regimens in resource-limited settings: evidence from routine clinical practice in Cameroon. *BMC Infect Dis* [Internet]. 2019 Dec 12;19(1):246. Available from: <https://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12879-019-3871-0>
64. Geretti AM, Harrison L, Green H, Sabin C, Hill T, Fearnhill E, et al. Effect of HIV-1 Subtype on Virologic and Immunologic Response to Starting Highly Active Antiretroviral Therapy. *Clin Infect Dis* [Internet]. 2009 May;48(9):1296–305. Available from: <https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1086/598502>
65. Crawford KW, Wakabi S, Kibuuka H, Magala F, Keshinro B, Okoye I, et al. Short Communication: East Meets West: A Description of HIV-1 Drug Resistance Mutation Patterns of Patients Failing First Line Therapy in PEPFAR Clinics from Uganda and Nigeria. *AIDS Res Hum Retroviruses* [Internet]. 2014 Aug;30(8):796–9. Available from: <http://www.liebertpub.com/doi/10.1089/aid.2013.0294>
66. Orrell C, Walensky RP, Losina E, Pitt J, Freedberg KA, Wood R. HIV-1 clade C resistance genotypes in naïve patients and after first virological failure in a large community ART programme. *Antivir Ther* [Internet]. 2009;14(4):523–31. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3211093/>
67. Barth RE, Aitken SC, Tempelman H, Geelen SP, van Bussel EM, Hoepelman AI, et al. Accumulation of drug resistance and loss of therapeutic options precede commonly used criteria for treatment failure in HIV-1 subtype-C-infected patients. *Antivir Ther* [Internet]. 2011;17(2):377–86. Available from: <http://www.intmedpress.com/journals/avt/abstract.cfm?id=2010&pid=48>
68. Frater AJ, Dunn DT, Beardall AJ, Ariyoshi K, Clarke JR, McClure MO, et al. Comparative response of African HIV-1-infected individuals to highly active antiretroviral therapy. *AIDS*

[Internet]. 2002 May;16(8):1139–46. Available from: <https://insights.ovid.com/crossref?an=00002030-200205240-00007>

69. Millett GA, Peterson JL, Flores SA, Hart TA, Jeffries IV WL, Wilson PA, et al. Comparisons of disparities and risks of HIV infection in black and other men who have sex with men in Canada, UK, and USA: A meta-analysis. *Lancet*. 2012;380(9839):341–8.
70. Simard EP, Fransua M, Naishadham D, Jemal A. The Influence of Sex, Race/Ethnicity, and Educational Attainment on Human Immunodeficiency Virus Death Rates Among Adults, 1993-2007. *Arch Intern Med* [Internet]. 2012 Nov 12;172(20):1591. Available from: <http://archinte.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/archinternmed.2012.4508>
71. Rossouw TM, Nieuwoudt M, Manasa J, Malherbe G, Lessells RJ, Pillay S, et al. HIV drug resistance levels in adults failing first-line antiretroviral therapy in an urban and a rural setting in South Africa. *HIV Med*. 2017;18(2):104–14.
72. Cunningham WE, Ford CL, Kinsler JJ, Seiden D, Andrews L, Nakazono T, et al. Effects of a Laboratory Health Information Exchange Intervention on Antiretroviral Therapy Use, Viral Suppression, and Racial/Ethnic Disparities. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2017;75(3):290–8.
73. Secretaria da Saúde - Ministério da Saúde. *Recomendações para Terapia Anti-retroviral em Adultos Infectados pelo HIV*. 2008;1.<sup>a</sup> edição:1–248.
74. Secretaria da Saúde - Ministério da Saúde. *PROTOCOLO CLÍNICO E DIRETRIZES TERAPÊUTICAS PARA MANEJO DA INFECÇÃO PELO HIV EM ADULTOS*. 2013;216.
75. Ministério da Saúde do Brasil. *Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para manejo da infecção pelo hiv em adultos* [Internet]. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das Infecções Sexualmente Transmissíveis, do HIV/Aids e das Hepatites Virais. Protocolo. 2018. 416 p. Available from: <http://www.aids.gov.br/pt-br/pub/2013/protocolo-clinico-e-diretrizes-terapeuticas-para-manejo-da-infeccao-pelo-hiv-em-adultos>

## 7- Artigo

Association between K65R mutation and HIV-1 Subtype C in patients experiencing virological failure in Brazil: a cross-sectional study

Hallal, RC<sup>a\*</sup>; Alvarenga AA<sup>b</sup>; Cardoso SJ<sup>b</sup>; Castro SN<sup>b</sup>; Falci DR<sup>a,c</sup>

<sup>a</sup>Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, Avenida Ramiro Barcelos, 2400, Porto Alegre - RS, Brasil;

<sup>b</sup>Instituto de Ciência Agrárias, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Rua Cruzeiro, 1 - Teófilo Otoni - MG, Brasil;

<sup>c</sup>Hospital de Clínicas de Porto Alegre; Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, Avenida Ramiro Barcelos, 2400, Porto Alegre - RS, Brasil;

\*Corresponding author:

Ronaldo Campos Hallal

Mariland Avenue, 1043/05, Porto Alegre, Brazil.

E-mail:rcamposhallal@gmail.com

Short title/running head: K65R mutation and subtype C in Brazil

Total number of words: 2034

The authors have not conflicts of interest or grants to develop this study

## Abstract

Background: HIV-1 subtype B is the most prevalent in Brazil, except in South region where subtype C predominates. A possible association between subtype C and K65R mutation have been proposed, reducing the antiviral activity particularly of tenofovir.

Objectives: To evaluate the association between HIV-1 subtype C and K65R mutation in patients



with virological failure in Brazil.

**Methods:** We analysed a large genotyping public dataset, of patients during virological failure. Descriptive statistics were used to describe subtypes distribution, prevalence of K65R mutation and sociodemographic factors. Association between K65R mutation and socio-demographic factors, and subtypes were tested using chi-square tests. The Cochran-Armitage test was used to verify changes in the mutation prevalence along the period. A multivariate logistic regression model measured the effect of subtype on the prevalence of K65R, adjusting for other factors significantly associated with its occurrence.

**Results:** We found 58,155 patients with available genotypic tests and 32,11 patients with virological failure. Subtype B (72%) and Subtype C (14%) was the more common clades. Subtype B was the most prevalent in all regions, except in the South Region, where subtype C was the most common (48%). We identified expansion of subtype C to Center-west Region and other states. Subtype C was associated with female gender, ethnicity and K65R mutation. The K65R prevalence in Brazil was 6.1% and increased significantly from 2.9% to 6.6% over the period ( $p < 0.001$ ). In a multivariate analysis, we found an association between K65R mutation and sbtype C, male gender and higher education level.

**Conclusion:** Subtype C is the most prevalent subtype in Brazilian South, and is expanding in Brazil. We found a independent association between K65R mutation and subtype C, male gender and higher educational level. This is the first study in Brazil with a large sample that found an association between subtype C and K65R mutation.

**Keywords:** HIV-1; Subtype C; Clade C; K65R mutation; virological failure; resistance.

## Introduction

In 2018, was estimated around 100.000 (79.000 - 130.000) HIV new infections in Latin America, 65% of them affecting key populations and their sexual parts, and 35.000 AIDS related deaths [1]. In 2018 in Brazil, was diagnosed 37,161 HIV patients and 10,980 AIDS-related deaths (**Boletim 2019**). In the 2000-2017 period, the national surveillance system registered 125,144 HIV or AIDS patients, 69% of them in male gender (homosexual or bisexual transmission in 51.3% and heterosexual transmission in 30.3%) and 31% in female gender. Regarding geographic distribution, southeast region concentrates 45.6% of HIV epidemic and south region 30.3% of the cases (**Boletim 2019**). Subtype B is the most prevalent clade in Brazil, except in South region [2-4]. In the last decades, HIV-1 subtype C prevalence is increasing in Brazilian South region, from 44% in 2001 to 54% in 2014-2015 period [2,4]. In Brazilian's South, 56% of new HIV diagnosis between 2005 and 2008, was caused by subtype C through a heterosexual pathway [5]. In 2002-2008 period, around 70% of "recently acquired infections" at a Southern city were associated with subtype C [6]. In 2009, subtype C prevalence among injectable drug users (IDU)

reached 86% at South [7], probably contributing to heterosexual transmission pattern observed in that region [8].

One remarkable characteristic of subtype C is a specific signature pattern and a nucleotide polymorphism at 64, 65 and 66 position in reverse transcriptase (RT) [9,10], resulting in template coding sequence that predisposes a pause model at the site 65 [11]. Consequently, 65 position is a hot spot to mutagenesis and K65R development contributing to the higher rates of virological failure, compared with subtype B [12]. The presence of K65R mutation is associated with a reduced response to tenofovir (TDF) [13].

Surveillance studies of K65R mutation over time, found an increase in its prevalence in patients failing antiretroviral therapy in North America [14]. In some countries the prevalence has reached worrisome levels, such as in India in 2014 [15]. Studies that included large samples, showed that K65R occurrence may be associated to Subtype C [12], with frequencies higher than observed with Non-subtype B and Non-B/C [16]. This finding suggests that K65R pathway could be a “subtype dependent” mutation.

Between the agents of the nucleoside of reverse transcriptase inhibitor (NRTI) class, tenofovir (TDF) induces the strongest selective pressure to K65R development [11,17,18], being observed five times higher than other NRTI [16]. Other NRTI, such as stavudine, also has this effect, but at a lower intensity [19]. Patients infected by Subtype C and exposed to TDF combined to lamivudine (3TC) and a non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor (NNRTI), show variable rates of K65R, ranging from 12.0% [20–23] to 69.7% [24].

The Brazilian Ministry of Health recommends TDF to antiretroviral therapy [25], to start antiretroviral treatment, post exposure prophylaxis (PEP) and to pre-exposure prophylaxis (PrEP).

The aim of this study is to establish the national prevalence of K65R mutation and to analyze its association with viral subtypes and demographic variables in Brazil.

## Methods

The central database from the Brazilian Ministry of Health receives information on HIV genotypic tests from public centers and contain the most sequences from Brazilian patients. We analyzed secondary data that makes up the database, integrating the Brazilian Network for HIV Drug Resistance, from 2010 to 2017. Brazil contains five geographic regions: Southeast (that has the most HIV/AIDS cases), followed by South, Central-west, Northeast and North regions.

Criteria for HIV-1 genotype testing in Brazil have been virological failure in treatment experienced patients, pregnant women and pregnancy HIV-exposed children. Virological failure was defined as 2 consecutive viral loads of above 500 copies/mL, 4 weeks apart, after 6 months of antiretroviral therapy [25]. We excluded from our analysis samples from pregnant patients and from patients age under 16 years old, because they have probably not experiencing virological failure, and were submitted to genotype testing for other reasons according to the criteria. After excluding duplicate tests, sequences were submitted to Stanford algorithm [26] to subtypes definition.

We collected data for analysis from the following variables: viral subtypes (information obtained through the genotype sequencing), presence of K65R mutation, gender, age, educational level, ethnicity, state and regions of origin. Brazil contains five geographic regions: Southeast region (that has the most HIV/AIDS cases), followed by the South, Central-west, Northeast and North regions. Information on transmission HIV routes was not available for analysis.

We used the Pearson's chi-square to test associations between variables. A Cochran-Armitage test was performed in order to verify significant changes of K65R mutation prevalence in the study period. A logistic regression model was performed to identify independent factors related to the existence of K65R mutation. Variables with  $p \leq 0.05$  were maintained in the final model. Variables were checked for confounding and collinearity, and no interactions were tested. Level of significance was defined to 95%.

Considering that the study proposed only use of secondary data, unidentified, without any access to clinical information, sample handling or medical records; and that study access to the data was granted by the Brazilian Ministry of Health (which holds access to the dataset), submission was not required by the Ethics Committee, after consultation.

## Results

A total of 58,155 available sequences were found in the dataset. As planned, pregnant females and patients under 16 years old were excluded. Thus, we remained with 32,111 entries for analysis, of HIV adults patients experiencing virological failure. In the sample, 14,533 (45.3%) performed genotyping in 2016 and 2017.

Regarding the distribution by regions, the Southeast region, which concentrate most of HIV/AIDS patients, contributed with 15,197 sequences (47.4%). São Paulo state contributed with 10,445 sequences, representing 35.5% of sample. The South region contributed with 8,487 sequences (26.5%).

Male gender predominated in the sample (56.3%). Ethnicity had the following distribution: White, 13,138 patients (54.5%); Brown, 8,224 (34.1%); and Black, 2,602 (10.8%). However, in one quarter of the sample (8,005 patients), information on ethnicity was not available. Educational level had the following distribution: under 1 year, 560 patients; 1-3 years, 2,604 (12%); 4-7 years, 7,469 (37.2%); 8-11 years, 7,005 (34.8%); and more than 12 years, 2,666 (13.3%).

Subtype B was the most frequent clade identified in patients with virological failure, followed by subtype C and subtype F. Frequencies of HIV-1 subtypes are expressed in Table 1. Subtype B was the most predominant in all country regions except South, where HIV-1 subtype C was the most prevalent (46.6%). Subtype distributions according to country regions are expressed in Figure 1. The greatest state prevalence of subtype C was observed C in Santa Catarina (1,574; 64.7% of state isolates), followed by Rio Grande do Sul (1,469; 43.4%) and Paraná state (911; 34.2%), all states located in the South region of Brazil. Of note, in Rondonia state, located in the North region, the subtype C prevalence reached 11.5% (22 isolates). In Table 2, we demonstrated characteristics of patients harboring HIV-1 subtype C viruses that was associated with female

gender, ethnicity and educational level.

K65R mutation was identified in 1,978 patients, meaning a national prevalence of 6.1% in 2010-2017 period, and increased significantly from 2.9% in 2010 to 6.6% in 2017, over the period ( $p < 0.001$ ). In table 3, we demonstrated characteristics of patients harboring the K65R mutation. Concerning gender, K65R mutation was more frequent in male (1,275; 64.4%) ( $p = 0,0039$ ). There was no association concerning ethnicity and K65R presence, comparing white (786; 53.2%) and not white (690; 46.8%) have not demonstrate a significant difference ( $p = 0,32$ ). Concerning educational level, there is an association with higher educational level and K65R presence ( $p = 0,0016$ ). The greatest region prevalence was observed in North region (194; 9.8%) however in a small sample.

The K65R mutation was observed in 362 (18.3%) patients harboring subtype C and in 4,418 (14,7%) in subtype Non-C patients, significantly associated with subtype C in univariate analysis ( $p = 0,0012$ ).

In the multivariate analysis using a logistic regression model, we confirmed an independent association between K65R mutation and subtype C (OR 1.31; 95% CI 1.13-1.51). Male gender was associated with the occurrence of K65R (OR 1.50; 95% CI 1.33-1.69). Having more than 12 years of schooling was also an independent risk factor for the prevalence of K65R (OR 1.21; 95% CI 1.03-1.41).

Regarding M184V mutation, we observed in 2010-2017 period a decline in prevalence from 65.6% in 2010 to 30.3% in 2017: in subtype C the M184V prevalence declined from 65.1% in 2010 to 26.1% in 2017, and in subtype non-C declined from 65.7% in 2010 to 31.1% in 2017.

## Discussion

This study was performed among patients failing treatment, corroborating the findings that showed a high prevalence of subtype C in the Brazilian South region, similar as previously reported in naïve [2–4] and therapy exposed patients [27]. All states from South region had a high subtype C prevalence, particularly Santa Catarina state which had the highest prevalence, reaching 64.7%. These results are in consonance with findings that showed a high incidence of subtype C in recent transmissions in the last decade [6]. Possibly, the subtype C prevalence found in Center-west, Rondônia, Bahia and Ceará, could reflect populational migration from South associated with economic and social conditions. Of note, the subtype C prevalence in IDU in a city from Center-west region, reached 20% in 2009 [7].

In the univariate analysis, subtype C was associated with female gender. The role of IDU for the subtype C expansion in Southern Brazil is poorly understood. Possibly, IDU contributed to subtype C spread to women through heterosexual route in the South region and through sharing needles to Center-west region.

We found association between subtype C and ethnicity, and predominance in white patients. Previous studies have found association with black patients and heterosexual transmission [12,16,28], probably because subtype C is associated with HIV/AIDS Epidemics in sub-Saharan

Africa and immigrants living in European Community.

The national prevalence of K65R was 6.1%, rising about three times over in the period, from 2.8% to 6.6% in 2010 and 2017, respectively ( $p < 0.001$ ). In fact, an increase in K65R mutation rates overtime, has been reported in North America [14], and India [15]. The K65R mutation was associated with male gender, possibly because male has a later diagnosis than female in Brazil [27]. In general, male gender have poorer access to health care than female gender in Brazil, in this sense, our hypothesis is that male gender has lower frequency of viral load measurement over time, remaining by a prolonged time in virological failure, probably contributing to the emergence of K65R [12,24,29,30].

Indeed, higher rates of K65R are observed in patients using first line regimens, remaining a long time in virological failure [31–35], because this, resistance rate in Subtype C, are higher in Africa than Europe [36]. We found a significance difference in K65R and educational level association, surprisingly associated with higher educational level. Patients with higher educational level have greater access to information and perhaps their treatment was changed more frequently to TDF containing regimens, due to adverse events perception [37], is possible that higher rates of K65R in previous studies means lower access and in Brazil it means higher access to health care.

Regarding patients with Subtype C, the K65R prevalence reached 7,5% in experienced patients in Brazil. In patients treated with first line regimens and high prevalence of HIV and subtype C, is observed a higher and variable K65R rates, as 12% [20,21], 22% [22], 58% [23] and reaching 69,7% [24].

An independent association between K65R mutation and subtype C, was confirmed by multivariate analysis. Higher educational level was also an independent risk factor for K65R, however male gender had the greatest effect to K65R presence.

Once TDF has the strongest selective pressure for K65R development [11,16–18], it is possible that expanding its use, will increase TDF resistance rate. Brazilian guidelines included TDF as NRTI option to start antiretroviral treatment since 2008 [38], recommending as a first line in dosis fixed combined to lamivudine and efavirenz since 2013 [25]. It is not clear if a high subtype C prevalence, compromise the effectiveness of TDF regimens. Current Brazilian guidelines recommends TDF, lamivudine plus dolutegravir to PEP and first line regimen to start treatment and TDF plus emtricitabine as a PrEP regimen.

This study has some limitations. We did not analyze any individual clinical information, such as antiretroviral regimens, time since the virological failure or lymphocytes T-CD4 count and viral load pre-treatment. However, linkage between this dataset and others that do contain these data is feasible and will be addressed in future studies.

This is the first study that showed an association between Subtype C and K65R mutation in a large sample of Brazilian patients. We also observed an increase in prevalence of K65R mutation in Brazil. Our findings strongly contribute to the understanding of HIV epidemiology in Brazil and to predict a possible impact of resistance trends in first line regimens used in the country.

Acknowledgements

Thanks to Ministry of Health from Brazil for provide access to national dataset.

## References

- 1 United Nations Programme on HIV/AIDS – UNAIDS. Fact Sheet - Global AIDS Update 2019, 2018 Global HIV Statistics. *Unaids* 2019; :1–6.
- 2 Soares MA, de Oliveira T, Brindeiro RM, Diaz RS, Sabino EC, Brígido L, *et al.* A specific subtype C of human immunodeficiency virus type 1 circulates in Brazil. *AIDS* 2003; 17:11–21.
- 3 Inocencio LA, Pereira AA, Sucupira M, Fernandez J, Jorge CP, Souza DF, *et al.* Brazilian Network for HIV Drug Resistance Surveillance: a survey of individuals recently diagnosed with HIV. *J Int AIDS Soc* 2009; 12:20.
- 4 Arruda MB, Boullosa LT, Cardoso CC, da Costa CM, Brites C, de Lima ST, *et al.* Brazilian network for HIV Drug Resistance Surveillance (HIV-BresNet): a survey of treatment-naive individuals. *J Int AIDS Soc* 2018; 21:e25032.
- 5 Silveira J, Santos AF, Martínez AMB, Góes LR, Mendoza-Sassi R, Muniz CP, *et al.* Heterosexual transmission of human immunodeficiency virus type 1 subtype C in southern Brazil. *J Clin Virol* 2012; 54:36–41.
- 6 Grinberg G, Giron LB, Knoll RK, Galinskas J, Camargo M, Arif MS, *et al.* High prevalence and incidence of HIV-1 in a counseling and testing center in the city of Itajaí, Brazil. *Brazilian J Infect Dis* 2015; 19:631–635.
- 7 Guimarães ML, Marques BCL, Bertoni N, Teixeira SLM, Morgado MG, Bastos FI. Assessing the HIV-1 Epidemic in Brazilian Drug Users: A Molecular Epidemiology Approach. *PLoS One* 2015; 10:e0141372.
- 8 Pereira GFM, Shimizu HE, Bermudez XP, Hamann EM. Epidemiologia do HIV e aids no estado do Rio Grande do Sul, 1980-2015. *Epidemiol e Serv saude Rev do Sist Unico Saude do Bras* 2018; 27:e2017374.
- 9 Brenner BG, Oliveira M, Doualla-Bell F, Moisi DD, Ntemgwa M, Frankel F, *et al.* HIV-1 subtype C viruses rapidly develop K65R resistance to tenofovir in cell culture. *AIDS* 2006; 20:F9–F13.
- 10 Invernizzi CF, Coutsinos D, Oliveira M, Moisi D, Brenner BG, Wainberg MA. Signature Nucleotide Polymorphisms at Positions 64 and 65 in Reverse Transcriptase Favor the Selection of the K65R Resistance Mutation in HIV-1 Subtype C. *J Infect Dis* 2009; 200:1202–1206.
- 11 Brenner BG, Coutsinos D. The K65R mutation in HIV-1 reverse transcriptase: genetic barriers, resistance profile and clinical implications. *HIV Ther* 2009; 3:583–594.
- 12 White E, Smit E, Churchill D, Collins S, Booth C, Tostevin A, *et al.* No Evidence That HIV-1 Subtype C Infection Compromises the Efficacy of Tenofovir-Containing Regimens: Cohort Study in the United Kingdom. *J Infect Dis* 2016; 214:1302–1308.
- 13 Miller MD, Margot N, Lu B, Zhong L, Chen S, Cheng A, *et al.* Genotypic and Phenotypic Predictors of the Magnitude of Response to Tenofovir Disoproxil Fumarate Treatment in

Antiretroviral-Experienced Patients. *J Infect Dis* 2004; 189:837–846.

14 Parikh UM, Bachelier L, Koontz D, Mellors JW. The K65R Mutation in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Reverse Transcriptase Exhibits Bidirectional Phenotypic Antagonism with Thymidine Analog Mutations. *J Virol* 2006; 80:4971–4977.

15 Karade S, Chaturbhuj DN, Sen S, Joshi RK, Kulkarni SS, Shankar S, *et al.* HIV drug resistance following a decade of the free antiretroviral therapy programme in India: A review. *Int J Infect Dis* 2018; 66:33–41.

16 Smit E, White E, Clark D, Churchill D, Zhang H, Collins S, *et al.* An association between K65R and HIV-1 subtype C viruses in patients treated with multiple NRTIs. *J Antimicrob Chemother* 2017; 72:2075–2082.

17 Theys K, Vercauteren J, Snoeck J, Zazzi M, Camacho RJ, Torti C, *et al.* HIV-1 Subtype Is an Independent Predictor of Reverse Transcriptase Mutation K65R in HIV-1 Patients Treated with Combination Antiretroviral Therapy Including Tenofovir. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; 57:1053–1056.

18 Tang MW, Rhee S-Y, Bertagnolio S, Ford N, Holmes S, Sigaloff KC, *et al.* Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor Resistance Mutations Associated with First-Line Stavudine-Containing Antiretroviral Therapy: Programmatic Implications for Countries Phasing Out Stavudine. *J Infect Dis* 2013; 207:S70–S77.

19 Doualla-Bell F, Avalos A, Brenner B, Gaolathe T, Mine M, Gaseitsiwe S, *et al.* High Prevalence of the K65R Mutation in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Subtype C Isolates from Infected Patients in Botswana Treated with Didanosine-Based Regimens. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50:4182–4185.

20 Hoffmann CJ, Ledwaba J, Li J, Johnston V, Hunt G, Fielding KL, *et al.* Resistance to tenofovir-based regimens during treatment failure of subtype C HIV-1 in South Africa. *Antivir Ther* 2013; 18:915–920.

21 Etta EM, Mavhandu L, Manhaeve C, McGonigle K, Jackson P, Rekosh D, *et al.* High level of HIV-1 drug resistance mutations in patients with unsuppressed viral loads in rural northern South Africa. *AIDS Res Ther* 2017; 14:36.

22 Karade SK, Ghate M V., Chaturbhuj DN, Kadam DB, Shankar S, Gaikwad N, *et al.* Cross-sectional study of virological failure and multinucleoside reverse transcriptase inhibitor resistance at 12 months of antiretroviral therapy in Western India. *Med (United States)* 2016; 95. doi:10.1097/MD.0000000000004886

23 Skhosana L, Steegen K, Bronze M, Lukhwareni A, Letsoalo E, Papathanasopoulos MA, *et al.* High Prevalence of the K65R Mutation in HIV-1 Subtype C Infected Patients Failing Tenofovir-Based First-Line Regimens in South Africa. *PLoS One* 2015; 10:e0118145.

24 Sunpath H, Wu B, Gordon M, Hampton J, Johnson B, Moosa M-YS, *et al.* High rate of K65R for antiretroviral therapy-naive patients with subtype C HIV infection failing a tenofovir-containing first-line regimen. *AIDS* 2012; 26:1679–1684.

25 Ministério da Saúde do Brasil. Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para manejo da infecção pelo hiv em adultos. 2018; 1:1–416.

- 26 Liu TF, Shafer RW. Web Resources for HIV Type 1 Genotypic-Resistance Test Interpretation. *Clin Infect Dis* 2006; 42:1608–1618.
- 27 Diaz RS, Inocêncio LA, Sucupira MCA, Pereira AA, Hunter J, Ferreira JE, *et al.* The Virological and Immunological Characteristics of the HIV-1-Infected Population in Brazil: From Initial Diagnosis to Impact of Antiretroviral Use. *PLoS One* 2015; 10:e0139677.
- 28 Geretti AM, Harrison L, Green H, Sabin C, Hill T, Fearnhill E, *et al.* Effect of HIV-1 Subtype on Virologic and Immunologic Response to Starting Highly Active Antiretroviral Therapy. *Clin Infect Dis* 2009; 48:1296–1305.
- 29 Kantor R, Smeaton L, Vardhanabhuti S, Hudelson SE, Wallis CL, Tripathy S, *et al.* Pretreatment HIV Drug Resistance and HIV-1 Subtype C Are Independently Associated With Virologic Failure: Results From the Multinational PEARLS (ACTG A5175) Clinical Trial. *Clin Infect Dis* 2015; 60:1541–1549.
- 30 Günthard HF, Scherrer AU. HIV-1 Subtype C, Tenofovir, and the Relationship With Treatment Failure and Drug Resistance. *J Infect Dis* 2016; 214:1289–1291.
- 31 Crawford KW, Wakabi S, Kibuuka H, Magala F, Keshinro B, Okoye I, *et al.* Short Communication: East Meets West: A Description of HIV-1 Drug Resistance Mutation Patterns of Patients Failing First Line Therapy in PEPFAR Clinics from Uganda and Nigeria. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2014; 30:796–799.
- 32 Orrell C, Walensky RP, Losina E, Pitt J, Freedberg KA, Wood R. HIV-1 clade C resistance genotypes in naïve patients and after first virological failure in a large community ART programme. *Antivir Ther* 2009; 14:523–531.
- 33 Villabona-Arenas CJ, Vidal N, Guichet E, Serrano L, Delaporte E, Gascuel O, *et al.* In-depth analysis of HIV-1 drug resistance mutations in HIV-infected individuals failing first-line regimens in West and Central Africa. *AIDS* 2016; 30:2577–2589.
- 34 Barth RE, Aitken SC, Tempelman H, Geelen SP, van Bussel EM, Hoepelman AI, *et al.* Accumulation of drug resistance and loss of therapeutic options precede commonly used criteria for treatment failure in HIV-1 subtype-C-infected patients. *Antivir Ther* 2011; 17:377–386.
- 35 Kityo C, Thompson J, Nankya I, Hoppe A, Ndashimye E, Warambwa C, *et al.* HIV Drug Resistance Mutations in Non-B Subtypes After Prolonged Virological Failure on NNRTI-Based First-Line Regimens in Sub-Saharan Africa. *JAIDS J Acquir Immune Defic Syndr* 2017; 75:e45–e54.
- 36 Gregson J, Tang M, Ndembu N, Hamers RL, Rhee S-Y, Marconi VC, *et al.* Global epidemiology of drug resistance after failure of WHO recommended first-line regimens for adult HIV-1 infection: a multicentre retrospective cohort study. *Lancet Infect Dis* 2016; 16:565–575.
- 37 Rossouw TM, Nieuwoudt M, Manasa J, Malherbe G, Lessells RJ, Pillay S, *et al.* HIV drug resistance levels in adults failing first-line antiretroviral therapy in an urban and a rural setting in South Africa. *HIV Med* 2017; 18:104–114.
- 38 Ministério da Saúde. *Recomendações para Terapia Anti-retroviral em Adultos Infectados pelo HIV: 2008.* ; 2008.



HIV-1 Subtype	Frequency, n	Frequency, %
A	16	0.05%
B	23.198	72.24%
C	4.780	14.89%
CRF01_AE	1	0.00%
CRF02_AG	40	0.12%
CRF05_DF	9	0.03%
CRF12_BF	94	0.29%
CRF20_BG	1	<0.01%
CRF28_BF	6	0.02%
CRF29_BF	325	1.01%
CRF31_BC	230	0.72%
CRF38_BF	1	<0.01%
CRF39_BF	1	<0.01%
CRF40_BF	3	0.01%
CRF45_cpx	29	0.09%
CRF47_BF	9	0.03%
CRF60_BC	1	<0.01%
D	35	0.11%
F	3318	10.33%
G	9	0.03%
H	1	<0.01%
Unknown	4	0.01%

Table 1. Distribution of HIV-1 subtypes in Brazilian patients experiencing virological failure between 2010-2017.

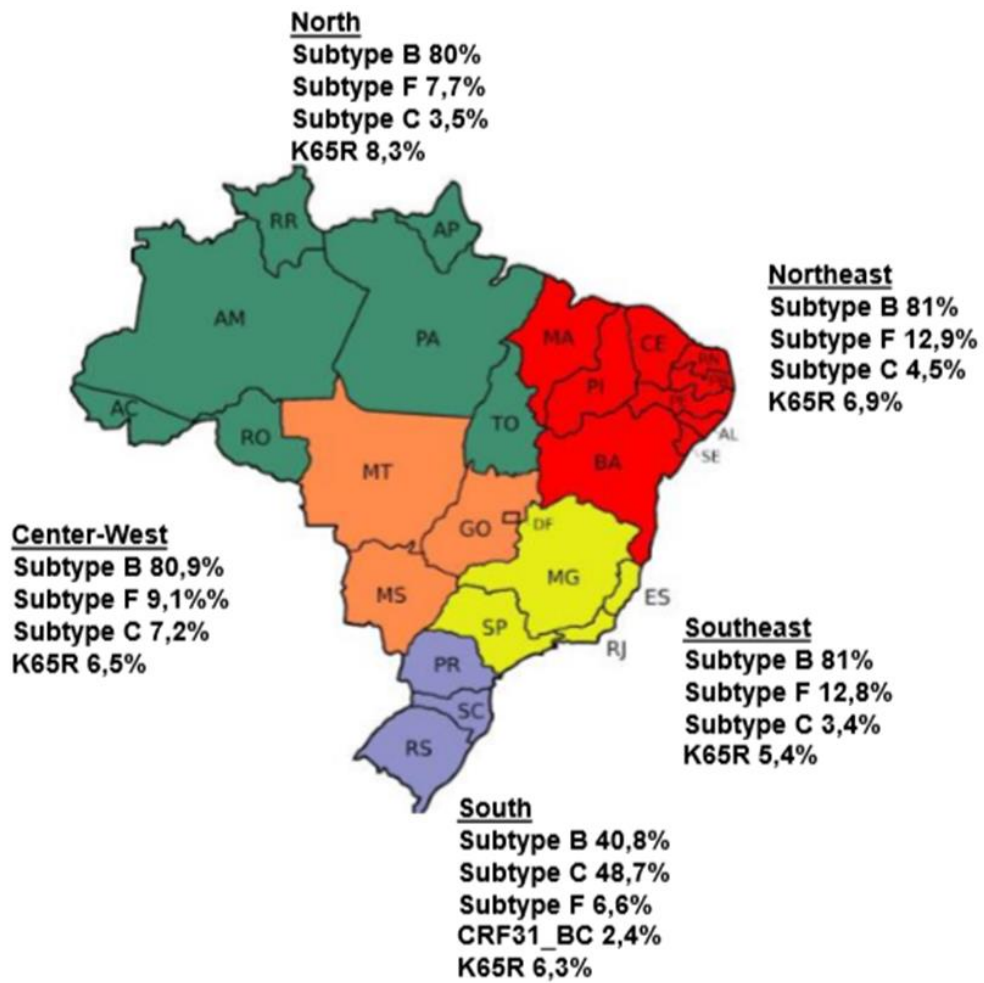


Figure 1 - Regional prevalence of HIV-1 subtypes and K65R mutation

Characteristic	HIV-1 subtype C (n=4780)	HIV-1 non-C subtypes (n=27331)	p value
Male gender, n (%)	2370 (49.6%)	15709 (57.5%)	<0.001
Ethnicity, n (%)			<0.001
Asiatic	20 (0.5%)	100 (0.5%)	
White	3014 (74.8%)	10124 (50.4%)	
Indigenous	4 (0.1%)	18 (0.1%)	
Brown	593 (14.7%)	7631 (38.0%)	
Black	398 (9.9%)	2204 (11.0%)	
Educational level, n (%)			<0.001
under 1 year	82 (2.3%)	478 (2.9%)	
1-3 years	426 (12.1%)	1,978 (11.9%)	
4-7 years	1,508 (42.9%)	5,961 (35.4%)	
8-11 years	1,127 (32.0%)	5,878 (35.4%)	
over 11 years	369 (10.5%)	2,297 (13.8%)	

Table 2 - General characteristics of subtype C and non-subtype C

Characteristic	K65R presence	mutation	K65R absence	mutation	p value
Male gender, n (%)	1,275 (64.4%)		16,804 (55.7%)		<0.001
Ethnicity, n (%)					0.084
Asiatic	4 (0.27%)		116 (0.5%)		
White	786 (53.2%)		12,352 (54.6%)		
Indigenous	0 (0%)		22 (0.1%)		
Brown	542 (36.7%)		7,682 (33.9%)		
Black	144 (9.8%)		2,458 (10.9%)		
Educational level, n (%)					<0.001
under 1 year	25 (2.0%)		535 (2.8%)		
1-3 years	136 (11.0%)		2,268 (12.0%)		
4-7 years	422 (34.3%)		7,407 (37.3%)		
8-11 years	450 (36.6%)		6,555 (34.7%)		
over 11 years	196 (15.9%)		2,470 (13.1%)		
Region					<0.001
North	194 (9.8%)		2,139 (7.1%)		
Northeast	299 (15.1%)		3,979 (13.2%)		
Center-west	115 (5.8%)		1,641 (5.4%)		
Southeast	827 (41.9%)		14,370 (47.8%)		
South	540 (27.3%)		7,947 (26.4%)		
Subtype C	362 (18.3%)		4,418 (14.7%)		<0.001

Table 3 - Characteristic of patients with K65R mutation presence



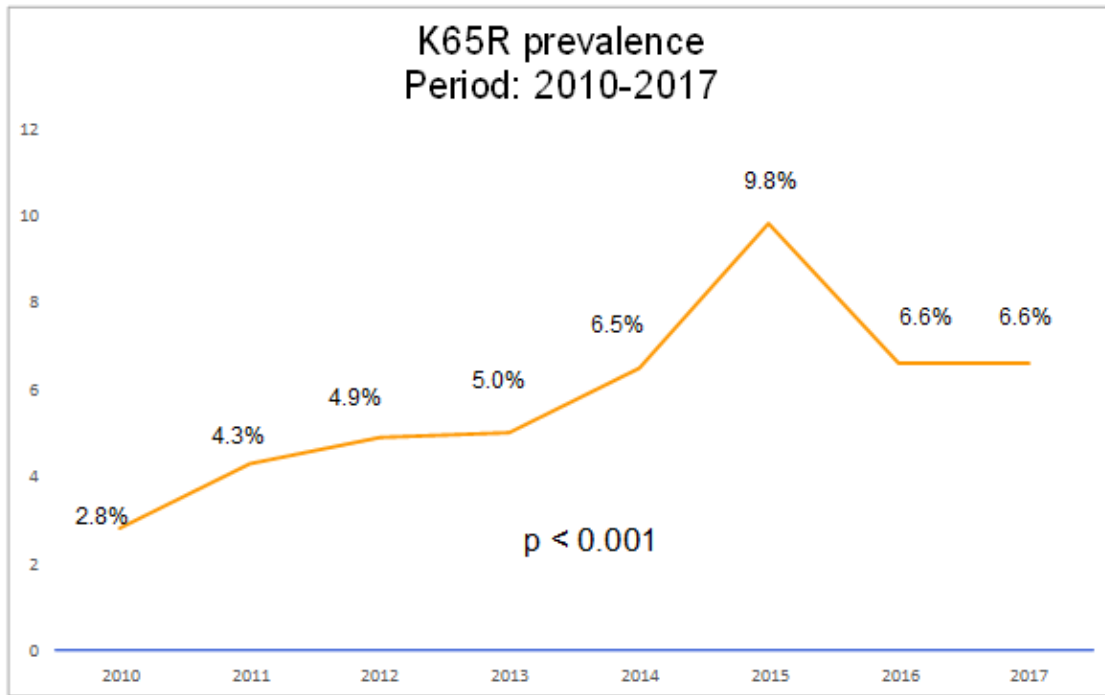


Figure 2 – K65R mutation prevalence in Brazil, in 2010-2017 period

## **8- Considerações Finais**

Este trabalho buscou contribuir para o entendimento da epidemia de Aids no Brasil, especialmente na região sul, aprimorando o conhecimento a respeito de alguns dos fatores que podem estar associados a resistência do subtipo C. Novos estudos, que incluam informações clínicas, adesão ao tratamento, renda, maior completude de de dados sócio-demográficos são necessários para que se compreenda melhor a epidemia no Brasil

## **9- Perspectivas Futuras**

Após a publicação dos resultados, realizaremos relacionamento com as bases de dados nacionais de exames de carga viral e contagem LT-CD4 no Sistema de Exames Laboratoriais (SISCEL) e com Sistema de Controle Logístico de Medicamentos (SICLOM), buscando identificar associação da mutação K65R com outras variáveis, tais como carga viral, contagem de linfócitos-T CD4 pré-tratamento, tempo até falha virológica e esquemas de tratamento.

Realizaremos análises filogenéticas, comparando a homogeneidade do subtipo C que circula no Centro-oeste e estados cuja prevalência for superior a 5%.

Este estudo se propõe a contribuir para o maior conhecimento a respeito da associação do subtipo C com resistência viral, tendo como um de seus desdobramentos, a formação de uma rede nacional de pesquisa clínica e epidemiológica do subtipo C no Brasil.



## 10- Strobe

STROBE Statement—checklist of items that should be included in reports of observational studies

	Item No	Recommendation	Page/comment
<b>Title and abstract</b>	1	(a) Indicate the study's design with a commonly used term in the title or the abstract	Página 32
		(b) Provide in the abstract an informative and balanced summary of what was done and what was found	Página 32 e 33
Introduction			
Background/rationale	2	Explain the scientific background and rationale for the investigation being reported	Página 33 e 34
Objectives	3	State specific objectives, including any prespecified hypotheses	Página 34
Methods			
Study design	4	Present key elements of study design early in the paper	Página 34
Setting	5	Describe the setting, locations, and relevant dates, including periods of recruitment, exposure, follow-up, and data collection	Página 34
Participants	6	(a) <i>Cohort study</i> —Give the eligibility criteria, and the sources and methods of selection of participants. Describe methods of follow-up <i>Case-control study</i> —Give the eligibility criteria, and the sources and methods of case ascertainment and control selection. Give the rationale for the choice of cases and controls <i>Cross-sectional study</i> —Give the eligibility criteria, and the sources and methods of selection of participants	Página 34
		(b) <i>Cohort study</i> —For matched studies, give matching criteria and number of exposed and unexposed <i>Case-control study</i> —For matched studies, give matching criteria and the number of controls per case	
Variables	7	Clearly define all outcomes, exposures,	Página 34

predictors, potential confounders, and effect modifiers. Give diagnostic criteria, if applicable

Data sources/ measurement	8*	For each variable of interest, give sources of data and details of methods of assessment (measurement). Describe comparability of assessment methods if there is more than one group	Página 34 e 35
Bias	9	Describe any efforts to address potential sources of bias	Página 36 e 37
Study size	10	Explain how the study size was arrived at	Página 34 e 35
Quantitative variables	11	Explain how quantitative variables were handled in the analyses. If applicable, describe which groupings were chosen and why	Página 34 e 35
Statistical methods	12	(a) Describe all statistical methods, including those used to control for confounding	Página 35
		(b) Describe any methods used to examine subgroups and interactions	Página 34 e 35
		(c) Explain how missing data were addressed	Página 34
		(d) <i>Cohort study</i> —If applicable, explain how loss to follow-up was addressed <i>Case-control study</i> —If applicable, explain how matching of cases and controls was addressed <i>Cross-sectional study</i> —If applicable, describe analytical methods taking account of sampling strategy	<b>Não aplicável</b>
		(e) Describe any sensitivity analyses	

## Results

Participants	13*	(a) Report numbers of individuals at each stage of study—eg numbers potentially eligible, examined for eligibility, confirmed eligible, included in the study, completing follow-up, and analysed	Página 34
		(b) Give reasons for non-participation at each stage	Página 34
		(c) Consider use of a flow diagram	
Descriptive data	14*	(a) Give characteristics of study participants (eg demographic, clinical, social) and information on exposures and potential confounders	Página 35
		(b) Indicate number of participants with missing data for each variable of interest	Página 35
		(c) <i>Cohort study</i> —Summarise follow-up time (eg, average and total amount)	
Outcome data	15*	<i>Cohort study</i> —Report numbers of outcome events or summary measures over time	
		<i>Case-control study</i> —Report numbers in each exposure category, or summary measures of exposure	
		<i>Cross-sectional study</i> —Report numbers of outcome events or summary measures	Página 35 e 36
Main results	16	(a) Give unadjusted estimates and, if applicable, confounder-adjusted estimates and their precision (eg, 95% confidence interval). Make clear which confounders were adjusted for and why they were included	
		(b) Report category boundaries when continuous variables were categorized	
		(c) If relevant, consider translating estimates of relative risk into absolute risk for a meaningful time period	
Other analyses	17	Report other analyses done—eg analyses of subgroups and interactions,	Não se aplica

and sensitivity analyses

Discussion			
Key results	18	Summarise key results with reference to study objectives	Encontrado associação da mutação K65R com subtipo C, gênero e nível educacional
Limitations	19	Discuss limitations of the study, taking into account sources of potential bias or imprecision. Discuss both direction and magnitude of any potential bias	Não estavam disponíveis as informações clínicas
Interpretation	20	Give a cautious overall interpretation of results considering objectives, limitations, multiplicity of analyses, results from similar studies, and other relevant evidence	Confirma associação de subtipo c e resistência a tenofovir
Generalisability	21	Discuss the generalisability (external validity) of the study results	Influências dos achados na escolha de tratamento adotado no Brasil
Other information			
Funding	22	Give the source of funding and the role of the funders for the present study and, if applicable, for the original study on which the present article is based	Não aplicável

## 11- Anexos

### Anexo 1 - Características dos estudos que associam subtipo C e mutação K65R

Desenho do estudo	Amostra	Subtipo	Esquema	K65R	Conclusões
Estudo transversal Análise genotípica Villabona-Arenas, 2016	N= 3736 África Central e Oeste africano	Vários Subtipos	AZT ou d4T/3TC/EFZ ou NVP 1303 tratados 2137 virgens	3,5% em 12 meses	Falha virológica mais precoce com Subtipo C em relação ao Subtipo B
Estudo transversal Análise genotípica Karade, 2016	N= 844 Análise de 80 genotipagens disponíveis	Subtipo C 97,5%	AZT/3TC/NVP AZT/3TC/EFZ TDF/3TC/NVP TDF/3TC/EFZ	22,5% das genotipagens	53% dos expostos a TDF desenvolveram K65R
Coorte multicêntrica Retrospectiva 36 países Análise genotípica Tenores study, 2016	N= 1.926 em falha virológica período 1998 a 2015, Análise de 700 pacientes com resistência a TDF (K65R/N ou K70E/G/Q)	Resistência ao TDF foi associada ao Subtipo C comparado Não-C e Não B: análise limitada a Europa	TDF/3TC ou FTC/ INNTR	taxas de resistência a TDF: África Subsaariana (57%) vs Europa (20%).	Maiores taxas de falha virológica na África Subsaariana do que na Europa
Coorte retrospectiva Com análise genotípica e fenotípica Derache, 2016	N=47 Malawi (N=30) África do Sul (N=8) Tanzânia (N=5) Tailândia (N=1)	Subtipo C	d4T/3TC/ INNTR (N=30) TDF/3TC/NVP (N=3) AZT/3TC/ INNTR (N=11)	N= 38 (80%)	K65R associada a subtipo C e CRF02_AG
Coorte retrospectiva Planejada pela análise	N=338 Nigéria	Não B/C	AZT//3TC/INTR N ou d4T/3TC/ INNTR 41(12%)	N= 37 (10,9%) TDF em 24 pacientes (64,9%)	Amostra pequena para associar K65R com subtipos

genotípica Hawkins, 2009			exposição prévia a TDF	AZT ou d4T/3TC/NVP em 13 (35%)	
Coorte retrospectiva Planejada pela análise genotípica Etta, 2017	N= 72 Zona rural da África do Sul	N= 65 (94%)	TDF/FTC ou 3TC/EFZ N=35 (48%) TDF/3TC/LPV/r n=9 (12,5%) ABC/3TC/EFZ N=7 (9,7%) Outros: N=21 (29,2%)	51%	K 65R em 12%
Coorte retrospectiva Análise genotípica Doulla-bell, 2006	23	23	AZT/3TC/NVP AZT/3TC/EFZ ddl/d4T/NVP ddl/d4T/EFZ		7 (30%) que usaram ddl/d4T
Estudo transversal Análise genotípica Sunpath, 2012	N= 585 pacientes sul-africanos - Análise de 33 genotipagen s entre 35 com falha viroológica usando TDF	33 com falha a TDF e genotpage m	TDF/3TC/EFZ ou NVP (N=585) D4T/3TC/EFZ ou NVP (N=53)	23 (69,7%)	Altas taxas de K65R associada com TDF
Análise retrospectiva de uma coorte Hoffman, 2009	Análise de 40 genotipagen s entre 270 em falha virilógica, África do Sul	Subtipo C	TDF (mediana de 152 dias de uso antes da falha)) em substituição a AZT ou d4T/ 3TC/INNTR	K65R foi em 5 (12%) das genotipagens analisadas	Troca de esquema pode ter ocorrido naqueles com boa adesão, por esta razão, baixa taxa de K65R
Estudo transversal análise de sistema de informações	N= 2.116	N= 272 (13%) Subtipo B= 1.335 (86%) Etnia fortemente	AZT/3TC/EFZ na maioria em todos subtipos Outros esquemas: d4T	Supressão viral semelhante entre os subtipos	Estudo transversal análise de sistema de informações do reino unido

do reino unido Geretti, 2009		associada a Subtipos	ou TDF ou ABC/3TC/NVP		(Geretti, 2009)
Coorte prospectiva, análise de banco de dados do reino unido White, 2016	N= 8.749	N=6.149 Subtipo B= 4.123 Subtipo C= 823	TDF/3TC ou FTC/INNTR ou IP/r	- 260 entre 624 (41.7%) B= 309 C= 142 Não B e não C= 173  K65R, significativamente e observada no subtipo C (22.7%) que no subtipo B (6.1%) ou Não-B Não-C (8.1%).	Coorte prospectiva, análise de banco de dados do reino unido White, 2016
Coorte em 1 centro no reino unido Frater, 2002	Europeus N= 265 Africanos N= 97	- Europeus: Subtipo B 80 (100%) - Africanos: Subtipo C 20 (34%), A 13 (22%), D 21 (36%), outros 5 (8%)	INTR: AZT/3TC, AZT/ddl, d4T/3TC, d4T/ddl INTRNN: NVP ou EFZ IP: IDV ou NFV	Sem diferenças na supressão a curto prazo Maior tempo de supressão viral entre europeus após 9 meses	Coorte em 1 centro no reino unido Frater, 2002
Estudo transversal de genotipagens de 35 estudos Tang, 2013	1.825 sequências genotípicas de 35 estudos, 65% das genotipagens provenientes da população africana	Subtipo C (42.3%), CRF01_AE (23.6%), CRF02_AG (9.0%) e B (7.2%),	d4T/3TC/NVP (67%) ou d4T/3TC/EFV (33%)	- K65R associada com CRF01_AE - - K65R combinada ou não à Q151M associada com Subtipo C e CRF01_AE.	Estudo transversal de genotipagens de 35 estudos Tang, 2013
Estudo transversal de	N= 5.100	Subtipo B (3410) Subtipo C	Subtipo B mais frequentemente recebeu AZT, ddl	Análise multivariada K65R associada	K65R detectada em subtipo B

sequências genotípicas Smit, 2017		(810)	ou ABC e menos frequente TDF	ao subtipo C	(7.8%) e subtipo C (14.2%) Selecionada 5 vezes mais com exposição a TDF.
-----------------------------------	--	-------	------------------------------	--------------	---