

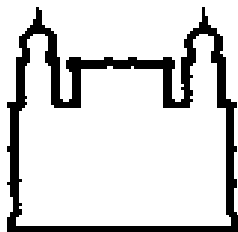
Instituto Oswaldo Cruz
Doutorado em Biologia Parasitária

***ESTUDOS SOBRE ASPECTOS VIRAIS E
GENÉTICOS RELACIONADOS À INTEGRASE
E AO PROCESSO DE INTEGRAÇÃO DO HIV-1***

por

CAROLINE PEREIRA BITTENCOURT PASSAES

Rio de Janeiro
2012



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Curso de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

***ESTUDOS SOBRE ASPECTOS VIRAIS E
GENÉTICOS RELACIONADOS À INTEGRASE
E AO PROCESSO DE INTEGRAÇÃO DO HIV-1***

por

CAROLINE PEREIRA BITTENCOURT PASSAES

Tese submetida à Coordenação de Pós-Graduação do Instituto
Oswaldo Cruz para a obtenção do grau de Doutor em Biologia
Parasitária (Área de Concentração: Genética e Bioquímica)

Orientador: Dra Mariza Gonçalves Morgado

Rio de Janeiro
2012

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Curso de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

Esta Tese intitulada:

***ESTUDOS SOBRE ASPECTOS VIRAIS E
GENÉTICOS RELACIONADOS À INTEGRASE
E AO PROCESSO DE INTEGRAÇÃO DO HIV-1***

Apresentada por

CAROLINE PEREIRA BITTENCOURT PASSAES

Foi avaliada pela Banca Examinadora composta pelos seguintes membros:

Dr. Thiago Moreno Lopes e Souza (Presidente)

Dr. Marcelo Alves Soares

Dr. Luiz Fernando de Macedo Brígido

Dr. Renato Santana Aguiar

Dra. Vanessa Salete de Paula

Tese defendida e aprovada em 27 de fevereiro de 2012.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de AIDS e Imunologia Molecular do Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, sob orientação da Dr^a Mariza Gonçalves Morgado.

Dedico este trabalho à minha mãe pelo amor incondicional, pelo exemplo que você é para mim e por ter me ensinado os valores que sigo na minha vida;

ao meu marido por me incentivar e apoiar diariamente na profissão que eu escolhi, por me motivar a buscar meus objetivos e por me fazer uma pessoa feliz;

ao meu pai e ao meu avô que nos deixaram durante o período desta tese, tenho certeza de que estão orgulhosos de mim por este momento.

Muito obrigada!

"So many of our dreams at first seem impossible, then they seem improbable, and then, when we summon the will, they soon become inevitable"

Christopher Reeve

Agradecimentos

À Fundação Oswaldo Cruz e ao Instituto Oswaldo Cruz, pela estrutura e oportunidade de desenvolver esta tese.

À FAPERJ, ao CNPq, e ao Departamento de DST/AIDS e Hepatites Virais do Ministério da Saúde pelo suporte financeiro.

Aos membros da banca, por terem aceitado avaliar este trabalho.

A toda a minha família, por todo o amor, apoio e incentivo que sempre me foram dados!

À Dra. Mariza, pela orientação desde o Mestrado e por ter aberto as portas do seu laboratório para que eu pudesse crescer e amadurecer profissionalmente ao longo desses sete anos! Obrigada por tudo!

Aos meus amigos Dra. Monick e Dr. Gonzalo, duas pessoas que tem o meu carinho e admiração incondicionais! Por serem exemplos para mim, por todo o suporte que me deram ao longo da minha jornada no laboratório, e por tudo que eu tive a oportunidade de aprender com vocês ao longo desse período, muito obrigada!

Ao Dr. Mario Stevenson pela oportunidade do Doutorado-Sanduíche!

Ao Dr. Aguinaldo Pinto e seu aluno Tiago, obrigada pela oportunidade de colaborarmos e publicarmos juntos!

À equipe médica do IPEC e do HGNI, especialmente às Dras. Beatriz Grinsztejn, Sandra Wagner, Carla Vorsatz, e ao Dr. José Henrique Pilotto pelo apoio na área de pesquisa clínica.

A dois amigos que tiveram um papel importante no desenvolvimento desta tese, Edson e Fernanda, muito obrigada por vocês serem tão parceiros!

A todos os amigos do Laboratório de AIDS, minha segunda família, pessoas que eu admiro muito e sou grata por poder compartilhar meus dias com vocês!

À Dra. Cynthia Cardoso, obrigada por você ser minha amiga há tanto tempo, por ter me incentivado a buscar novos desafios e por ser um exemplo de dedicação e competência! Tenho muito orgulho de ser sua amiga!

Aos amigos do LAVIMOAN, especialmente à minha amiga Ana Luiza, obrigada por me receberem sempre de portas abertas, por fazerem com que eu me sinta em casa e pela motivação contagiante que vocês têm!

À Comissão de Pós-Graduação da Biologia Parasitária, por terem aberto as portas para que eu pudesse atuar como representante dos alunos e por sempre terem respeitado as minhas opiniões e sugestões. Obrigada por tudo que tive a oportunidade de aprender com vocês ao longo de mais de um ano de convivência, espero ter contribuído para fazer um programa de pós-graduação cada vez melhor!

Aos amigos do Laboratório do Dr. Stevenson, por terem me recebido tão bem e por terem feito esses meses longe de casa muito mais fáceis e agradáveis para mim!

À Dra. Carolina Schmaltz, do IPEC, que cuidou tão bem de mim no momento em que eu mais precisei!

A todos com quem eu tive a oportunidade de aprender e dividir todo tipo de conhecimento ao longo dessa minha caminhada!

Resumo

A integrase (IN) é uma enzima chave para o ciclo de replicação do HIV, sendo responsável por catalisar a integração do genoma do HIV no cromossomo hospedeiro. Devido ao papel essencial desta enzima para a patogênese da infecção pelo HIV, a recente introdução dos inibidores de IN (INI) na prática clínica e em vista da escassez de informação sobre a diversidade genética da IN do HIV no Brasil, o presente estudo tem como objetivos a) investigar a diversidade genética da IN e os níveis de resistência primária nos subtipos B, C e F do HIV que são prevalentes no Brasil; b) acompanhar pacientes sob terapia antirretroviral em esquemas contendo raltegravir (RAL) a fim de monitorar a emergência de mutações de resistência aos INI; c) desenvolver um método de genotipagem da IN do HIV para ser usado na prática clínica no Brasil; e d) investigar o envolvimento do processo de integração no controle da replicação do HIV.

Não foram detectadas mutações principais associadas aos INI entre os indivíduos virgens de tratamento infectados com diferentes subtipos de HIV-1. O nível de mutações acessórias observadas foi bem baixo, e algumas posições foram polimórficas nas amostras brasileiras dos subtipos B, C e F. Esses resultados encorajam o uso de INI no Brasil. Analisando as coortes de pacientes que trocaram a enfuvirtida por RAL ou sob terapia de resgate com RAL, nós observamos um aumento nas contagens de células T CD4+ e uma rápida diminuição da carga viral no grupo sob terapia de resgate. Três pacientes não atingiram supressão virológica e as mutações Q148H+G140S foram detectadas em dois deles. A fim de monitorar o crescente número de pacientes sob terapia com RAL no Brasil, nós desenvolvemos um método de genotipagem *in-house* que está atualmente em teste pela rede de Genotipagem do Ministério da Saúde do Brasil para futura incorporação no monitoramento de pacientes falhando INI. Sobre o papel da IN no controle da infecção pelo HIV, não observamos mutações nos resíduos importantes para a atividade catalítica nas sequências de IN obtidas de pacientes controladores da infecção pelo HIV, nem acúmulo de DNA 2-LTR, sugerindo que não há um mecanismo bloqueando a integração nestes pacientes.

Juntos, os resultados apresentados trazem informações importantes sobre a diversidade genética da IN, resistência aos INI e sobre o papel da IN na patogênese da infecção pelo HIV.

Abstract

Integrase (IN) is a key enzyme for the HIV-1 replication cycle, being responsible for catalyzing the integration of HIV genome into the host chromatin. Due to the essential role of this enzyme for HIV pathogenesis, the recent introduction of IN inhibitors in the clinical practice and in view of the paucity of information about the genetic diversity of HIV IN in Brazil, the present study aims to a) investigate the genetic diversity of IN and the levels of primary resistance in HIV subtypes B, C and F that are prevalent in Brazil; b) follow-up patients under antiretroviral therapy schemes containing raltegravir (RAL) in order to monitor the emergence of resistance mutations to IN inhibitor (INI); c) develop a method to genotype HIV IN to be used in clinical practice in Brazil; and d) investigate the involvement of the integration process in the control of HIV replication.

No major resistance mutations associated to INI were detected among drug-naïve individuals infected with distinct HIV-1 subtypes. The level of accessory mutations was very low, and some positions were polymorphic in Brazilian samples of HIV subtypes B, C and F. These results encourage the use of INI in Brazil. By analyzing cohorts of patients that switched from enfuvirtide to RAL or under salvage therapy with RAL we observed an increase in T CD4⁺ cell counts and a rapid decay of viral load in this salvage therapy group. For three patients, virological suppression was not achieved and the mutations Q148H+G140S were detected for two of them. In order to monitor the increasing number of patients under therapy with RAL in Brazil, we developed an in-house genotyping method that is currently under test by the Brazilian Ministry of Health Genotyping Network for further incorporation for the management of HIV patients failing INI. Concerning the role of the IN in the control of HIV infection, we did not observe mutations at residues important for catalytic activity in the integrase sequences obtained from HIV controller patients or an accumulation of 2-LTR DNA, suggesting that there is not a mechanism blocking HIV integration in these patients.

Taken together, the results here presented bring important insights about HIV IN diversity, resistance to INI and the role of IN in HIV pathogenesis.

Lista de ilustrações

| | Página |
|---|--------|
| Figura 1: Estimativa do número de adultos e crianças vivendo com HIV/AIDS, 2009. | 2 |
| Figura 2: Distribuição dos subtipos de HIV-1 no Brasil. | 5 |
| Figura 3: Estrutura da partícula viral. | 7 |
| Figura 4: Estrutura genômica do HIV. | 8 |
| Figura 5: Esquema representativo do ciclo de replicação do HIV. | 10 |
| Figura 6: Esquema representativo e estrutura tridimensional da integrase | 13 |
| Figura 7: Estrutura tridimensional da integrase do HIV-1 (resíduos 1-212) na forma dimérica e tetramérica | 15 |
| Figura 8: Representação esquemática da etapa de processamento 3' da reação de integração | 16/17 |
| Figura 9: Representação esquemática das etapas envolvidas desde a entrada do HIV na célula hospedeira até a integração do DNA viral | 18 |
| Figura 10: Representação esquemática da etapa de transferência de fitas da reação de integração | 20 |
| Figura 11: Progressão da doença em pacientes HIV-1 positivos progressores típicos, rápidos e LTNPs, de acordo com as contagens de células T CD4+ e carga viral | 22 |
| Figura 12: Distinção entre pacientes não progressores de longo termo e controladores de elite | 23 |
| Figura 13: Demonstração do acúmulo de DNA circular no núcleo da célula quando há inibição do processo de integração | 26 |
| Figura 14: Impacto dos principais perfis de resistência ao raltegravir na capacidade replicativa viral | 35 |

Lista de tabelas

| | Página |
|---|--------|
| Tabela 1. Principais ensaios clínicos que avaliaram o uso do raltegravir | 31 |

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

| | |
|------------------------------|---|
| Aids | Síndrome da Imunodeficiência Adquirida |
| APOBEC | <i>Apolipoprotein B mRNA-editing enzyme</i> |
| BAF | <i>Barrier-to-autointegration factor</i> |
| CA | Capsídeo |
| CDK p21 ^{Cip1/Waf1} | cyclin-dependent kinase |
| cDNA | Ácido Desoxiribonucléico complementar |
| cPPT | Trato polipurina complementar |
| CRF | Forma(s) Recombinante(s) Circulante(s) |
| CTL | Linfócito T citotóxico |
| DNA | Ácido Desoxiribonucléico |
| DST | Doenças sexualmente transmissíveis |
| FDA | <i>Food and Drug Administration</i> |
| HAART | Terapia Anti-retroviral de Alta Potência |
| HIV | Vírus da Imunodeficiência Humana |
| HMGs | <i>High-mobility group proteins</i> |
| IN | Integrase |
| IP | Inibidores de Protease |
| kDa | Kilodalton |
| LEDGF/p75 | <i>Lens-epithelium-derived growth factor/p75</i> |
| LTR | Longas Repetições Terminais |
| MA | Matriz |
| MHC | Complexo Maior de Histocompatibilidade |
| NC | Nucleocapsídeo |
| NK | Células <i>natural killer</i> |
| NNRTI | Inibidores Não-Nucleosídicos da Transcriptase Reversa |
| NRTI | Inibidores Nucleosídicos da Transcriptase Reversa |
| OMS | Organização Mundial de Saúde |
| PCR | Reação da Polimerase em Cadeia |
| PIC | Complexo de Pré-Integração |
| PR | Protease |
| RAL | Raltegravir |
| RENAGENO | Rede Nacional de Genotipagem |
| RNA | Ácido Ribonucléico |

| | |
|-------------------|---|
| RNA _m | RNA mensageiro |
| RRE | Elemento responsivo a Rev |
| RT | Transcriptase reversa |
| RTC | Complexo de retrotranscrição |
| SAMHD1 | <i>Sterile alpha motif and HD domain 1</i> |
| SIV | Vírus da Imunodeficiência Símia |
| SNP | Polimorfismo de base única |
| TCD4 ⁺ | Linfócitos TCD4 positivos |
| TCD8 ⁺ | Linfócitos TCD8 positivos |
| TRIM | <i>Tripartite motif 5-alpha</i> |
| UNAIDS | Programa das Nações Unidas no combate ao HIV/AIDS |

Sumário

| | Página |
|--|--------|
| I. Introdução | 1 |
| 1.1) A epidemia global de AIDS e dados epidemiológicos no Brasil | 1 |
| 1.2) O Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) | 3 |
| 1.2.1) Classificação do HIV e diversidade genética | 3 |
| 1.2.2) A partícula viral e organização genômica do HIV | 7 |
| 1.2.3) Ciclo de replicação do HIV | 8 |
| 1.2.4) Integração do HIV ao genoma celular | 12 |
| 1.2.4.1) Integrase: estrutura | 12 |
| 1.2.4.2) O processo de integração | 15 |
| 1.2.4.3) Integração e patogênese da infecção | 21 |
| 1.2.4.4) A integrase como alvo da terapia antirretroviral | 28 |
| 1.3) Justificativa | 37 |
| II. Objetivos | 38 |
| 2.1) Objetivo Geral | 38 |
| 2.2) Objetivos Específicos | 38 |
| III. Documentos | 39 |
| 3.1) Documento 1 - <i>“Lack of primary mutations associated with integrase inhibitors among HIV-1 subtypes B, C, and F circulating in Brazil”</i> | 40 |
| 3.2) Documento 2 - <i>“HIV-1 genetic diversity and drug resistance among treatment naïve patients from Southern Brazil: an association of HIV-1 subtypes with exposure categories”</i> | 48 |
| 3.3) Documento 3 - <i>“Monitoring the emergence of resistance mutations in patients under salvage therapy with raltegravir in Rio de Janeiro, Brazil: a follow-up study”</i> | 56 |
| 3.4) Documento 4: <i>“Desenvolvimento de uma metodologia nacional de genotipagem da integrase do HIV-1: ampliação do protocolo e avaliação da estabilidade e reprodutibilidade do método para monitoramento dos pacientes sob terapia com o raltegravir”</i> | 79 |

| | |
|--|-----|
| 3.4.1) Documento 4a: “ <i>Development and evaluation of a one step in-house assay for HIV-1 integrase drug resistance genotyping</i> ” | 81 |
| 3.4.2) Documento 4b: “ <i>Plataforma Brasileira de Genotipagem da Integrase - Manual de utilização da técnica - Versão 1.0</i> ” | 97 |
| 3.5) Documento 5 - “ <i>Integration in HIV controllers: lack of evidence of circular DNA accumulation</i> ” | 142 |
| IV. Discussão | 162 |
| V. Conclusões | 173 |
| VI. Perspectivas | 175 |
| VII. Bibliografia | 176 |

I. Introdução

1.1) A epidemia global de Aids e dados epidemiológicos no Brasil

Desde o início da década de 80, quando foi diagnosticado o primeiro caso da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), esta epidemia tornou-se papel extremamente importante no cenário mundial, mobilizando desde os campos científico, político e judiciário para produzir conhecimento nas áreas de pesquisa básica e clínica, epidemiologia, sociologia, direitos humanos, dentre várias outras. Sua etiologia viral foi descrita em 1983 (BARRÉ-SINOUSI *et al.*, 1983; GALLO *et al.*, 1983), sendo a Aids causada pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) (COFFIN *et al.*, 1986a; COFFIN *et al.*, 1986b).

A epidemia de infecção pelo HIV é claramente definida como um relevante problema de saúde pública e, além disso, caracteriza-se como um sério problema sócio-econômico, uma vez que a população economicamente ativa é a mais acometida. De acordo com o último boletim da UNAIDS/OMS, estima-se que 33,3 milhões de pessoas estejam infectadas pelo HIV (Figura 1), dentre as quais 2,6 milhões contraíram o vírus no último ano. Apesar da diminuição na incidência global de AIDS ter sido em torno de 19% quando comparada com os dados de 2004, o número estável de pessoas infectadas reflete uma política de sucesso no acesso à terapia antirretroviral nos últimos anos, o que vem causando uma significativa diminuição no número de mortes em decorrência da AIDS. Dados do último boletim mostram que a epidemia global de AIDS foi responsável pela morte de 1,8 milhão de pessoas no ano de 2009, mostrando uma redução quando comparada com os 2,1 milhões de pessoas que morreram em 2004 em decorrência da doença. Em parte, esta redução também se deve a adoção de estratégias de prevenção como: educação, adoção de práticas sexuais seguras, combate ao estigma e discriminação, combate às leis discriminatórias e acesso às políticas de saúde pública em diversos países (AIDS EPIDEMIC UPDATE, 2010).

Dentre as 33,3 milhões de pessoas infectadas pelo HIV, aproximadamente 1,4 milhão encontra-se nas Américas Central e do Sul (Figura 1). Nestas regiões, há uma estimativa de 92.000 novos casos e 58.000 mortes no ano de 2009 (AIDS EPIDEMIC UPDATE, 2010).

Adults and children estimated to be living with HIV | 2009

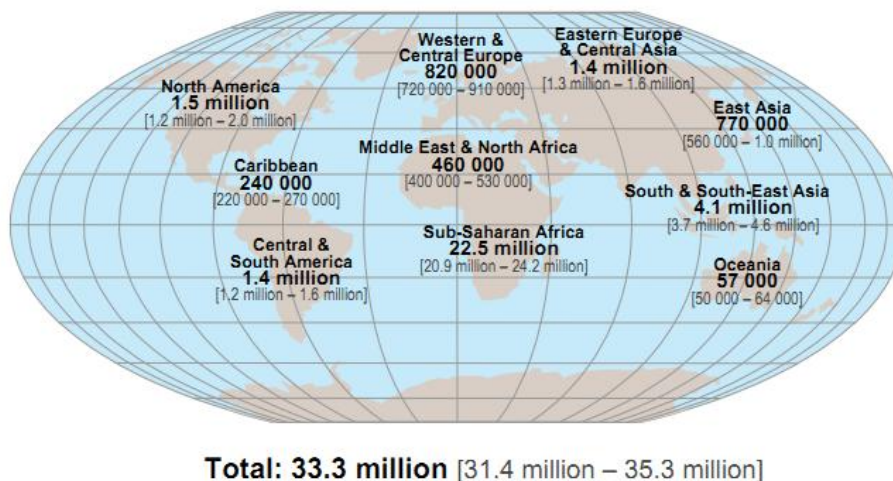


Figura 1: Estimativa do número de adultos e crianças vivendo com HIV/AIDS, 2009. Fonte: AIDS EPIDEMIC UPDATE, 2010.

Por ser um país populoso e possuir a maior extensão territorial na América do Sul, o Brasil alberga 1/3 dos pacientes portadores do HIV no continente. A prevalência de infecção pelo HIV no Brasil está estabilizada em torno de 0,6%.

O perfil de transmissão do HIV vem mudando ao longo do tempo no país, deixando de estar relacionado aos “grupos de risco” e expandindo significativamente entre a população heterossexual. Apesar da mudança nas características da epidemia no Brasil, as prevalências ainda são mais elevadas nas populações vulneráveis, destacando-se aquelas entre usuários de drogas ilícitas (5,9%), homens que fazem sexo com homens (10,5%) e mulheres profissionais do sexo (5,1%) (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO, 2010; AIDS EPIDEMIC UPDATE, 2010).

Entre os anos de 1980 e junho de 2010, foram notificados 592.914 casos de AIDS no Brasil, e estima-se que até 810.000 indivíduos possam estar infectados pelo HIV no país (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO, 2010; AIDS EPIDEMIC UPDATE, 2010). Nos últimos anos, a epidemia de AIDS no Brasil vem apresentando algumas tendências importantes, como: feminização, juvenização, pauperização e interiorização (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO, 2006). Além disso, o Programa Brasileiro de DST/AIDS tem focado sua atenção em algumas populações especiais, como por exemplo, indivíduos de 50 anos de idade ou mais (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO, 2008); menores de cinco anos de idade (BOLETIM

EPIDEMIOLOGICO, 2009), jovens de 13 a 24 anos de idade (BOLETIM EPIDEMIOLOGICO, 2007 e 2010), o que reflete uma preocupação do Ministério da Saúde com essas populações e a consequente adoção de estratégias de prevenção específicas voltadas para as mesmas. Além disso, vale ressaltar que políticas de acesso a terapia antirretroviral brasileira continua sendo uma referência mundial, segundo a UNAIDS (AIDS EPIDEMIC UPDATE, 2010).

1.2) O Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV)

1.2.1) Classificação do HIV e diversidade genética

O HIV é um retrovírus pertencente à família *Retroviridae* e ao gênero *Lentivirus*. A família dos Retrovírus caracteriza-se pela presença da enzima transcriptase reversa, cuja função é promover a retrotranscrição do RNA viral em DNA complementar (cDNA), e pela capacidade de integrar o seu material genético no genoma hospedeiro. O gênero *Lentivirus* abrange vírus que causam infecções de evolução lenta (ROQUEBERT *et al.*, 2009).

Uma das características mais marcantes do HIV é a sua acentuada diversidade genética. Os dois tipos conhecidos de HIV, HIV-1 e HIV-2, são oriundos de eventos distintos de introdução na população humana. O HIV-1 é dividido em quatro grupos: M (*major*), N (*new*), O (*outlier*) e P (*putative*). Cada grupo deste representa uma introdução distinta na população humana, sendo os grupos M e N relacionados com o SIVcpz, que infecta chimpanzés (*Pan troglodytes troglodytes*) (GAO *et al.*, 1999) e os grupos O e P estão filogeneticamente relacionados com o SIVgor (*Gorilla gorilla gorilla*) (VAN HEUVERSWYN *et al.*, 2006; PLANTIER *et al.*, 2009). Já o HIV-2 apresenta estreita relação com o SIVsm, que infecta macacos *Sooty mangabey* (*Cercocebus atys*) (GAO *et al.*, 1992).

Os grupos N, O e P do HIV-1 e o HIV-2 causam um número restrito de infecções, que se concentram principalmente nas regiões Central e Oeste do continente africano (HEMELAAR *et al.*, 2011), apesar de casos isolados já terem sido descritos em outros continentes (AGUT *et al.*, 1992; PEETERS *et al.*, 1995; HAMPL *et al.*, 1995; RAYFIELD *et al.*, 1996; SORIANO *et al.*, 2000; DOUGAN *et al.*, 2005; VALADAS *et al.*, 2009; DEPATUREAUX *et al.*, 2010; KANNANGAI *et al.*,

2010; DELAUGERRE *et al.*, 2011). Já os vírus pertencentes ao grupo M do HIV-1 são os responsáveis por mais de 95% dos casos de AIDS em todo o mundo. Devido a sua grande diversidade genética, o grupo M do HIV-1 é subdividido em 9 subtipos; A-D, F-H, J e K (MYERS *et al.* 1992; LOUWAGIE *et al.* 1993; JANSSENS *et al.* 1994; LEITNER *et al.* 1995; LOUWAGIE *et al.* 1995; TRIQUES *et al.* 2000) e os subtipos A e F são ainda divididos nos sub-subtipos A1-A5 e F1-F2 (TRIQUES *et al.* 1999; GAO *et al.*, 2001; MELONI *et al.*, 2004; VIDAL *et al.*, 2006).

Além da grande diversidade de subtipos virais, a ocorrência de recombinação entre esses diferentes subtipos é um potente mecanismo gerador de diversidade do HIV-1. As formas recombinantes circulantes (CRFs) são definidas como “vírus que apresentam um mesmo padrão de recombinação, identificados em pelo menos três indivíduos epidemiologicamente não relacionados e caracterizados pelo sequenciamento de seu genoma completo” (ROBERTSON *et al.*, 2000). Até o presente momento, 51 CRFs estão descritas no Banco de Dados de Los Alamos (<http://www.hiv.lanl.gov/>). Com o avanço e popularização das metodologias de sequenciamento de DNA, além das CRFs, um grande número de formas recombinantes únicas (URFs) vêm sendo descritas.

A distribuição global dos subtipos de HIV-1 não é homogênea. Em um estudo recente, que analisou a distribuição dos subtipos em diferentes países no período de 2004 a 2007 (HEMELAAR *et al.*, 2011) e comparou com o período de 2000 a 2003 (HEMELAAR *et al.*, 2006), podemos observar uma tendência à estabilização nesta distribuição, apesar de um aumento na representatividade das infecções causadas por CRFs. No último período analisado, o subtipo C está presente em 48% das infecções, seguido do subtipo A (12%), B (11%), CRF02_AG (8%), CRF01_AE (5%), subtipo G (5%) e D (2%). Os subtipos F, H, J e K causam juntos menos de 1% das infecções no mundo (HEMELAAR *et al.*, 2011).

No Brasil, os subtipos de HIV-1 que apresentam maior prevalência são os subtipos B, seguido dos subtipos F e C (BONGERTZ *et al.*, 2000; MORGADO, GUIMARÃES, GALVÃO-CASTRO, 2002). A Figura 2 apresenta a distribuição destes subtipos de acordo com as diferentes regiões geográficas no país. A prevalência do subtipo B é observada em todas as regiões, exceto na região Sul do Brasil, onde o número de infecções causadas pelo subtipo C já ultrapassou o subtipo B (SOARES *et al.*, 2005, BRIGIDO *et al.*, 2007; RODRIGUES *et al.*, 2010).

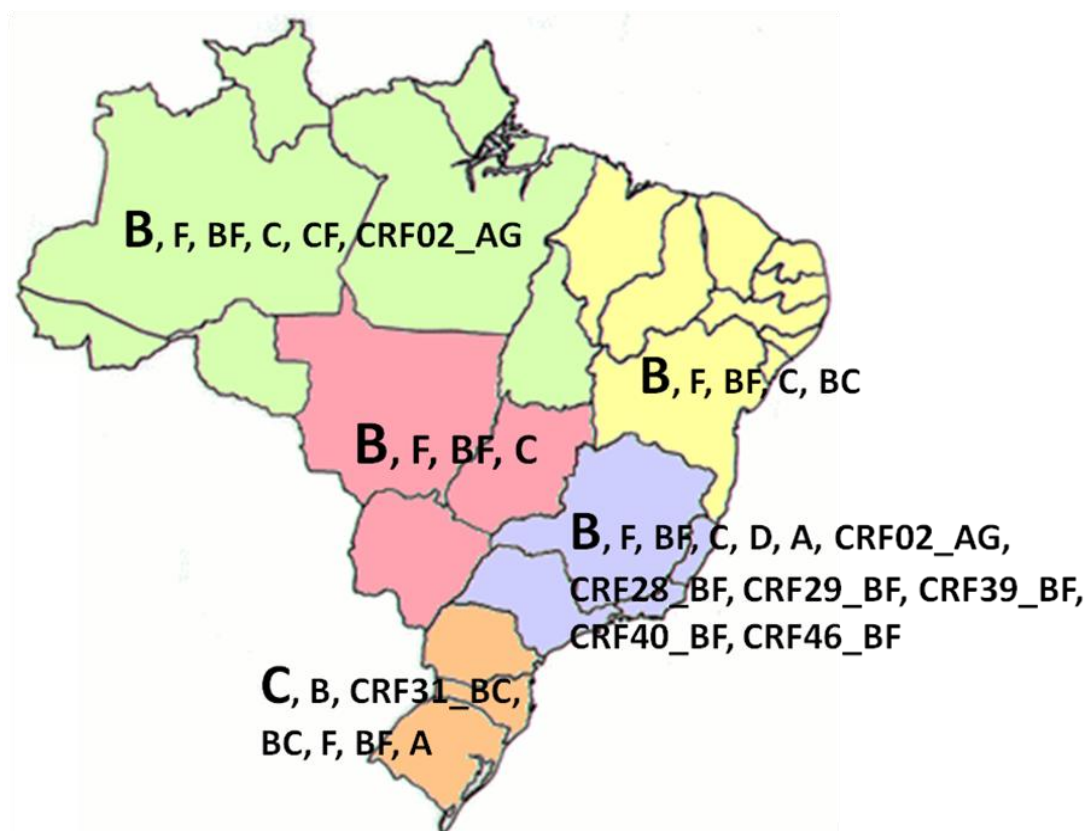


Figura 2: Distribuição dos subtipos de HIV-1 no Brasil. O subtipo prevalente em cada região está representado pela letra de tamanho maior. Fonte: MORGADO, GUIMARÃES, GALVÃO-CASTRO, 2002; atualizado em 2011.

Por ter sido o epicentro da epidemia de AIDS no Brasil no início da década de 80, a região Sudeste do país apresenta o maior número de casos acumulados e a maior diversidade genética do HIV, incluindo a ocorrência de cinco CRFs_BF, sendo três no estado de São Paulo e duas no estado do Rio de Janeiro (DE SA FILHO *et al.*, 2006; GUIMARÃES *et al.*, 2008; SANABANI *et al.*, 2010), além de uma quantidade incontável de URFs. Além disso, a presença dos subtipos A (CARIDE *et al.*, 2000), D (JANINI *et al.*, 1996; MORGADO *et al.*, 1998) e da CRF02_AG (COUTO-FERNANDEZ *et al.*, 2005) já foi demonstrada nesta região.

Com exceção do estado do Paraná, que faz fronteira com as regiões Sudeste e Centro-Oeste, a região Sul do Brasil apresenta um perfil distinto com relação à distribuição dos subtipos de HIV-1. Nos estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul vem sendo descrita uma alta prevalência do subtipo C do HIV-1, seguido do subtipo B, formas recombinantes BC e um número menor de infecções causadas pelo subtipo F e outros recombinantes (SOARES *et al.*, 2003; SOARES *et al.*, 2005,

BRIGIDO *et al.*, 2007; SILVA *et al.*, 2010, RODRIGUES *et al.*, 2010; GRAF *et al.*, 2011). A CRF31_BC tem importância epidemiológica na cidade de Porto Alegre, correspondendo a aproximadamente 10-25% das infecções nesta região (SANTOS *et al.*, 2006; SANTOS *et al.*, 2007). A complexidade da epidemia na região Sul do Brasil vem sendo demonstrada através da descrição cada vez maior de formas recombinantes, além da expansão da CRF31_BC e das formas únicas para outros estados (SANTOS *et al.*, 2006; BRIGIDO *et al.*, 2007; PASSAES *et al.*, 2009a; PASSAES *et al.*, 2009b; GRAF *et al.*, 2011). Nota-se que as maiores taxas de incidência estão nas capitais e em algumas das principais cidades da região Sul do Brasil (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO, 2006). Dados recentes vêm demonstrando uma associação entre o subtipo C, recombinantes BC e a transmissão heterossexual, assim como o subtipo B parece estar mais relacionado com o grupo de homens que fazem sexo com homens (GRAF *et al.*, 2011; ALMEIDA *et al.*, submetido à publicação).

As demais regiões do Brasil possuem um padrão de distribuição dos subtipos que se assemelha ao da região Sudeste, com predominância dos subtipos B, F e seus recombinantes. Contudo, nos últimos anos o subtipo C vem sendo identificado nestas regiões, indicando uma disseminação deste subtipo para outras regiões do país, além da observação de outras variantes menos freqüentes, como o subtipo D e a CRF02_AG (VICENTE *et al.*, 2000; MACHADO *et al.*, 2009; CARDOSO *et al.*, 2010; BRIGIDO *et al.*, 2011; FERREIRA *et al.*, 2011).

Estima-se que o subtipo B do HIV-1 tenha sido introduzido no país do fim dos anos 60 ao início dos anos 70, aproximadamente uma década antes da notificação do primeiro caso de AIDS no Brasil (1982). Este achado é consistente com o tempo médio de latência clínica da infecção pelo HIV. A introdução do subtipo F no Brasil é estimada no início dos anos 80, dado que é consistente com a menor prevalência e variabilidade genética deste subtipo no país. A identificação de casos de infecção pelo subtipo F no início dos anos 90 e a posterior detecção de recombinantes B/F da metade dos anos 80, é consistente com uma introdução mais tardia deste subtipo (BELLO, GUIMARÃES, MORGADO, 2006). A introdução do subtipo C no Sul do Brasil teve origem a partir da introdução de uma única linhagem fundadora no início da década de 1980, que posteriormente recombinou com o subtipo B dando origem ao recombinante local CRF31_BC por volta de 1985-1990 (BELLO *et al.*, 2008; FONTELLA *et al.*, 2008; BELLO *et al.*, 2009).

Os dados de epidemiologia molecular do HIV-1 no Brasil refletem uma epidemia com elevado nível de variabilidade genética, o que pode ter implicações na eficácia da terapia antirretroviral, na patogênese da infecção, na transmissão, testes diagnósticos, e no possível desenvolvimento de uma vacina.

1.2.2) A partícula viral e organização genômica do HIV

A partícula viral é esférica, medindo aproximadamente 90-120nm de diâmetro. As partículas consistem de um envelope que tem origem da membrana plasmática celular, no qual estão inseridas as glicoproteínas do vírus. O arcabouço viral é composto de uma matriz protéica ao redor do capsídeo cônico. Envolvidos pelo capsídeo estão o núcleocapsídeo, que compreende duas cópias do RNA viral; a proteína p7 (NC), codificada pelo gene *gag*; as enzimas virais codificadas pelo gene *pol*: protease, transcriptase reversa e integrase; algumas proteínas acessórias, como Vpr, Vpu e Nef, além de um tRNA^{Lys3} (RNA transportador carreador de Lisina), proveniente da célula hospedeira, o qual tem a função de atuar como iniciador da transcrição reversa em um novo ciclo infeccioso (Figura 3).

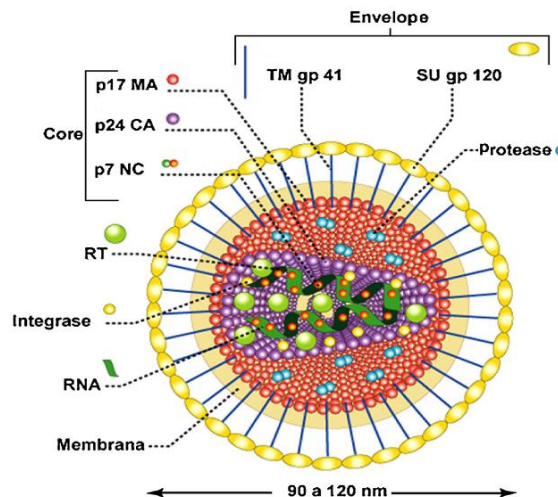


Figura 3: Estrutura da partícula viral. Fonte: ROQUEBERT *et al.*, 2009.

O genoma dos retrovírus é constituído de duas cópias de RNA fita simples de polaridade positiva e peso molecular de aproximadamente 9,5Kb. O genoma do HIV compreende nove genes, dentre os quais três são comuns a todos os retrovírus e

responsáveis por codificar proteínas estruturais e enzimáticas (*gag*, *pol* e *env*); enquanto que os demais genes são regulatórios (*tat* e *rev*) e acessórios (*vif*, *vpr*, *vpu* e *nef*). Esses genes acessórios e regulatórios estão envolvidos em fenômenos de regulação da transcrição e conseqüente expressão de proteínas virais, promovendo uma maior eficácia da replicação do HIV; além de desempenharem outras funções importantes no ciclo de replicação viral. O HIV possui um repertório genético restrito, no entanto versátil, sendo capaz de utilizar a maquinaria de replicação da célula hospedeira para completar o seu ciclo replicativo.

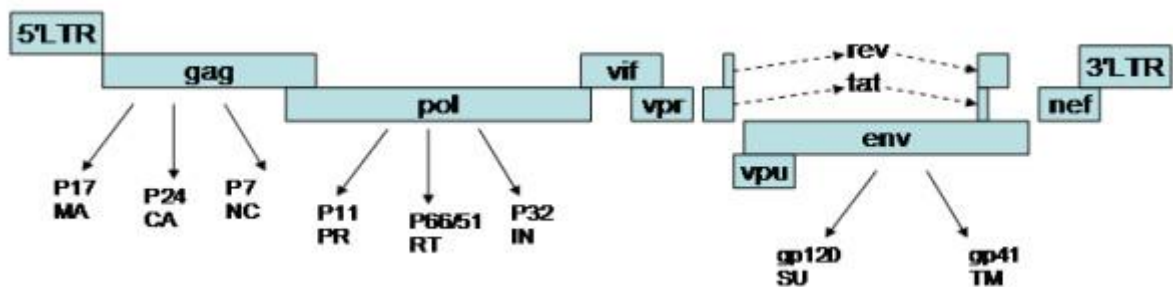


Figura 4: Estrutura genômica do HIV. Fonte: adaptado de COSTIN, 2007.

1.2.3) Ciclo de replicação do HIV

O ciclo de replicação do HIV é dividido didaticamente em eventos iniciais e tardios. Os eventos iniciais compreendem a entrada, retrotranscrição e integração. Os eventos tardios envolvem a transcrição e tradução das proteínas virais, montagem, brotamento e maturação. Essas etapas serão descritas de forma sucinta a seguir e estão representadas na Figura 5.

Os tipos celulares infectados pelo HIV são preferencialmente os linfócitos T, células dendríticas e monócitos/macrófagos, uma vez que estas células expressam o receptor celular CD4 (DALGLEISH *et al.*, 1984). O ciclo de replicação do HIV tem início com a adsorção das partículas virais na superfície destas células. A entrada do HIV é um mecanismo complexo que envolve diversas etapas. Primeiramente, a glicoproteína do envelope gp120 presente na superfície das partículas virais reconhece e se liga ao receptor CD4. Esta interação promove mudanças conformacionais em ambas as moléculas, além do recrutamento de co-receptores pertencentes à família dos receptores de quimiocinas, CXCR4 e/ou CCR5

(CLAPHAM, WEISS, 1997). Ocorre uma segunda interação entre a gp120 e o co-receptor, expondo resíduos hidrofóbicos da gp41 e desencadeando o processo de fusão das membranas viral e celular, ocorrendo a posterior liberação do capsídeo viral no citoplasma (SATTENTAU *et al.*, 1993).

Logo após a entrada, ocorre a desencapsidação parcial e inicia-se a transcrição reversa do RNA viral. Esta etapa é mediada pela transcriptase reversa e dá origem a um DNA viral de dupla fita. Esse DNA é transportado para o núcleo, onde é integrado ao DNA da célula hospedeira através da ação da enzima integrase (BOWERMAN *et al.*, 1989). Como a integrase é o alvo deste estudo, sua estrutura e o processo de integração serão detalhados no item 1.2.4.

Após a integração, o DNA viral passa a ser denominado provírus, servindo de molde para a síntese das proteínas virais pela RNA polimerase II do hospedeiro. O provírus é transcrito para gerar o RNA viral que será utilizado como material genético para as novas partículas, além de transcritos processados que serão traduzidos no citoplasma. Os processos de transcrição e tradução são realizados pela maquinaria da célula hospedeira e resultam na síntese de várias proteínas estruturais: a) o precursor Gag, que compreende MA, CA, NC, p6 e dois peptídeos espaçadores p1 e p2; b) o precursor Gag-Pol que dá origem às enzimas virais PR, RT e IN, e Gag; c) o precursor Env gp160, que é clivado nas subunidades gp120 e gp41 por uma protease celular durante o tráfego através do Complexo de Golgi. Esses componentes protéicos são encaminhados para o sítio de montagem na membrana plasmática juntamente com o RNA genômico para que as novas partículas virais sejam geradas. Durante a montagem, são incorporadas não só as proteínas virais e seu RNA genômico, mas também diversas proteínas celulares (revisto por FRANKEL, YOUNG, 1998; revisto por FREED, 2001).

As últimas etapas do ciclo replicativo do HIV envolvem o brotamento através da membrana plasmática e a concomitante maturação da partícula viral, através da clivagem dos precursores Gag e Gag-Pol pela enzima PR, produzindo assim, partículas virais maduras prontas para iniciar um novo *round* de replicação (revisto por NISOLE, SAIB; 2004).

Além das proteínas estruturais mencionadas anteriormente, o HIV também codifica duas proteínas regulatórias – Tat e Rev – e quatro proteínas acessórias – Vif, Vpr, Vpu, e Nef, as quais possuem um importante papel no ciclo de replicação viral a fim de garantir o sucesso da infecção. Tat é um trans-ativador da transcrição e

atua ligando-se à região TAR (*transactivation response region*) na região 5' LTR dos RNAs nascentes recrutando proteínas celulares responsáveis pela fosforilação da RNA polimerase II, favorecendo assim a transcrição de novos RNAs. Rev promove a exportação de RNAs não processados do núcleo para o citoplasma da célula através da ligação na região RRE (*Rev responsive element*) presente no RNA viral. Vif favorece a infectividade viral, principalmente antagonizando a atividade antiviral das proteínas APOBEC. Vpr induz a parada do ciclo celular, estimula a transcrição a partir de promotores celulares, influencia a apoptose mediada por vírus e auxilia na importação nuclear do complexo de pré-integração (PIC). Vpu estimula a liberação das partículas e induz a degradação de CD4. Nef desempenha diversos papéis que são altamente importantes para a patogênese e progressão da doença, dentre os quais regula negativamente a expressão de CD4 e MHC-I na superfície celular, modula vias de ativação celular e favorece a infectividade (revisto por FRANKEL, YOUNG, 1998; revisto por FREED, 2001).

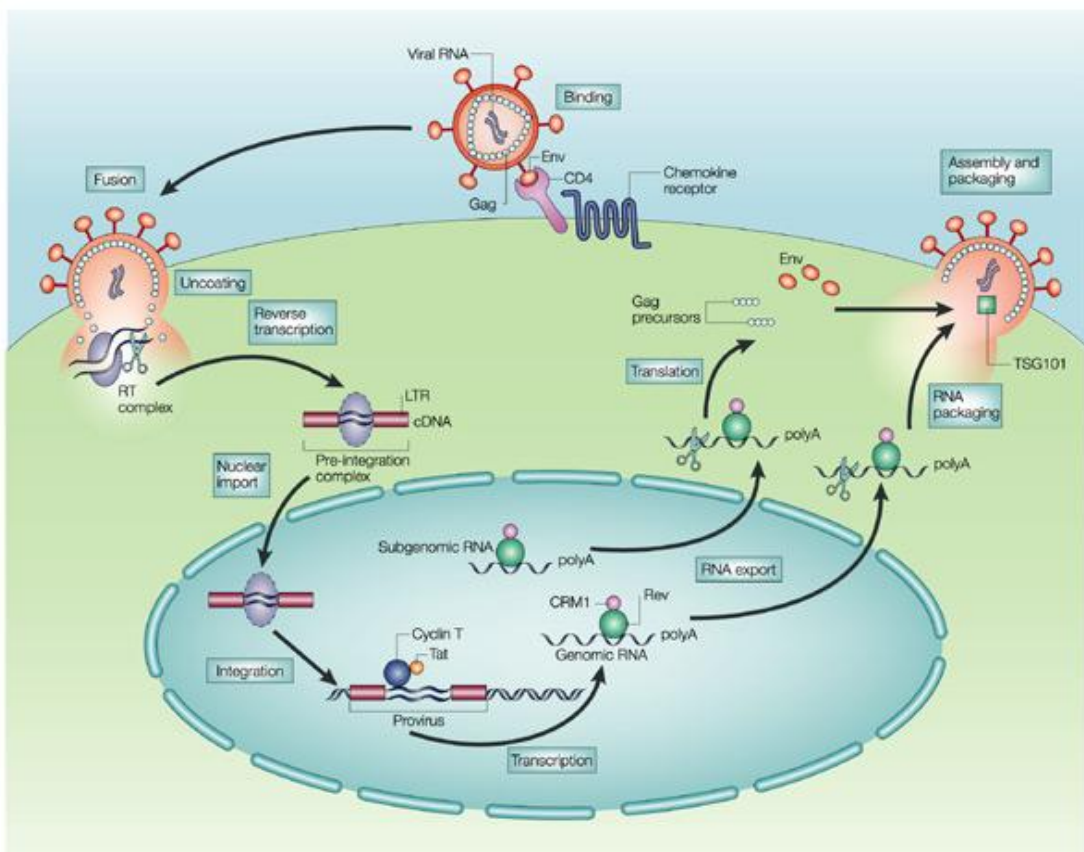


Figura 5: Esquema representativo do ciclo de replicação do HIV. Fonte: STEVENSON, 2003.

Se por um lado o HIV possui diversos mecanismos que promovem uma maior infectividade viral, recrutando proteínas celulares para participar de seu ciclo de replicação, por outro lado há uma resposta inata ao nível celular a fim de limitar a replicação viral através de diversos mecanismos, dentre estes estão os chamados “fatores de restrição”. Diversos fatores de restrição vêm sendo identificados e estão envolvidos em mecanismos de defesa contra a infecção pelo HIV-1. Dentre estes, os que estão mais bem caracterizados são aqueles pertencentes às famílias das proteínas APOBEC e TRIM. Na ausência de Vif, APOBEC3G, a mais bem estudada proteína desta família, é incorporada aos vírions, onde ela promove a deaminação de deoxicitidinas, formando deoxiuridinas na fita de cDNA, durante a retrotranscrição. Este mecanismo promove a destruição do material genético do vírus através da hipermutação dos nucleotídeos G>A durante a síntese da segunda fita do DNA viral, e/ou tornando o cDNA viral alvo de uracil DNA glicosilases, no interior da célula hospedeira. Na presença de Vif, os níveis de APOBEC3G incorporada nos vírions são reduzidos, e esta proteína é degradada no proteossoma celular através de uma via dependente de ubiquitinação (revisto por AGUIAR, PETERLIN, 2008). Outras proteínas da família das citidinas deaminases foram descritas por promover o bloqueio da replicação do HIV-1, sendo APOBEC3F (ZHENG *et al.*, 2004), APOBEC3B (DOEHLE, SCHAFER, CULLEN, 2005), APOBEC3DE (DANG *et al.*, 2006), APOBEC3H (HARARI *et al.*, 2009) and APOBEC3A (PENG *et al.*, 2007; BERGER *et al.*, 2011). TRIM 5 α atua contra as proteínas do capsídeo viral durante sua entrada na célula, resultando em uma desencapsidação prematura, sendo considerada uma importante barreira natural contra a transmissão de retrovírus entre diferentes espécies (revisto por BIENIASZ, 2003).

Mais recentemente outros fatores de restrição vêm sendo identificados. Dentre eles destacam-se a proteína Teterina (BST-2/CD317), que atua na fase tardia do ciclo replicativo viral, impedindo o brotamento das partículas virais. A atividade antiviral desta proteína é antagonizada pela proteína viral Vpu (revisto por DUBÉ *et al.*, 2010). Outros fatores que não são moléculas antivirais específicas, como por exemplo, a proteína CDK p21^{Cip1/Waf1} (cyclin-dependent kinase), envolvida na regulação do ciclo celular e apoptose, também podem atuar na inibição da replicação viral. Já foi demonstrado que esta proteína atua na inibição da replicação do HIV em macrófagos e células tronco hematopoiéticas após a entrada e antes da integração, porém o mecanismo exato de inibição ainda não está totalmente

esclarecido (ZHANG *et al.*, 2007; BERGAMASCHI *et al.*, 2009). Células T CD4⁺ obtidas de pacientes capazes de controlar a replicação do HIV expressam altos níveis de p21^{Cip1/Waf1} *ex vivo*, o que pode estar relacionado com o controle da replicação viral nesses indivíduos (CHEN *et al.*, 2011; SÁEZ-CIRIÓN *et al.*, 2011). SAMHD1 (do inglês *sterile alpha motif and HD domain 1*) foi recentemente identificada como um fator de restrição que atua antes da integração, provavelmente degradando ou prevenindo a acumulação de DNA viral. Esta proteína está presente em células da linhagem mielóide, naturalmente refratárias à infecção pelo HIV-1, mas não ao HIV-2 e SIVsm. Este achado está relacionado à capacidade de Vpx, presente em HIV-2 e SIVsm, em promover a degradação de SAMHD1, tornando as células permissivas à infecção (HRECKA *et al.*, 2011; LAGUETTE *et al.*, 2011; revisto por ST GELAIS, WU, 2011).

O conhecimento dos mecanismos celulares de restrição à infecção pelo HIV é de extrema importância, uma vez que novas estratégias antivirais podem ser desenvolvidas, no sentido de reforçar esses mecanismos celulares ou enfraquecer os antagonistas virais para ajudar no controle da replicação do HIV-1.

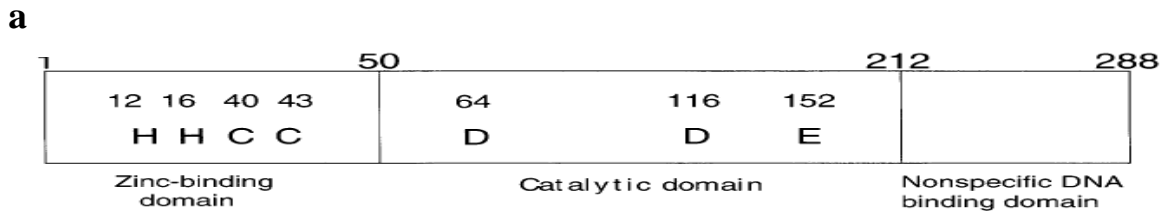
1.2.4) Integração do HIV ao genoma celular

1.2.4.1) Integrase: estrutura

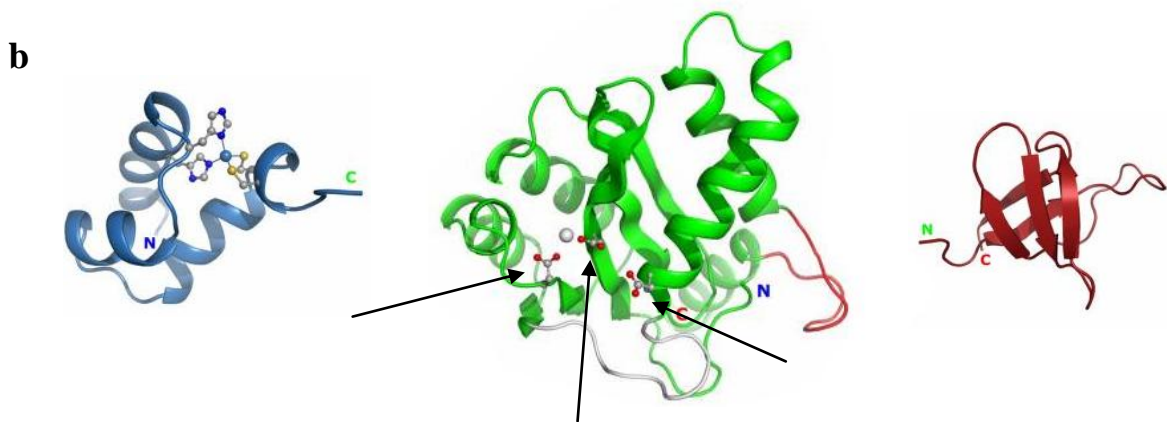
A integrase (IN) é uma enzima codificada pelo gene *pol*, sendo comum a todos os retrovírus. É uma proteína de 32 kDa do HIV-1 com 288 resíduos de aminoácidos, bastante conservada, e possui três domínios – N-terminal, catalítico e C-terminal – sendo os domínios N-terminal e catalítico característicos pela presença de sequências específicas de aminoácidos que são essenciais para a atividade da integrase e consequente capacidade de replicação viral.

Até o presente momento, ainda não foi possível a obtenção da estrutura cristalográfica da integrase por completo, apenas a estrutura dos domínios da integrase separadamente foi determinada. Essas estruturas estão representadas na Figura 6 e serão descritas a seguir.

O domínio N-terminal da integrase compreende os aminoácidos 1-49, seguido do domínio catalítico (corresponde aos resíduos 50-212), e por fim, o domínio C-terminal compreende os aminoácidos 213-288 (revisto por JASKOLSKI *et al.*, 2009).



J Virol. 2000; 74(10): 4795-4806.



FEBS J. 2009; 276(11):2926-2946.

Figura 6: Esquema representativo **(a)** e estrutura tridimensional da integrase **(b)**, evidenciando os domínios N-terminal, Catalítico e C-terminal, bem como seus motivos conservados. Fonte: adaptado de TSURUTANI *et al.*, 2000; JASKOLSKI *et al.*, 2009.

O domínio N-terminal contém o motivo conservado contendo um par de His e Cys (H₁₂, H₁₆, C₄₀ e C₄₃), altamente conservado entre integrases de diferentes retrovírus. Este domínio é também ligante de zinco (Zn⁺²). Mutações em qualquer um dos aminoácidos conservados afeta as reações de processamento da extremidade 3' e transferência ao genoma hospedeiro. O Zn⁺² promove a multimerização da integrase e permite sua atividade catalítica (ZHENG, JENKINS, CRAIGIE, 1996; LEE, 1997; revisto por JASKOLSKI *et al.*, 2009).

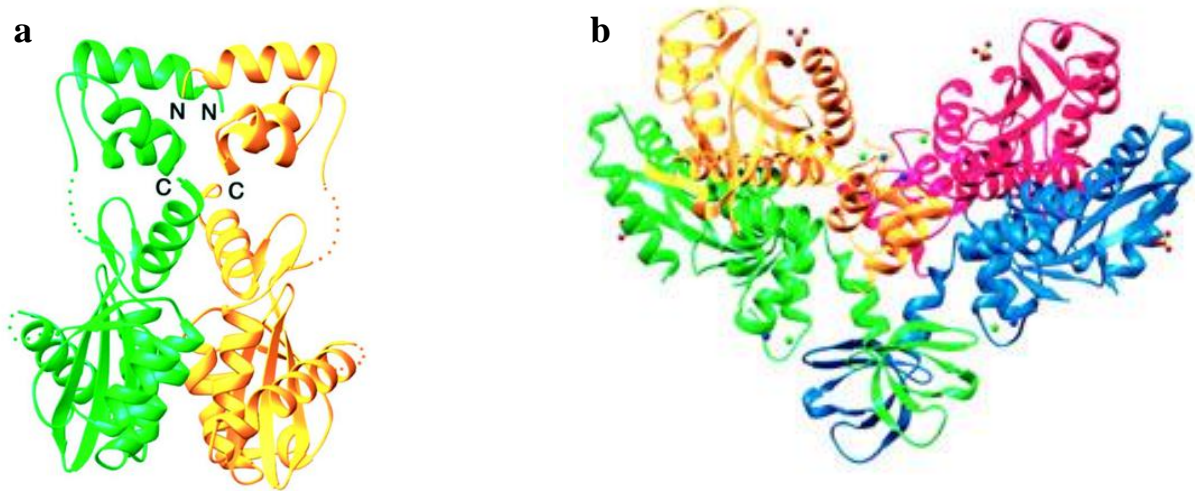
O domínio central ou catalítico da integrase contém o motivo conservado DDE, que corresponde aos aminoácidos ácidos Asp₆₄, Asp₁₁₆ e Glu₁₅₂, característico de enzimas da superfamília das polinucleotidil transferases (Figura 6). Estudos de

mutagênese sítio dirigida demonstram que esses resíduos estão envolvidos com a atividade catalítica da integrase; uma substituição em qualquer um desses três resíduos abole a atividade da enzima ou diminui significativamente a sua atividade. Esses três aminoácidos definem a posição do sítio ativo da enzima, sendo chamados de “a tríade catalítica”, como ilustrado na Figura 6. Os aminoácidos Asp⁶⁴ e Asp¹¹⁶ determinam o posicionamento dos cátions metálicos Mg⁺⁺ ou Mn⁺⁺ que são essenciais para a função da integrase (ENGELMAN, CRAIGIE, 1992; VAN GENT *et al.*, 1993; DRELICH, WILHELM, MOUS, 1992; revisto por CHIU, DAVIES, 2004; revisto por JASKOLSKI *et al.*, 2009).

O domínio C-terminal é o domínio menos conservado entre integrases de diferentes retrovírus, não apresentando nenhum motivo conservado. Liga-se de forma inespecífica ao DNA da célula hospedeira, e a deleção de apenas um aminoácido neste domínio é capaz de abolir as atividades de processamento da extremidade 3' e transferência ao genoma hospedeiro (BUSHMAN *et al.*, 1993; VINK *et al.*, 1993; ENGELMAN *et al.*, 1993; VAN GENT *et al.*, 1993; revisto por CHIU, DAVIES, 2004) (Figura 6). Recentemente, foi identificado que o domínio C-terminal da IN liga-se à proteína celular Ku70, protegendo assim a integrase da degradação pelo sistema ubiquitina-proteassoma (ZHENG *et al.*, 2011). Dados recentes confirmam a importância do domínio C-terminal da IN no processamento do precursor Gag-Pol, transcrição reversa, integração e multimerização da IN (MOHAMMED, TOPPER, MUESING, 2011).

Uma vez que a integrase precisa se multimerizar para desempenhar a sua atividade catalítica, esta encontra-se como uma mistura equilibrada de monômeros, dímeros e tetrâmeros, na ausência de DNA. Foi proposto um modelo para a formação do complexo ativo IN-DNA: a) um monômero da enzima se liga a cada extremidade dos LTRs; b) dimerização da integrase, e posteriormente, a primeira etapa da reação de integração é realizada; c) Ambos os dímeros associados aos dois LTRs interagem, formando um tetrâmero pronto para desempenhar a segunda etapa da reação de integração. Outra evidência de que a forma ativa da enzima depende da sua multimerização é que a proteína celular LEDGF/p75 (*lens-epithelium-derived growth factor*), importante para o processo de integração, só interage com a forma dimérica da integrase, pois só após a interação entre dois domínios catalíticos é que a região para interação com LEDGF/p75 é formada (WANG *et al.*, 2001; CHEREPANOV *et al.*, 2003; FAURE *et al.*, 2005; LI *et al.*, 2006;

HARE *et al.*, 2009). A estrutura tridimensional das formas diméricas e tetraméricas da integrase encontra-se na Figura 7.



The EMBO Journal (2001) 20, 7333 - 7343

Figura 7: Estrutura tridimensional da integrase do HIV-1 (resíduos 1-212) na forma dimérica **(a)** e tetramérica **(b)**. Cada cor representa um monômero da enzima. Fonte: adaptado de WANG *et al.*, 2001.

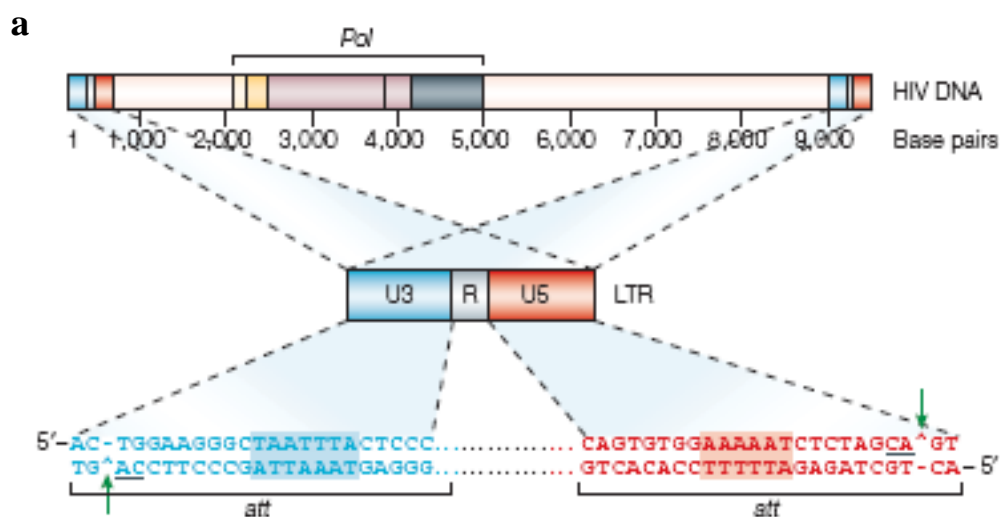
1.2.4.2) O processo de integração

A principal função da integrase é catalisar a inserção do DNA viral no genoma da célula hospedeira. Este é um processo complexo e que envolve diversas etapas e será descrito em detalhes nessa seção.

Após a entrada do vírus na célula hospedeira, o DNA viral contendo longas terminações repetidas (LTRs) em suas extremidades é sintetizado pela transcriptase reversa a partir do RNA genômico. A transcrição reversa ocorre no complexo de transcrição reversa (RTC, do inglês *reverse transcription complex*), um complexo nucleoprotéico que é derivado do capsídeo da partícula viral. O RTC é formado pela proteína de matriz (MA), a proteína acessória Vpr, juntamente com a integrase e a transcriptase reversa (BUKRINSKAYA *et al.*, 1998; IORDANSKIY *et al.*, 2006). O DNA viral recém sintetizado permanece associado às proteínas virais e celulares, formando um grande complexo nucleoprotéico chamado de complexo de pré-integração (PIC, do inglês *pre-integration complex*). O PIC é formado pelas proteínas

virais IN, MA, RT, Vpr e nucleocapsídeo, além de várias proteínas celulares, incluindo BAF (*barrier-to-autointegration factor*), HMGs (*high-mobility group proteins*), Ku, e LEDGF/p75. Todas essas proteínas desempenham um papel importante na integração (FARNET, HASELTINE, 1990; FARNET, HASELTINE, 1991; BUKRINSKY *et al.*, 1993; GALLAY *et al.*, 1995; KARAGEORGOS, LI, BURRELL, 1995; FARNET, BUSHMAN, 1997; MILLER, FARNET, BUSHMAN, 1997; LEE, CRAIGIE, 1998; LI *et al.*, 2000; LI *et al.*, 2001; LIN, ENGELMAN, 2003; LLANO *et al.*, 2004; VANDEGRAAFF *et al.*, 2006).

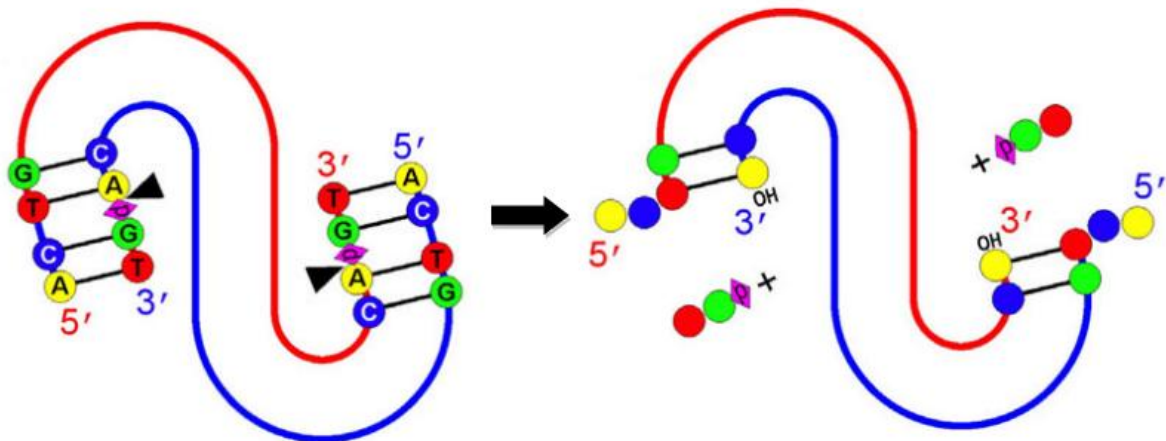
A reação de integração ocorre em duas etapas bem definidas: o processamento da extremidade 3' e a transferência de fita ao DNA da célula hospedeira. A primeira etapa do processo ocorre no citoplasma da célula hospedeira. Nesta etapa, a integrase reconhece sequências conservadas nas extremidades LTR do genoma viral (*att sites*) e então catalisa um ataque nucleofílico em ligações fosfodiéster específicas, ocasionando a remoção de dois nucleotídeos GT nestas sequências conservadas, resultando na exposição de nucleotídeos CA e grupos hidroxila que irão clivar o DNA alvo na próxima etapa da reação de integração, conforme ilustrado na Figura 8 (ENGELMAN *et al.*, 1991; LAFEMINA *et al.*, 1992; SAKAI *et al.*, 1993; revisto por CHIU, DAVIES, 2004; revisto por POMMIER, JOHNSON, MARCHAND, 2005).



Nat Rev Drug Discov. 2005; 4(3): 236-248

Figura 8: Representação esquemática da etapa de processamento 3' da reação de integração. (a) sequências conservadas *att* localizadas nas extremidades U3 e U5 dos LTRs que são reconhecidas pela integrase durante a primeira etapa do processo de integração. Fonte: POMMIER, JOHNSON, MARCHAND, 2005;

b

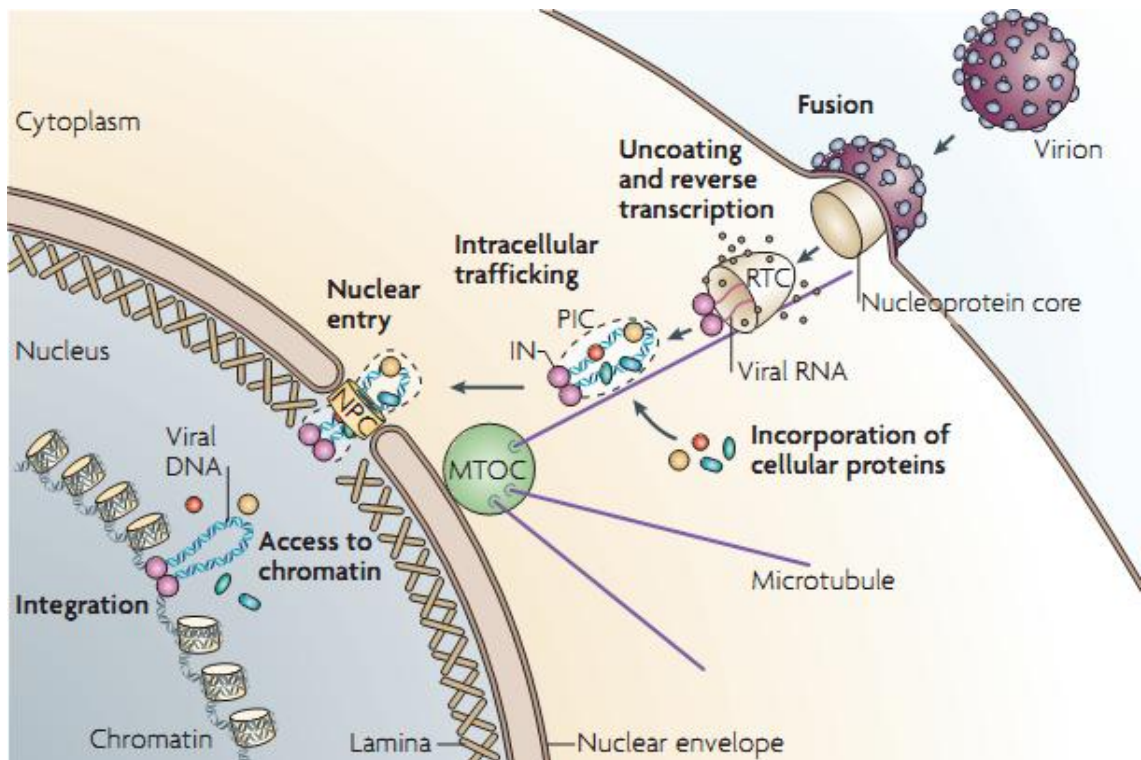


FEBS J. 2009; 276(11):2926-2946.

Figura 8: Representação esquemática da etapa de processamento 3' da reação de integração.

(b) o procesamento das extremidades 3': excisão de dois nucleotídeos conservados GT, gerando duas extremidades 3'OH livres. Fonte: JASKOLSKI *et al.*, 2009.

Como a próxima etapa da reação de integração ocorre no núcleo da célula hospedeira, o PIC tem que atravessar a membrana nuclear. A locomoção através do citoplasma celular se dá através de interações com filamentos de actina e com as proteínas cinesina e dineína, permitindo que o RTC e o PIC se movam em direção ao núcleo através da rede de microtúbulos, conforme ilustrado na Figura 9 (BUKRINSKAYA *et al.*, 1998; LIU *et al.*, 1999; WILK, GOWEN, FULLER, 1999; PETIT *et al.*, 2003; ARHEL *et al.*, 2006; revisto por SUZUKI, CRAIGIE, 2007).



Nat Rev Microbiol. 2007; 5(3): 187-196

Figura 9: Representação esquemática das etapas envolvidas desde a entrada do HIV na célula hospedeira até a integração do DNA viral. Após a entrada na célula, o capsídeo viral contendo o RNA genômico do HIV é liberado no citoplasma. A desenvelopagem permite a formação do complexo de retrotranscrição (RTC). O cDNA resultante associa-se a proteínas virais e celulares, formando o complexo de pré-integração (PIC). O PIC se locomove até a membrana nuclear através da rede de microtúbulos, entra no núcleo através dos poros nucleares e finalmente acessa a cromatina para integração do genoma viral. IN: integrase; MTOC: centros organizadores de microtúbulos; NPC: o complexo de poro nuclear. Fonte: SUZUKI, CRAIGIE, 2007.

Na infecção pelo HIV-1, o PIC passa através do poro nuclear por um mecanismo ativo, uma vez que este complexo é grande demais para entrar no núcleo por difusão. Várias proteínas que compõem o PIC, dentre as quais MA, Vpr, IN, a região cPPT e LEDGF/p75 possuem sinais de localização nuclear, facilitando o transporte para o núcleo através do poro. IN, MA e Vpr interagem com importinas e nucleoporinas, mediando assim a passagem através do poro nuclear (POPOV *et al.*, 1998; HAFFAR *et al.*, 2000; SIRVEN *et al.*, 2000; DEPIENNE *et al.*, 2001; DEVROE, ENGELMAN, SILVER, 2003; MAERTENS *et al.*, 2003; MAERTENS *et al.*, 2004).

Uma vez no núcleo da célula, o DNA viral é integrado ao genoma hospedeiro. Antes de ocorrer a integração, o DNA viral precisa interagir de forma estável com o DNA cromossômico. A proteína LEDGF/p75 possui o papel de ancorar o PIC ao

cromossomo hospedeiro e estabilizar a interação, para que ocorra a segunda etapa da reação de integração. Além disso, esta proteína desempenha outras funções importantes na integração do HIV, como por exemplo, influencia na seleção do sítio de integração, favorecendo a integração em genes ativos, o que permite uma alta taxa de transcrição dos genes do HIV, promovendo a produção de novas partículas virais e conseqüentemente, o sucesso da infecção (SCHRODER *et al.*, 2002)

Uma vez que o PIC está ancorado ao cromossomo hospedeiro, a integrase pode realizar a segunda etapa da reação de integração, que consiste na clivagem do cromossomo hospedeiro e ligação das extremidades 3'-OH do genoma viral, geradas durante a primeira etapa da reação (Figura 10). Para finalizar a reação de integração, proteínas de reparo da célula hospedeira são recrutadas para removerem os nucleotídeos restantes e preenchem as lacunas geradas durante a transferência de fitas ao genoma hospedeiro (YODER, BUSHMAN, 2000). Assim como ocorre na infecção por outros retrovírus, na infecção pelo HIV observamos que ocorre uma duplicação na sequência que flanqueia o provírus no genoma hospedeiro. Essa região duplicada corresponde a apenas 5pb, no caso da infecção pelo HIV e é uma característica marcante do sítio de integração viral (VINCENT *et al.*, 1990; VINK *et al.*, 1990). Uma vez integrado, o DNA viral usa a maquinaria da célula para transcrever seu genoma e expressar suas proteínas (revisto por CIUFFI, BUSHMAN, 2006).

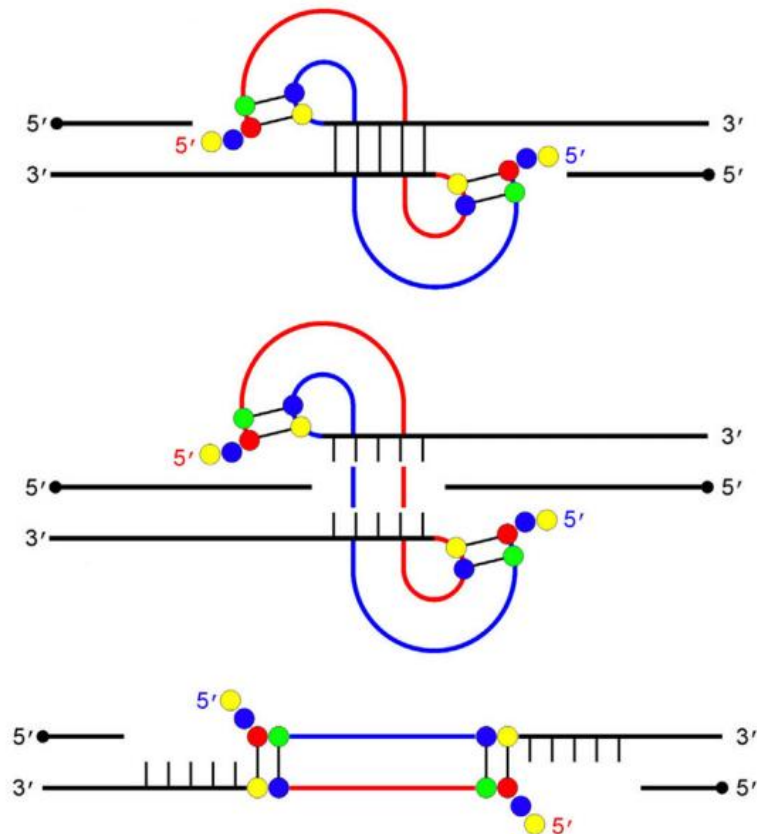


Figura 10: Representação esquemática da etapa de transferência de fitas da reação de integração. Primeiramente, o DNA celular é clivado e através de uma reação de transesterificação, as extremidades 3'OH livres do cDNA viral se ligam ao DNA celular. Enzimas de reparo da célula hospedeira removem os dinucleotídeos excedentes na extremidade 5' do genoma viral e sintetizam nucleotídeos em ambos os lados do cDNA viral integrado. O cDNA viral integrado é flanqueado por uma sequência repetida de cinco nucleotídeos e começa com a sequência conservada TG em cada extremidade 5'. Fonte: JASKOLSKI *et al.*, 2009.

Além do DNA viral em sua forma linear que serve como substrato para a reação de integração, existem também formas circulares de DNA não integrado que são encontradas exclusivamente no núcleo da célula. Há evidências de que estas formas não integradas sejam transcritas e traduzidas antes que ocorra a integração, expressando genes virais importantes para o estabelecimento de uma infecção produtiva. As formas circulares contendo uma cópia de LTR são geradas por recombinação homóloga do DNA linear e as formas contendo duas cópias de LTR são geradas pela atuação da maquinaria de reparo por ligação das extremidades não-homólogas (NHEJ, do inglês *non-homologous end joining*) como uma resposta protetora à presença de DNA dupla fita no núcleo da célula hospedeira (revisado por

SLOAN, WAINBERG, 2011). Apesar dessas formas circulares não serem integradas, elas são marcadores importantes da entrada do PIC no núcleo, uma vez que para serem formadas dependem de enzimas presentes apenas no núcleo da célula. Além disso, a forma 2-LTR pode ser facilmente detectada pela técnica de PCR, devido à característica única da junção LTR-LTR. Uma vez que essas formas são lábeis, a detecção de DNA circular é um importante marcador de replicação ativa (SHARKEY *et al.*, 2000; SHARKEY, STEVENSON, 2001; SHARKEY *et al.*, 2005; revisto por SLOAN, WAINBERG, 2011).

A integrase não se limita a desempenhar apenas a reação de integração, etapa imprescindível para a replicação de retrovírus, mas também desempenha importantes funções na transcrição reversa, processamento, montagem e maturação viral (SHIN *et al.*, 1994; BUKOVSKY, GOTTLINGER, 1996; QUILLEN *et al.*, 1996; WU *et al.*, 1999; HEHL *et al.*, 2004; ZHU *et al.*, 2004). Devido à função pleiotrópica da integrase e à sua importância no ciclo de replicação viral, esta enzima é um alvo importante para o estudo da patogênese da infecção pelo HIV e um alvo atrativo para a terapia antirretroviral.

1.2.4.3) Integração e patogênese da infecção

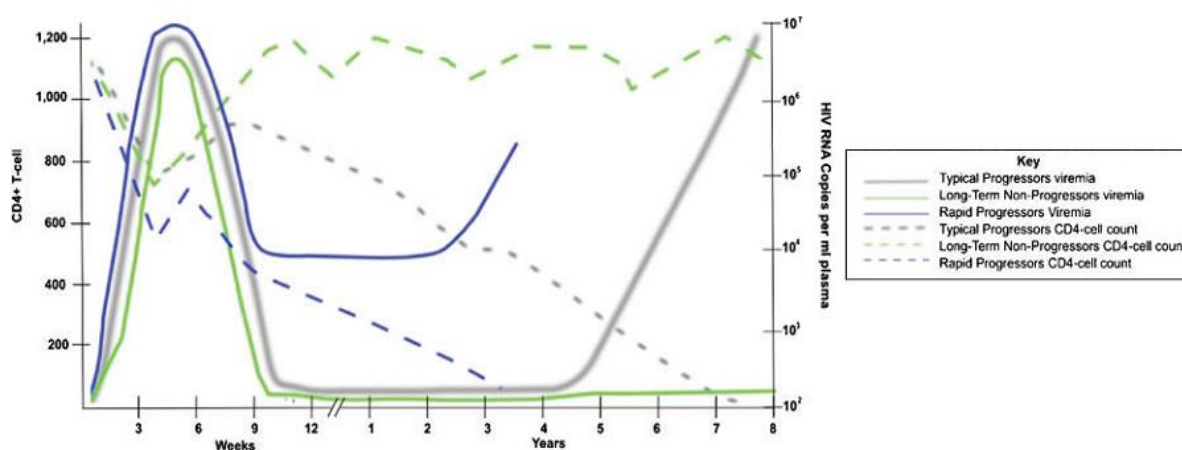
O curso clínico da infecção pelo HIV caracteriza-se por uma fase aguda, seguida de um longo período de latência clínica e da fase de AIDS propriamente dita. Durante a fase aguda da infecção, que corresponde a aproximadamente duas a quatro semanas após a transmissão do vírus, a maioria dos indivíduos infectados apresenta um quadro clínico denominado *mononucleose-like*, com sintomas característicos de uma infecção viral, devido a uma massiva replicação do HIV, que atinge altos níveis de viremia. O pico de replicação ocorre aproximadamente entre três a quatro semanas após a infecção e, após este período, a carga viral plasmática declina até atingir o *set point*, controlada pelo desenvolvimento de uma resposta imune. A fase aguda é marcada por uma depleção importante das células T CD4+ (revisto por MOIR, CHUN, FAUCI, 2011).

Após a fase aguda, a infecção pelo HIV entra em um longo período assintomático de latência clínica, contudo, essa fase não se caracteriza por uma latência virológica. O rápido estabelecimento e persistência de reservatórios virais é

o principal impedimento para a erradicação do HIV em indivíduos infectados. Tecidos linfóides e células T CD4+ quiescentes são a principal fonte de replicação persistente e são responsáveis pela lenta e gradativa depleção de células T CD4+ ao longo do curso clínico da infecção (revisto por MOIR, CHUN, FAUCI, 2011).

Durante os estágios mais avançados da infecção o sistema imune perde a capacidade de se restabelecer, comprometendo ainda mais a já debilitada resposta imune contra o HIV. Neste momento, ocorre acentuada linfopenia de células T CD4+ e um aumento expressivo da replicação viral, ocorrendo infecções oportunistas que caracterizam a fase de AIDS (revisto por MOIR, CHUN, FAUCI, 2011).

A duração do período assintomático da infecção pelo HIV é variável, conseqüentemente, perfis de progressão distintos podem ser observados entre os indivíduos infectados (Figura 11). Os indivíduos denominados progressores típicos progridem para a AIDS em seis a dez anos e a maioria dos pacientes portadores do HIV (70-80%) apresentam este perfil de progressão. Há uma porcentagem significativa dos pacientes (10-15%) que evolui para a AIDS em um espaço de tempo mais curto, que varia de dois a cinco anos, e são chamados progressores rápidos. Além destes, aproximadamente 5% dos indivíduos infectados permanecem clinicamente assintomáticos e com altos valores de células T CD4+ (>500 células/ml) durante mais de dez anos de infecção, sendo denominados progressores lentos ou não progressores de longo termo (LTNPs) (PANTALEO, FAUCI, 1996; LEVY, 2009).



J Gen Virol. 2011; 92(Pt 2):247-68.

Figura 11: Progressão da doença em pacientes HIV-1 positivos progressores típicos, rápidos e LTNPs, de acordo com as contagens de células T CD4+ e carga viral. Fonte: POROPATICH, SULLIVAN, 2011.

Quando os testes para quantificação da carga viral foram disponibilizados em meados dos anos 90, foi verificado que a maioria dos LTNPs apresentava valores de carga viral baixos a moderados. O monitoramento da viremia nestes pacientes mostrou que, enquanto alguns apresentavam aumento progressivo da carga viral e declínio das contagens de células T CD4+, outros eram capazes de manter a viremia abaixo do limite de detecção (<50 cópias HIV-RNA/mL) (revisado por DEEKS, WALKER, 2007).

Desta forma, um pequeno grupo de pacientes (<1%) capazes de controlar a viremia abaixo dos limites de detecção foi identificado mais recentemente, esses indivíduos são chamados controladores de elite (EC, do inglês *elite controllers*) (revisado por DEEKS, WALKER, 2007; SAKSENA *et al.*, 2007; PIACENTINI *et al.*, 2009). Há ainda aqueles pacientes que controlam a replicação viral, mas em níveis detectáveis, sendo considerados controladores virêmicos (MIKHAIL *et al.*, 2003; HUNT, 2009).

É importante esclarecer que estes sistemas de classificação dos pacientes HIV positivos são independentes. Enquanto um deles baseia-se na contagem de células T CD4+ e no tempo de infecção para definir os pacientes não progressores de longo termo, progressores típicos e rápidos, a classificação em pacientes controladores de elite, controladores virêmicos e não controladores baseia-se somente no critério carga viral. Pode haver uma interseção entre os LTNPs e os EC, conforme ilustrado na Figura 12, porém os critérios de inclusão nestes grupos são distintos (revisado por DEEKS, WALKER, 2007).

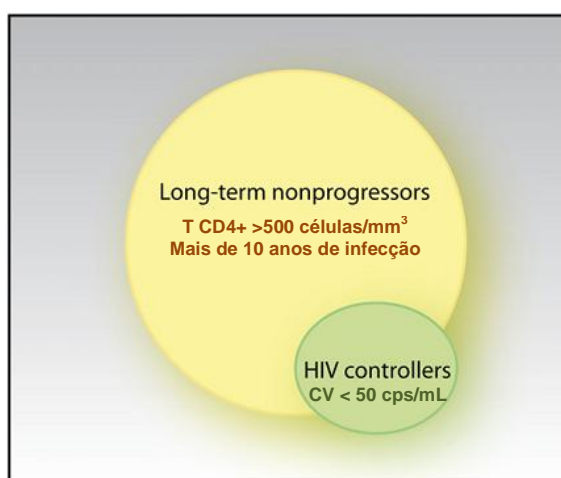


Figura 12: Distinção entre pacientes não progressores de longo termo e controladores de elite. Fonte: adaptado de DEEKS, WALKER, 2007.

O estudo dos mecanismos de controle da replicação viral nesses pacientes é de extrema importância para o entendimento da patogênese da infecção pelo HIV, permitindo o conhecimento e adoção de novas estratégias de controle da replicação. Os mecanismos de controle da infecção pelo HIV têm sido associados tanto a características inerentes ao vírus quanto a fatores relativos ao perfil genético e imunológico do hospedeiro.

Dentre os fatores relacionados ao vírus, variantes virais atenuadas, com capacidade replicativa comprometida e incapazes de escapar da resposta imune do hospedeiro, vêm sendo observadas em pacientes com o perfil de progressão lenta. O caso mais bem descrito de atenuação viral é o da coorte do Banco de Sangue de Sydney, o qual seis dentre oito pessoas infectadas com uma variante viral contendo uma grande deleção no gene *nef* desenvolveram o status de não-progressão (LEARMONT *et al.*, 1999).

Quanto ao perfil imunológico do hospedeiro, mecanismos da imunidade inata, celular e humoral estão envolvidos no controle da infecção pelo HIV. Células *natural killer* (NK) possuem atividade citotóxica e desempenham um importante papel no controle da replicação viral. Células NK de pacientes LTNP produzem altos níveis de interferon- γ , maiores do que pacientes progressores típicos e indivíduos não infectados, sugerindo ser um importante mecanismo de controle nos LTNPs. Além disso, os receptores KIR (do inglês *killer cell immunoglobulin-like receptors*) têm apresentado um papel de proteção na patogênese da doença, quando associados com determinados alelos de HLA. Células T CD4+ de pacientes LTNPs apresentam uma resposta Gag-específica policlonal e robusta; além disso, parecem induzir e manter respostas T CD8+ HIV específicas. Também há evidências de que células T CD4+ têm níveis reduzidos de ativação celular, reduzindo o número de células suscetíveis à infecção. As células T CD8+ são as principais mediadoras do controle da replicação viral nesses pacientes, apresentando respostas CTL específicas, de alta magnitude e amplitude. Além disso, anticorpos neutralizantes parecem exercer um importante papel no controle da replicação nos pacientes capazes de controlar a replicação do HIV (revisito por POROPATICH, SULLIVAN, 2011).

Quanto ao perfil genético, diversos marcadores vêm sendo associados a não progressão. Um dos genes mais bem estudados por estar associado com a proteção é a variante CCR5 $\Delta 32$, que em homozigose protege o indivíduo da infecção pelo HIV e em heterozigose promove uma progressão lenta para a doença. Além disso,

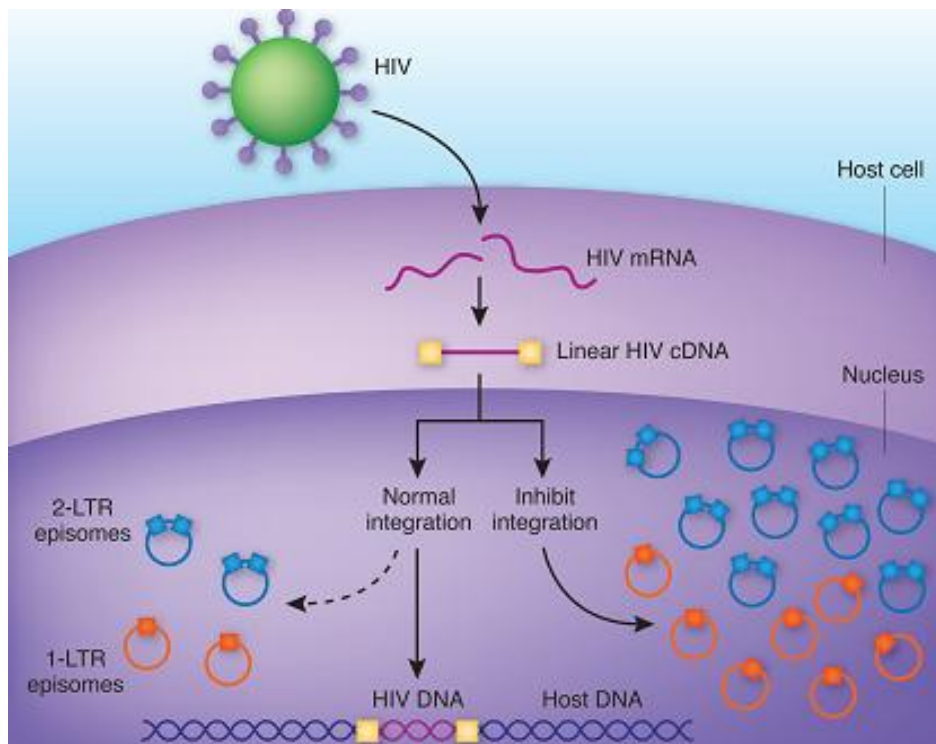
variações genéticas na região promotora e mutações não sinônimas no gene também estão relacionadas com a progressão para a doença. Outro marcador importante são os alelos de HLA classe I, que são importantes no processo de apresentação de antígeno, tendo um importante papel na patogênese da doença. Os alelos HLA-B*27 e B*57 são fortemente associados com uma progressão mais lenta para a doença. Além de polimorfismos e outras alterações genéticas, os níveis de expressão de um determinado gene também pode contribuir para o desenvolvimento da doença. Alguns estudos vêm demonstrando que altos níveis de expressão de APOBEC3G conferem um caráter protetor. Além destes marcadores, outros genes candidatos estão atualmente em estudo e o avanço das metodologias *highthroughput* certamente trará um incremento relevante neste campo de investigação (revisto por AN, WINKLER, 2010; revisto por POROPATICH, SULLIVAN, 2011).

Apesar de o estudo da patogênese do HIV ter avançado muito nos últimos anos, muitos mecanismos envolvidos no processo de integração viral ainda precisam ser esclarecidos; e, além disso, a associação dos mecanismos de patogênese da integração do HIV com os diferentes perfis de progressão da doença precisa ser mais bem estudada.

Algumas variantes atenuadas de HIV vêm sendo descritas em pacientes não progressores (DEACON *et al.*, 1995; HUANG, ZHANG, HO, 1998; CALUGI *et al.*, 2006), contudo, apenas um estudo até hoje identificou uma variante defectiva na integrase. Este estudo caracterizou sequências de *gag* e *pol* de dez pacientes LTNPs e as mutações E152A, E152P e E152K foram observadas no motivo conservado DDE no sítio catalítico da integrase para alguns pacientes (HUANG, ZHANG, HO, 1998). Outro estudo que indica que variações na integrase podem estar envolvidas no controle da replicação verificou que vírus contendo sequências de RT+IN amplificadas e clonadas a partir de 58 pacientes controladores de elite possuem uma menor capacidade replicativa *in vitro* quando comparados com vírus contendo as sequências de pacientes progressores típicos, sugerindo que as funções do gene *pol*, especificamente da RT e IN, podem estar comprometidas na condição de não-progressão (BRUMME *et al.*, 2011).

Um estudo recente quantificou DNA viral total, integrado e episomal em uma coorte de 10 pacientes controladores de elite, pacientes em HAART avirêmicos e pacientes virêmicos não tratados. Neste estudo, não foi identificada diferença nos níveis de DNA total entre os pacientes EC e HAART, porém os níveis de DNA

integrado são muito menores nos EC, sugerindo que o reservatório viral é muito menor neste grupo. Um dado curioso deste trabalho foi a detecção de altos níveis de DNA circular não integrado nos pacientes EC, níveis estes maiores do que os observados para os pacientes virêmicos. Este tipo de DNA pode ser detectado em grande quantidade quando há algum mecanismo de inibição da integração, conforme ilustrado na Figura 13. Sendo assim, os dados apresentados neste estudo sugerem fortemente que pode haver algum mecanismo de inibição da integração nestes pacientes, contudo, estes dados não foram comprovados nas análises *ex vivo* (GRAF *et al.*, 2011).



Nat Med. 2010 Apr;16(4):373-4.

Figura 13: Demonstração do acúmulo de DNA circular no núcleo da célula quando há inibição do processo de integração. No núcleo da célula, o cDNA viral é integrado ao genoma hospedeiro. Durante a integração normal, enzimas de reparo celular circularizam uma pequena proporção de cDNA viral em episômas contendo 1 ou 2 LTRs. Se a integração é bloqueada, uma maior proporção de episômas é formada. Fonte: SCHACKER, 2010.

Outros estudos recentes vêm demonstrando que células provenientes de pacientes controladores de elite possuem mecanismos intrínsecos de restrição da replicação do HIV. Esses mecanismos de restrição parecem atuar nas etapas pré-integração, o que corrobora com os achados de um reservatório viral menor nesses pacientes. Um destes estudos correlaciona a inibição da integração em células T CD4+ com uma elevada expressão da proteína p21 (CHEN *et al.*, 2011), porém os mecanismos envolvidos na inibição da integração por esta proteína ainda precisam ser esclarecidos (ZHANG, SCADDEN, CRUMPACKER, 2007; BERGAMASCHI *et al.*, 2009). Outros estudos, no entanto, descrevem que há restrição da replicação nas etapas pré-integração do ciclo replicativo do HIV em macrófagos e células T CD4+ de pacientes EC, mas não encontram evidências de que os mecanismos de restrição estejam relacionados à p21, TRIM5 α ou APOBEC3G (BUZON *et al.*, 2011; SÁEZ-CIRIÓ *et al.*, 2011).

Diversos outros mecanismos podem estar envolvidos com a inibição da integração do HIV. LEDGF/p75 desempenha um importante papel no processo de integração. Em um estudo que investigou a associação de variações genéticas (SNPs, do inglês *single nucleotide polymorphisms*) no gene PSIP1, que codifica o co-fator LEDGF, e suscetibilidade à infecção e progressão para a doença foi verificado que o SNP rs2277191 (G>A) está associado com uma maior probabilidade de infecção pelo HIV, rápida depleção e baixas contagens de células T CD4+ durante a fase crônica da infecção, enquanto que o SNP rs12339417 (T>C) está fortemente associado com uma progressão mais lenta para a doença e consequentemente com altas contagens de células T CD4+ e baixa carga viral durante a fase crônica da infecção. Este SNP também parece estar associado com menores níveis de expressão de LEDGF/p75, o que pode ter implicações para uma menor replicação viral (MADLALA *et al.*, 2011).

Uma vez que há fortes evidências de que a integrase e outros mecanismos relacionados ao processo de integração podem estar envolvidos no controle da replicação viral, a elucidação destes mecanismos é de extrema importância para o completo entendimento sobre como são formados e como pode ser prevenida a formação dos reservatórios virais.

1.2.4.4) A integrase como alvo da terapia antirretroviral

A introdução da terapia antirretroviral de alta potência (HAART, do inglês *highly active antiretroviral therapy*) melhorou significativamente a vida dos pacientes portadores do HIV, uma vez que a terapia é capaz de controlar a replicação viral, prolongando a sobrevivência e reduzindo as mortes causadas por doenças relacionadas à AIDS (PALELLA *et al.*, 1998). As classes de drogas antirretrovirais disponíveis atualmente são inibidores nucleosídicos (NRTI) e não-nucleosídicos (NNRTI) da transcriptase reversa, inibidores de protease (IP), inibidores de fusão, de integração e de entrada (revisto por CAHN, SUED, 2007).

A integrase é um alvo terapêutico interessante, uma vez que é uma enzima que desempenha uma função essencial no ciclo replicativo do HIV e não possui homólogos na célula hospedeira. Desde o início da década de 90, potenciais inibidores de integrase vêm sendo estudados, porém somente em 2007 a primeira droga capaz de inibir o processo de integração – raltegravir – foi aprovada pelo FDA para ser utilizada na terapia de resgate (FDA notifications, 2007a, 2007b) e posteriormente foi aprovado o seu uso como droga de primeira linha (FDA notifications, 2009).

O mecanismo de ação do raltegravir consiste na inibição específica da segunda etapa da reação de integração, a etapa de transferência de fita para o cromossomo hospedeiro. A molécula possui um motivo quelante de metais, assim, esta droga interage com metais divalentes no sítio ativo da integrase. O raltegravir associa-se ao complexo IN-DNA através de uma região hidrofóbica, deslocando o DNA viral, impedindo assim a transferência do DNA viral para o cromossomo hospedeiro (revisto por HAZUDA, IWAMOTO, WENNING, 2009).

O raltegravir (RAL) é uma das mais potentes e bem toleradas drogas antirretrovirais disponíveis para o tratamento de pacientes infectados pelo HIV. Os ensaios P004 e STARTMRK foram os primeiros ensaios clínicos com raltegravir em pacientes virgens de tratamento e foi comparado o efeito antirretroviral do raltegravir com efavirenz (EFV), um inibidor não-nucleosídico da RT. Nestes estudos foi demonstrado que a resposta antiviral dos regimes contendo raltegravir não eram inferiores àqueles contendo EFV. Além disso, foi observada supressão da viremia mais rápida, e o aumento de contagens de linfócitos TCD4+ no braço contendo RAL (MARKOWITZ *et al.*, 2007; LENNOX *et al.*, 2009; MARKOWITZ *et al.*, 2009).

O protocolo 005 foi o primeiro estudo conduzido em pacientes experimentados e incluiu 179 pacientes com falha virológica confirmada e resistência a pelo menos um NRTI, um NNRTI e um IP. Os pacientes receberam diferentes doses de RAL (200mg, 400mg, 600mg) ou placebo juntamente com um regime de base otimizado. A resposta virológica foi superior nos braços contendo RAL em todas as doses, além disso, houve aumento da contagem de células T CD4+ nesses grupos. Foi demonstrada segurança e tolerabilidade, e não foi observado nenhum evento relacionado com toxicidade nos braços contendo RAL (GRINSZTEJN *et al.*, 2007).

Os estudos BENCHMRK 1 e 2 foram conduzidos em diferentes regiões geográficas e avaliaram a segurança e eficácia do RAL em combinação com regime de base otimizado em comparação com o placebo em pacientes com resistência às três classes de drogas (NRTI, NNRTI e IP) e falha virológica confirmada. Um total de 699 pacientes foram randomizados para receber RAL 400mg duas vezes ao dia ou placebo. Após 48 semanas, os dados mostraram uma eficácia superior, assim como uma melhor reconstituição imunológica no grupo tratado com RAL (COOPER *et al.*, 2008; STEIGBIGEL *et al.*, 2008).

É fato que o raltegravir representa uma ótima opção terapêutica para pacientes multi-experimentados e com opções de tratamento limitadas. Neste contexto, estudos visando a troca de outros antirretrovirais pelo raltegravir e estudos de simplificação do esquema terapêutico vêm sendo conduzidos.

Os protocolos SWITCHMRK 1 e 2 investigaram a troca de um esquema contendo um IP, neste caso o lopinavir/ritonavir, pelo raltegravir. Apesar de os pacientes que tomaram RAL terem apresentado um melhor perfil lipídico, a resposta virológica foi insatisfatória, resultando na descontinuação prematura do estudo. No entanto, uma análise posterior demonstrou que os dois grupos não eram comparáveis no que diz respeito à falha terapêutica prévia, tendo influenciado negativamente os resultados observados para o grupo tratado com raltegravir (ERON *et al.*, 2010).

Com o objetivo de minimizar os efeitos colaterais e o incômodo da aplicação intradérmica da enfuvirtida (ENF), inibidor de fusão utilizado em esquemas de resgate, a segurança da troca de ENF por RAL em pacientes com supressão da carga viral vem sendo avaliada em alguns estudos, dentre os principais estão os estudos EASIER-ANRS 138 e CHEER. No protocolo EASIER, 170 pacientes

cl clinicamente estáveis em um regime contendo ENF foram randomizados. Após 48 semanas, 90% dos pacientes mantiveram a carga viral em níveis indetectáveis e as contagens de CD4+ permaneceram estáveis em ambos os grupos. No estudo CHEER, 52 pacientes tiveram o ENF substituído por RAL, resultando na manutenção dos níveis indetectáveis de carga viral para 94,2% desses pacientes após 24 semanas de tratamento. Com base nesses resultados, a segurança da troca de ENF por RAL foi demonstrada (DE CASTRO *et al.*, 2009; TOWNER *et al.*, 2009; GALLIEN *et al.*, 2011).

Outra indicação que vem sendo considerada para o raltegravir é a sua utilização na intensificação da terapia antirretroviral. Já foi descrito que, apesar da terapia antirretroviral de alta potência reduzir a carga viral plasmática a níveis indetectáveis, uma replicação viral persistente pode ser observada nos pacientes em HAART, através da utilização de métodos ultra-sensíveis de detecção da carga viral ou a quantificação de DNA episomal (SHARKEY *et al.*, 2000; GERETI *et al.*, 2008; PALMER *et al.*, 2008, SAHU *et al.*, 2010). Além disso, há aqueles pacientes que atingem níveis indetectáveis de carga viral, contudo não apresentam uma reconstituição imunológica, não apresentando nenhum ganho na contagem de células T CD4+. Em ambas as situações, a utilização de uma droga adicional ao esquema que permita uma redução ainda maior da carga viral, impedindo a replicação persistente e que promova um ganho no número de células CD4+ pode ser importante para garantir os benefícios da terapia antirretroviral. Um estudo importante neste contexto foi o estudo desenvolvido por Buzón e colaboradores (2010). Neste estudo é demonstrado que a intensificação da terapia com RAL promove o aumento do número de DNA circular, sugerindo que, apesar da replicação persistente, a intensificação do esquema terapêutico com RAL previne a integração e conseqüentemente bloqueia a infecção de novas células. Outro resultado importante é que os níveis de ativação celular nesses pacientes são reduzidos. Em conjunto, estes dados sugerem que a intensificação da terapia com o raltegravir pode interferir nos reservatórios virais, trazendo benefícios adicionais aos pacientes e a esperança de estratégias terapêuticas que possam auxiliar na erradicação viral (BUZON *et al.*, 2010).

A Tabela 1 sumariza os resultados obtidos nos principais ensaios clínicos que avaliaram o uso do raltegravir.

Tabela 1. Principais ensaios clínicos que avaliaram o uso do raltegravir

| Ensaio clínico e estratégia terapêutica | n | Pacientes com CV <50 cópias/mL (%) | Média Δ CD4 (células/mm ³) | Referência |
|---|-----|------------------------------------|---|---------------------------------|
| P004 (48 semanas) | | | | |
| RAL 100mg DD | 41 | 85 | 221 | Markowitz <i>et al.</i> , 2007 |
| RAL 200mg DD | 40 | 83 | 146 | |
| RAL 400mg DD | 41 | 88 | 144 | |
| RAL 600mg DD | 40 | 88 | 187 | |
| EFV 600mg UD | 39 | 87 | 170 | |
| P004 (96 semanas) | | | | |
| RAL 400mg DD | 160 | 83 | 221 | Markowitz <i>et al.</i> , 2009 |
| EFV 600mg UD | 38 | 84 | 232 | |
| STARTMRK (48 semanas) | | | | |
| RAL 400mg DD | 281 | 86 | 189 | Lennox <i>et al.</i> , 2009 |
| EFV 600mg UD | 282 | 82 | 163 | |
| P005 (24 semanas) | | | | |
| RAL 200mg DD | 41 | 65 | 63 | Grinsztejn <i>et al.</i> , 2007 |
| RAL 400mg DD | 45 | 56 | 113 | |
| RAL 600mg DD | 44 | 67 | 94 | |
| placebo | 45 | 13 | 5 | |
| BENCHMRK (96 semanas) | | | | |
| RAL 400mg DD | 462 | 58 | 123 | Steigbigel <i>et al.</i> , 2010 |
| placebo | 237 | 26 | 49 | |
| SWITCHMRK (24 semanas) | | | | |
| RAL 400mg UD | 353 | 84 | - | Eron <i>et al.</i> , 2010 |
| LPV/r 400/100mg UD | 354 | 90 | - | |
| EASIER – ANRS 138 (24 semanas) | | | | |
| RAL 400mg UD | 84 | 88 | Estável | De Castro <i>et al.</i> , 2009 |
| ENF 90mg UD | 84 | 85 | Estável | |
| CHEER (24 semanas) | | | | |
| RAL 400mg UD | 52 | 94,2 | 32 | Towner <i>et al.</i> , 2009 |

UD: Uma dose diária; DD: duas doses diárias; RAL: raltegravir; EFV: efavirenz; ENF: enfuvirtida; LPV/r: lopinavir/ritonavir.

Há outros inibidores de integrase em fase avançada de estudos clínicos – elvitegravir (EVG) e S/GSK1349572 – cujos resultados vêm comprovando a eficácia destas novas drogas como parte da terapia antirretroviral. Estudos de fase II demonstraram a não inferioridade do EVG+ritonavir (EVG/r) juntamente com o

regime de base otimizado em comparação com IP+ritonavir nas doses de 50 e 125mg administrado uma vez ao dia. O EVG foi bem tolerado e a frequência de efeitos adversos não foi diferente entre os grupos analisados (ZOLOPA *et al.*, 2010).

Com base nesses bons resultados, estudos de fase III foram iniciados com o objetivo de demonstrar a não inferioridade do EVG/r administrado uma vez ao dia comparado com o esquema contendo RAL administrado duas vezes ao dia em pacientes multi-experimentados. Os resultados de 48 semanas mostram que um número comparável de pacientes nos braços do EVG e do RAL (59% e 58%, respectivamente) atingiu supressão virológica (MOLINA *et al.*, 2012).

Mais recentemente, o EVG foi formulado juntamente com entricitabina, tenofovir e com o inibidor de CYP3A4 colbicistat, sendo esta formulação denominada Quad. Esta formulação é administrada uma vez ao dia em um único comprimido oral e vem apresentando resultados promissores em pacientes virgens de terapia (revisto por PRADA, MARKOWITZ, 2010).

O composto dolutegravir, ou S/GSK572, é um inibidor de integrase de segunda geração, que vem apresentando resultados promissores nos estudos clínicos. Quando administrado em monoterapia por 10 dias, a dose de 50mg foi capaz de reduzir a carga viral plasmática para níveis abaixo de 400 cópias por mL em 90% dos pacientes, sendo que em 70% destes pacientes os níveis observados foram <50 cópias/mL, demonstrando que esta droga possui uma potente atividade antiviral (MIN *et al.*, 2011). Os estudos SPRING para a determinação da melhor dose verificaram que a dose de 50mg parece ser a mais adequada para a condução dos estudos de fase III (VAN LUNZEN *et al.*, 2011). O estudo VIKING, que visa avaliar o efeito deste inibidor de integrase de segunda geração em pacientes apresentando falha ao RAL vem sendo conduzido e seus resultados serão de extrema importância, verificando a possibilidade da utilização de inibidores de segunda geração nos pacientes com falha terapêutica aos inibidores de integrase.

O desenvolvimento de resistência aos antirretrovirais vem se apresentando como um grande obstáculo à manutenção da supressão da replicação do HIV, comprometendo o sucesso do tratamento dos pacientes submetidos à terapia. Apesar dos benefícios clínicos trazidos pelo raltegravir, não está claro por quanto tempo estes serão mantidos.

A seleção de variantes resistentes de HIV é consequência da alta taxa de erro da transcriptase reversa, enzima responsável por copiar o RNA viral em DNA. A

transcriptase reversa do HIV não corrige os erros na incorporação de bases, ou seja, não possui atividade exonuclease, gerando uma taxa de erro de incorporação da ordem de 10^{-4} bases para o HIV, ou seja, em seu genoma de aproximadamente 10kb, estima-se que haja a substituição de uma base por ciclo replicativo. Considerando a alta taxa de replicação deste vírus, que na ausência de tratamento é capaz de gerar até 10 bilhões de novas partículas por dia, variantes virais com potencial resistência às drogas são geradas diariamente. Os vírus contendo essas mutações podem emergir mesmo antes do início da terapia antirretroviral, porém neste momento, a variante selvagem existe em maior número. No momento em que é iniciada a terapia, a variante que porta a mutação de resistência possui uma vantagem adaptativa devido à pressão seletiva da droga, passando a replicar mais, assumindo a posição de variante majoritária. As mutações de resistência são geralmente classificadas em principais e acessórias. As mutações principais são selecionadas e permitem a replicação viral na presença de terapia e, geralmente, têm um impacto importante sobre a susceptibilidade às drogas e na resposta à terapia antirretroviral. As mutações acessórias emergem no sentido de compensar as mudanças causadas pelas mutações principais. A terapia antirretroviral combinada – HAART – tem como objetivo impedir o desenvolvimento de resistência aos medicamentos antirretrovirais e limitar a evolução das *quasi-espécies* resistentes presentes na população viral (DELAUGERRE, 2010).

O raltegravir apresenta uma barreira genética baixa. O conceito de barreira genética está relacionado à capacidade de uma droga selecionar vírus resistentes quando a replicação viral não está controlada. Este conceito inclui a combinação de várias características: a) o número de mudanças nucleotídicas necessárias para gerar uma mutação de resistência, b) o impacto desta mutação sobre o nível de sensibilidade à droga, c) o impacto desta mutação na capacidade replicativa viral (DELAUGERRE, 2010).

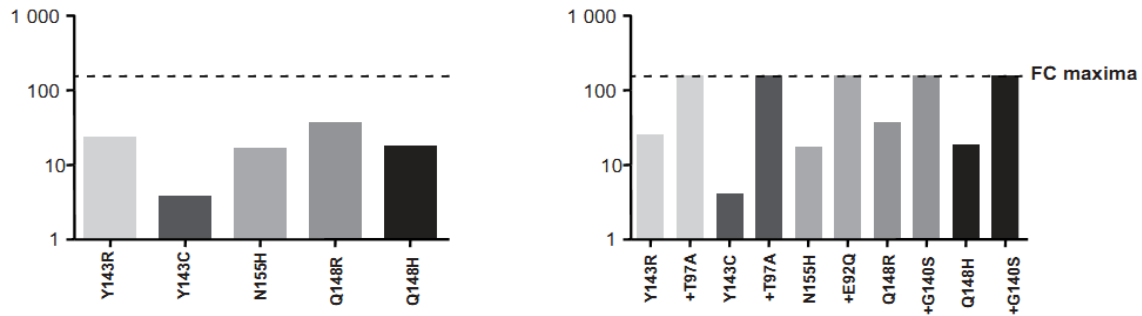
As mutações principais mais frequentemente observadas no desenvolvimento de resistência ao raltegravir são N155H, Q148H/R/K e Y143R/C, localizadas próximo ao sítio catalítico da integrase. Essas mutações em geral não se sobrepõem e não aparecem juntas em um mesmo genoma viral. Além das mutações principais, algumas mutações secundárias como L74M, E92Q/A, Q95K, T97A, E138A/K, G140S/A, Y143C/H, V151I, K156N, E157Q, G163K/R, I203M, T206S, S230R e D232N costumam emergir a fim de compensar a redução do *fitness* viral causada

pelo aparecimento da mutação principal. O perfil N155H está frequentemente associado às mutações secundárias L74M, E92Q/A, T97A, V151L ou G163R. O perfil Q148H/R/K é associado às mutações E138A/K ou G140A/S, enquanto Y143R/C vem acompanhada das mutações L74A/I, E92Q, T97A, I203M e/ou S230R (CHARPENTIER *et al.*, 2008; COOPER *et al.*, 2008; MALET *et al.*, 2008; DELELIS *et al.*, 2009; FERNS *et al.*, 2009; FRANSEN *et al.*, 2009; MALET *et al.*, 2009; QUERCIA *et al.*, 2009; DELELIS *et al.*, 2010; FUN *et al.*, 2010; HATANO *et al.*, 2010; REIGADAS *et al.*, 2010).

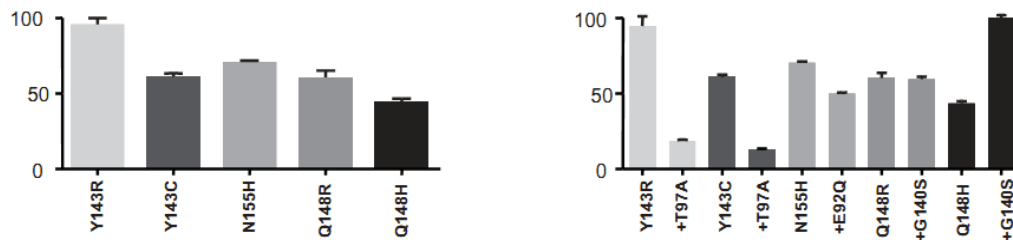
Nem todas estas variantes virais que desenvolvem mutações principais sob pressão do RAL apresentam a mesma capacidade replicativa. A adição da mutação secundária pode reverter ou não esta diminuição, conforme demonstrado na Figura 14. O duplo mutante Q148H + G140S é o melhor exemplo da combinação de um alto nível de resistência e uma capacidade replicativa idêntica a de um vírus selvagem; provavelmente devido a esta combinação de fatores favoráveis, este é o perfil mais comumente observado em pacientes com falha terapêutica ao raltegravir. De maneira oposta, o perfil de resistência Y143R + T97A confere um alto nível de resistência, mas diminui a capacidade de replicação viral, sendo raramente selecionado *in vivo*.

As duas vias de resistência mais comuns ao RAL - Q148H/R/K + G140S/A e N155H + E92Q – causam também resistência ao inibidor EVG, enquanto que as mutações Y143C/R + T97A não causam resistência cruzada entre essas duas drogas. As mutações T66I e S147G envolvidas no desenvolvimento de resistência ao EVG não são capazes de causar resistência ao raltegravir. Devido a esse grau de resistência cruzada, o uso sequencial destes dois inibidores de integrase com baixa barreira genética está comprometido. O inibidor de integrase de segunda geração, dolutegravir, possui uma maior barreira genética e apresenta atividade *in vitro* contra vírus portando as mutações N155H + E92Q e Y143C/R + T97A, contudo, a susceptibilidade a esta nova droga é reduzida em cerca de 10 a 20 vezes quando as mutações Q148H/R/K + G140S/A e/ou E138A/K estão presentes (CANDUCCI *et al.*, 2011).

Índice de resistência de diferentes variantes ao RAL



Capacidade replicativa (%) de variantes resistentes na integrase



Med Mal Infect. 2010 Sep;40 Suppl 1:S1-10.

Figura 14: Impacto dos principais perfis de resistência ao raltegravir na capacidade replicativa viral. Impacto sobre o nível de resistência fenotípica ao raltegravir e capacidade de replicação de vírus portando mutações primárias nos códons 143, 148 e 155 e/ou combinadas com mutações secundárias. Fonte: DELAUGERRE, 2010.

Um dos fatores que pode influenciar no desenvolvimento de resistência aos inibidores de integrase é a acentuada variabilidade genética viral. A ocorrência de polimorfismos em posições que podem influenciar a barreira genética e/ou direcionar a seleção de vias de resistência específicas são comuns, especialmente nos subtipos não-B.

Inicialmente, enquanto os inibidores de integrase ainda estavam em desenvolvimento, o estudo da variabilidade genética desta região do HIV começou de forma limitada, os trabalhos eram escassos e analisavam um número restrito de amostras (SWANSON, DEVARE, HACKETT, 2003; HERRING, CUNNINGHAM, DWYER, 2004; LATAILLADE, CHIARELLA, KOZAL, 2007; LEOZ *et al.*, 2008). Posteriormente, com a aprovação do raltegravir pelo FDA, um número maior de sequências da integrase foi depositado nos bancos de dados e as análises de

variabilidade na integrase passaram a ter um foco voltado para as posições associadas ao desenvolvimento de resistência (revisto por BLANCO *et al.*, 2011).

Com base nos dados derivados de estudos *in vitro* e dos ensaios clínicos com inibidores de integrase, um total de 39 mutações presentes em 29 posições no gene da integrase estão associadas à resistência ou podem influenciar na susceptibilidade aos inibidores de integrase. As mutações são as seguintes: H51Y, T66I, V72I, L74M/A/I, E92Q, T97A, F121Y, T125K, A128T, E138K/A, G140S/A, Y143R/C, Q146K/R, S147G, Q148K/R/H, V151I, S153A/Y, M154I, N155H/S, K156N, E157Q, K160D, G163R, V165I, V201I, I203M, T206S, S230M e V249I.

O estudo de Rhee e colaboradores foi o primeiro a analisar um grande número de sequências de integrase disponíveis no banco de dados de Los Alamos, totalizando mais de 1800, sendo 1500 delas provenientes de pacientes virgens de tratamento e contemplando os diferentes grupos e subtipos de HIV-1. Neste estudo observou-se que as mutações principais não são polimorfismos, e que várias mutações acessórias incluindo L74M, T97A, V151I, G163R, e S230N são polimórficas, com frequência variando entre 0,5% a 2,0% (RHEE *et al.*, 2008).

Desde então, diversos trabalhos vêm descrevendo a variabilidade genética na região da integrase do HIV-1 e HIV-2 em diversos países, descrevendo as posições conservadas e polimórficas na integrase em amostras de indivíduos virgens de tratamento (CECCHERINI-SILBERSTEIN *et al.*, 2009; LOW *et al.*, 2009; PASSAES *et al.*, 2009; AVI *et al.*, 2010; GARRIDO *et al.*, 2010; VARGHESE *et al.*, 2010; BRENNER *et al.*, 2011; NOUHIN *et al.*, 2011).

Alguns autores acreditam que a pressão da terapia em outras regiões do genoma do HIV pode interferir no aparecimento de mutações na integrase (VAN HAL *et al.*, 2009; CECCHERINI-SILBERSTEIN *et al.*, 2010). Van Hal e colaboradores identificaram uma maior divergência na região da integrase quando comparou indivíduos virgens de tratamento e em HAART ($3,8 \pm 0,18\%$ e $5,1 \pm 0,17\%$, respectivamente), além de ter detectado a mutação secundária G140S em dois pacientes previamente tratados. No estudo conduzido por Ceccherini-Silberstein e colaboradores, foi identificada uma associação positiva dos polimorfismos M154I, V165I e M185L na integrase com as mutações F227L e T215Y na transcriptase reversa. No entanto, estes resultados ainda são controversos.

De forma geral, os níveis de resistência primária a inibidores de integrase parecem ser muito baixos. Até o presente momento, três isolados portando as

mutações N155H, Q148H e Q148K foram identificados no estudo abrangente realizado por Rhee e colaboradores (RHEE *et al.*, 2008). Outro grupo demonstrou a existência de um isolado da Austrália portando a mutação principal N155H (VAN HAL *et al.*, 2009). Contudo, casos de transmissão de variantes resistentes ao raltegravir já foram descritos (BOYD *et al.*, 2011; YOUNG *et al.*, 2011) e após a introdução dos inibidores de integrase na prática clínica, os níveis de resistência primária devem ser monitorados.

1.3) Justificativa

A inclusão do inibidor de integrase raltegravir na terapia de resgate no Brasil evidenciou a necessidade da geração de conhecimento sobre esta enzima em diversos aspectos.

Dados sobre a diversidade genética da integrase no Brasil são escassos. A descrição de polimorfismos genéticos nos subtipos virais prevalentes no país, assim como a avaliação dos níveis de resistência primária a esta nova droga é de alta relevância. Uma vez que os pacientes sob terapia de resgate com o raltegravir possuem opções terapêuticas limitadas, o monitoramento da emergência de variantes resistentes aos inibidores de integrase é fundamental para que os benefícios clínicos da terapia sejam mantidos. Para que seja feito um acompanhamento minucioso do desenvolvimento de resistência é necessária a utilização de métodos de genotipagem. Neste contexto, justifica-se o desenvolvimento de uma metodologia de genotipagem da integrase que represente uma alternativa menos custosa do que os métodos comerciais disponibilizados recentemente.

No contexto da patogênese da infecção pelo HIV, o processo de integração desempenha um papel chave no ciclo de replicação viral. No entanto, dados sobre mecanismos de restrição à integração e a correlação de fatores virais e celulares relacionados ao processo de integração em pacientes capazes de controlar a infecção pelo HIV ainda são escassos.

Este trabalho justifica-se pela relevância e contemporaneidade do tema em questão, visando agregar conhecimento no campo da genética viral, da clínica e da patogênese da infecção pelo HIV, com foco na enzima integrase.

II. Objetivos

2.1) Objetivo Geral

Desenvolver um estudo de caracterização da integrase do HIV-1, incluindo aspectos virológicos e genéticos, assim como sua função relacionada ao processo de integração, em pacientes sob terapia com o inibidor de integrase e/ou indivíduos que apresentam cursos clínicos distintos da infecção pelo HIV-1.

2.2) Objetivos Específicos

- ✓ Avaliar a diversidade genética da integrase do HIV-1 circulantes no Brasil;
- ✓ Monitorar os níveis de resistência primária em amostras de indivíduos virgens de tratamento no Brasil;
 - ✓ Monitorar os níveis de resistência em pacientes em terapia com o inibidor de integrase raltegravir no Brasil;
 - ✓ Desenvolver um kit de genotipagem para monitorar a emergência de mutações de resistência às novas drogas inibidoras de integrase no Brasil.
- ✓ Identificar a presença de mutações nos resíduos de aminoácidos importantes para a atividade da integrase em pacientes capazes de controlar naturalmente a infecção pelo HIV;
 - ✓ Investigar se o processo de integração pode estar comprometido em pacientes controladores da infecção pelo HIV.

III. Documentos

3.1) Documento 1 - “*Lack of primary mutations associated with integrase inhibitors among HIV-1 subtypes B, C, and F circulating in Brazil*”

Autores: Caroline Bittencourt Passaes, Monick Lindenmeyer Guimarães, Saada Lima Chequer Fernandez, Roberta dos Santos Lorete, Sylvia Lopes Maia Teixeira, José Carlos Couto Fernandez, Mariza Gonçalves Morgado.

Periódico: J Acquir Immune Defic Syndr 2009;51:7–12

Diante da aprovação de inibidores de integrase para serem usados na terapia de resgate em 2007, este trabalho teve como objetivo avaliar a diversidade genética do HIV-1 na região da integrase em amostras dos subtipos B, C e F.

Para realizar este estudo, 105 amostras foram obtidas de pacientes virgens de tratamento, sendo 31 amostras do subtipo B, 47 amostras C e 27 amostras F. As amostras foram coletadas no Rio de Janeiro (subtipos B e F) e Porto Alegre (subtipo C). Além destas, 30 amostras de pacientes em falha terapêutica aos inibidores de protease e transcriptase reversa (subtipo B) foram avaliadas.

Polimorfismos foram identificados em todos os subtipos analisados, e em alguns casos, dois aminoácidos com alta frequência foram observados na mesma posição. Para o subtipo B, as posições 11 (E = 48%, D = 48%), 72 (V = 58.1%, I = 41.9%), 101 (L = 54.8%, I = 41.9%), e 201 (V = 54.8%, I = 45.2%) apresentaram dois aminoácidos com alta frequência, enquanto que as substituições 119 (T = 59.2%, P = 37.1%), 165 (V = 59.2%, I = 40.7%), 205 (S = 62.9%, A = 37.1%) e 211 (R = 51.8%, K = 48.1%) foram observadas em amostras do subtipo F. Assinaturas moleculares foram encontradas nas amostras brasileiras dos subtipos C (posições 50, 100, 124, 125, 251, 265, 281, e 283) e F (posições 72, 84, 112, 119, 205, e 218). Onze mutações de resistência observadas nos estudos *in vitro* e *in vivo* foram identificadas em nosso estudo – V72I, L74I, T97A, T112I, V151I, M154I, K156N, E157Q, G163K, V165I, e V201I – sendo algumas destas presentes em frequência > 90%.

O presente estudo demonstra que, apesar de conservada em posições importantes para a atividade catalítica, a integrase apresenta posições polimórficas, demonstrando a presença de assinaturas típicas relacionadas ao subtipo viral. Apesar da ocorrência de alguns polimorfismos em posições relacionadas à

resistência, a ausência de mutações principais encoraja o uso dos inibidores de integrase na prática clínica no Brasil.

Lack of Primary Mutations Associated With Integrase Inhibitors Among HIV-1 Subtypes B, C, and F Circulating in Brazil

Caroline Bittencourt Passaes, MSc, Monick Lindenmeyer Guimarães, PhD,
Saada Lima Chequer Fernandez, MSc, Roberta dos Santos Lorete, MSc,
Sylvia Lopes Maia Teixeira, PhD, José Carlos Couto Fernandez, PhD,
and Mariza Gonçalves Morgado, PhD

Background: Antiretroviral drugs targeting integrase (IN) have recently been approved for use in combined and salvage therapeutic interventions.

Objective: To evaluate the presence of natural polymorphisms and resistance mutations associated with IN inhibitors among HIV-1 subtypes B, C, and F samples obtained from drug-naive individuals and patients failing highly active antiretroviral therapy in Brazil.

Methods: Proviral DNA was obtained from blood samples of 105 HIV-1–positive drug-naive patients infected by B, C, or F subtypes and plasma viral RNA from 30 subtype B–infected individuals failing highly active antiretroviral therapy. The IN region was amplified by nested polymerase chain reaction and automatically sequenced for subtype determination. Translated amino acid sequences were inspected for IN mutations associated with antiretroviral resistance.

Results: Eleven mutations described as conferring *in vitro* resistance to IN strand transfer inhibitors were detected among the HIV-1 Brazilian samples. V72I and V201I were considered as polymorphisms. Major mutations associated with elvitegravir or raltegravir *in vivo* resistance (Q148K/H/R, N155H) were not detected.

Conclusions: Although some naturally occurring polymorphisms were observed, the absence of major resistance mutations for the current IN inhibitors provides a good rationale for the introduction of these drugs in Brazil. These results highlight the importance of the continuous surveillance of IN genetic diversity.

Key Words: antiretroviral treatment, Brazil, genetic polymorphisms, HIV-1 integrase, HIV-1 subtypes, resistance mutation

(*J Acquir Immune Defic Syndr* 2009;51:7–12)

INTRODUCTION

Integrase (IN) is a 32 kDa protein encoded by the *pol* gene. IN is 288 amino acid residues long and possesses 3 domains. Two domains have specific and conserved motifs that are essential for viral activity or infectivity. The N-terminal domain (1–49) is highly conserved among the retroviruses. This domain has a conserved motif (H₁₂, H₁₆, C₄₀, and C₄₃) that binds Zn²⁺, promoting protein multimerization and catalytic activity.^{1–4} The second catalytic domain (50–212) contains the conserved motif D₆₄, D₁₁₆, and E₁₅₂ that is the active site of the enzyme.^{1,5,6} Finally, the C-terminal domain (213–288) has nonspecific DNA binding activity, and it is thought to play a role in binding to host DNA.^{1,4,7}

IN is essential for the integration of HIV-1 DNA into the host chromosome.⁸ This process takes place in 2 following steps: 3' processing and strand transfer.^{1,8–13} During the 3' processing, IN recognizes conserved sequences in the long terminal repeats (LTR) promoting the removal of GT dinucleotides from the 3' end, resulting in new 3' hydroxyl ends.^{1,8–10} This step occurs in the cytoplasm and involves the preintegration complex, which consists of both viral and cellular proteins that help the preintegration complex to migrate through nuclear pores.^{11,12} IN catalyzes strand transfer inside the nucleus. Target DNA is cleaved and viral DNA is joined to the 5' phosphate ends in the host chromosome.⁸ Integration is most likely completed by the host DNA repair machinery, producing a stable provirus.^{10,13} Because of these properties, IN is a key target for drug therapy.

Drugs with the potential capacity to inhibit HIV-1 IN have been extensively studied in the last few years.^{14,15} Several IN inhibitors are currently in different stages of development and clinical application. The compounds L-708,906, L-731,988, L-870,810, S-1360, raltegravir, elvitegravir, and MK-2048 belong to a class of strand transfer IN inhibitors. These are considered the most effective drugs for inhibiting viral integration. In 2007, the Food and Drug Administration

Received for publication July 1, 2008; accepted January 26, 2009.

From the Laboratory of AIDS and Molecular Immunology, Oswaldo Cruz Institute, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil.

Supported by CNPq/FIOCRUZ and FAPERJ grants.

Parts of the data were presented at AIDS Vaccine 07, August 20–23, 2007, Seattle, WA; at the 14th Conference on Retrovirus and Opportunistic Infections, February 25–28, 2007, Los Angeles, CA; and at the 2nd Congresso da Comunidade dos Países de Língua Portuguesa em DST/AIDS, April 14–17, 2008, Rio de Janeiro, Brazil.

GenBank accession numbers: available upon request.

Correspondence to: Mariza Gonçalves Morgado, PhD, Laboratory of AIDS and Molecular Immunology, IOC/FIOCRUZ, Avenida Brasil 4365, Leonidas Deane Building, Room Number 413, Rio de Janeiro 21040-900, Brazil (e-mail: mmorgado@ioc.fiocruz.br).

Copyright © 2009 by Lippincott Williams & Wilkins

approved the use of raltegravir (MK-0518) in antiretroviral therapy, and elvitegravir (GS-9137) is in phase III clinical trials. Both compounds have shown powerful results in short-term monotherapy studies^{16–21} and are now indicated for rescue therapy in association with other drug classes. The MK-2048 is a second-generation IN inhibitor that shows excellent antiviral activity, good pharmacokinetics, and a higher genetic barrier. It also has the potential to inhibit HIV-1-resistant variants generated by the first-generation IN inhibitors.²²

Mutations associated with strand transfer IN inhibitors were first described based on in vitro studies.^{16,17,22–31} Two principal pathways of resistance were associated with raltegravir: N155H + L74M, E92Q, T97A, V151I, and/or G163R; and Q148K/R/H + E138K/A and/or G140S/A. A third pathway may also occur including Y143R/C + L74A/I, E92Q, T97A, I203M, and/or S230R. However, the kinetics of viral escape observed in vivo for patients under raltegravir treatment has not been following the same rules. Although patients failing raltegravir in phase II and III studies presented with N155H + L74M, E92Q, G163R or Q148H/R/K + E138K, G140S/A mutations,^{32,33} different failure profiles were observed in other studies. These patients harbored unique E92Q, G140S/Q148H, N155H, E157Q³⁴ or Q148R + G140S, Q148H, N155H; T66A/E92Q + L74I³⁵ mutations, suggesting additional pathways associated with raltegravir resistance. Two additional pathways of resistance development were also described in vitro for elvitegravir (T66I + F121Y, S153Y, R263K and E92Q + H51Y, S147G, E157Q),^{16,17,21,31} whereas different mutation profiles (E92Q, Q148H/R/K, N155H, S147G, T66I/A/K) were detected in patients failing this drug.³⁶

The present study describes for the first time the occurrence of natural genetic polymorphisms in the IN gene among HIV-1 subtypes B, C, and F samples from Brazil and identifies the frequency of resistance mutations associated with IN inhibitors in samples from antiretroviral drug-naive individuals. We also analyzed a set of HIV-1 samples from patients failing highly active antiretroviral therapy (HAART) to investigate if the selective pressure on the protease and reverse transcriptase regions might induce variations in the IN region of the *pol* gene.

METHODS

Samples

A total of 105 HIV-1 samples obtained from drug-naive individuals infected with the major subtypes prevalent in Brazil, previously subtyped based on *env* and/or *pol* regions, were selected for this study as follows: 31 samples from subtype B, 47 samples from C, and 27 from F. These samples were obtained from patients from Rio de Janeiro (subtypes B and F) and Porto Alegre (subtype C) and were collected during the same period of time (1998–2003). We also evaluated 30 additional subtype B samples (previously subtyped for *pol*) obtained from patients failing HAART. These samples showed resistance mutations for both protease and reverse transcriptase inhibitors and were collected in Rio de Janeiro between 2005 and 2006. This study was approved by the FIOCRUZ Ethical Research Committee (project number 317/06), as an anonymous unlinked study.

DNA/RNA Isolation, Polymerase Chain Reaction, and Sequencing

Genomic DNA was extracted from whole blood of drug-naive patients using a DNA extraction column kit (QIAamp DNA Mini Blood Kit; QIAGEN, Valencia, CA). Plasma RNA of individuals failing HAART was obtained from the ViroSeq HIV-1 Genotyping System protocol (Celera Diagnostic, Abbott Laboratories, Des Plaines, IL), and the reverse transcription reaction was performed using the random primers protocol. The amplification of the entire IN gene (864 base pair; HXB2 4230–5093) was performed by a nested protocol using primers targeting IN flanking conserved regions, and the polymerase chain reaction products were purified using GFX polymerase chain reaction DNA and Gel Band Purification kit (Amersham Biosciences, Little Chalfont, Buckinghamshire, United Kingdom) and sequenced in an ABI 3100 Genetic Analyzer automated sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA) with BigDye Terminator (version 3.1) Cycle Sequencing Reaction Kits.

Sequence Analysis and Statistical Methods

Nucleotide sequences were assembled and manually edited using SeqMan (DNASTAR package). Subtype determination in the IN region was inferred based on phylogenetic analysis (neighbor joining with Kimura-2 parameters correction as available in the Mega 4.1 package).³⁷ Sequences were later translated using EditSeq (DNASTAR package) and aligned with MegAlign (DNASTAR package). An extensive analysis of the predicted amino acid sequences corresponding to a fragment encoding the complete IN protein (288 base pair) was performed, concerning the identification of naturally occurring polymorphisms (frequencies higher than 40%) in HIV-1 subtypes B, C, or F, respectively. Brazilian consensus sequences were generated using MegAlign for each subtype, including the most frequent amino acid at each position. In those positions where 2 amino acids occur at frequencies higher than 40%, both amino acids were represented in the consensus. The Brazilian consensus sequences generated in this study were aligned and compared with the subtype-specific consensus sequences obtained from the Los Alamos Sequence Database (LASDB). Frequencies of resistance mutations associated with IN inhibitors observed for untreated and failing HAART individuals were compared using the Fisher exact test analysis (INSTAT2 software).

RESULTS

Analysis of IN Diversity and Natural Polymorphisms

Figure 1 depicts the extensive polymorphism identified in the IN region of the HIV-1 B, C, and F subtypes prevalent in Brazil. Naturally occurring polymorphisms were observed for the subtypes B, C, and F samples when they were compared with the subtype B consensus sequence available from the LASDB. At least 2 amino acids at frequencies higher than 40% were detected at some positions for the subtypes B and F Brazilian samples. The sites for subtype B were positions 11 (E = 48%, D = 48%), 72 (V = 58.1%, I = 41.9%), 101 (L = 54.8%, I = 41.9%), and 201 (V = 54.8%, I = 45.2%) and

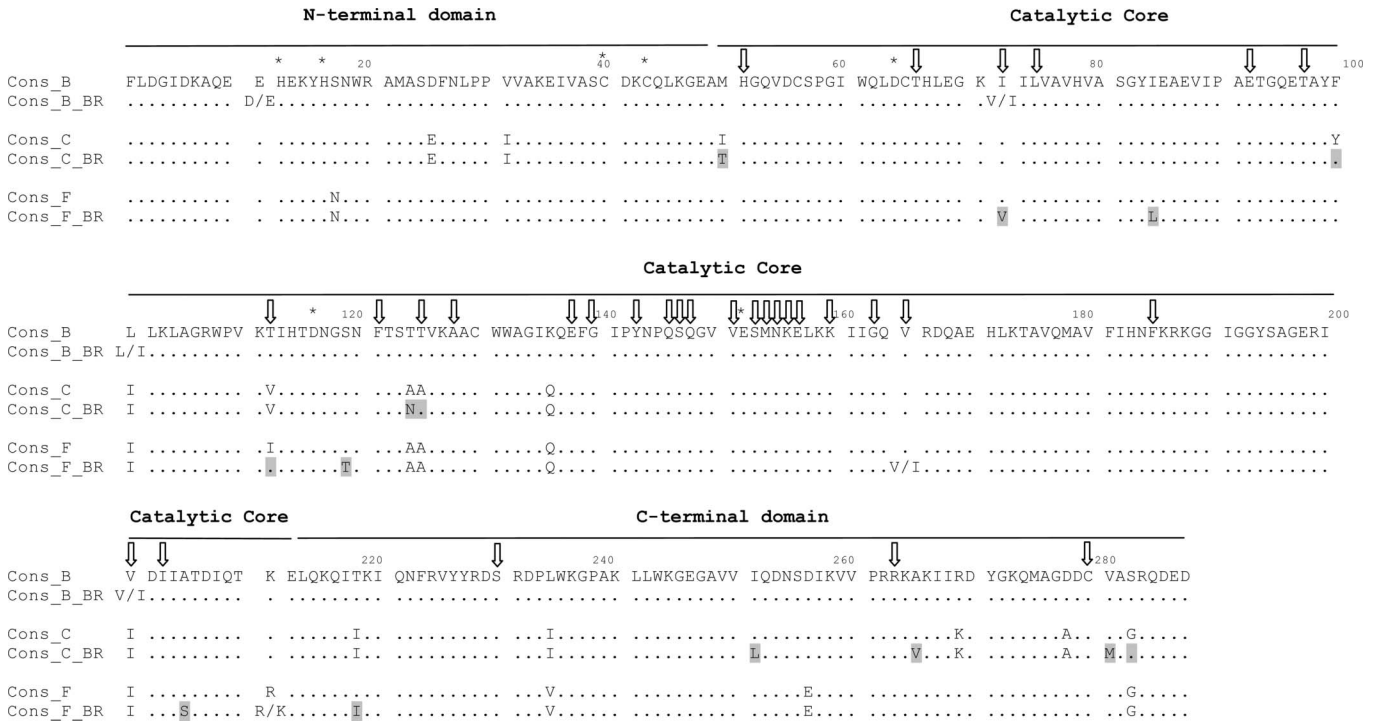


FIGURE 1. Alignment of HIV-1 IN comparing Brazilian subtypes B, C, and F amino acid consensus sequences with their respective consensus obtained from the LASDB. Positions in agreement with consensus B are indicated by dots. HHCC and DDE conserved motifs are indicated by *. Polymorphic sites with frequencies higher than 40% are represented by both amino acids. Brazilian-specific amino acid signatures are highlighted in gray. The arrows indicate the positions described as conferring resistance to IN strand transfer inhibitors.

for subtype F, 165 (V = 59.2%, I = 40.7%) and 211 (R = 51.8%, K = 48.1%). Positions 119 (T = 59.2%, P = 37.1%) and 205 (S = 62.9%, A = 37.1%) showed 2 amino acids with frequencies higher than 30% in the subtype F data set. In contrast, all positions in the subtype C data set displayed only 1 amino acid at a frequency higher than 40% (Fig. 1). No amino acid substitution was verified in the conserved motifs HHCC and DDE of IN. This was also true for the positions associated with the interaction with lens epithelium-derived growth factor (LEDGF)/p75 (E92, A129, W131, W132, I161, Q164, V165, R166, D167, Q168, E170, L172, and K173) in the analyzed subtypes.

To identify Brazilian-specific molecular signatures, Brazilian B, C, and F IN consensus sequences generated based on the data set analyzed in this study were compared with subtype-specific consensus obtained from LASDB. High homology could be detected between Brazilian and LASDB subtype B consensus sequences, with a few differences occurring only at positions 11 and 72 where the Brazilian consensus B presented more than 1 prevalent amino acid. A higher level of variation, however, was observed between LASDB and Brazilian consensus C (positions 50, 100, 124, 125, 251, 265, 281, and 283) and F (72, 84, 112, 119, 205, and 218).

Resistance Mutations Associated With IN Inhibitors

The frequencies of resistance mutations associated with the IN inhibitors for the Brazilian subtypes B, C, and F

samples obtained from drug-naive HIV-1-positive individuals are detailed in Table 1. Eleven of the previously described mutations conferring in vitro and/or in vivo resistance to IN strand transfer inhibitors^{16,17,22-34} were detected in our study (V72I, L74I, T97A, T112I, V151I, M154I, K156N, E157Q,

TABLE 1. Frequency of Resistance Mutations Associated With IN Inhibitors Among HIV-1 Subtype B, C, and F Seropositive Drug-Naive Individuals

| Mutations | Frequency of Resistance Mutations Associated With IN Inhibitors, % | | | Resistance To |
|-----------|--|-----------|-----------|---|
| | Subtype B | Subtype C | Subtype F | |
| V72I | 41.9 | 91.4 | 25.9 | L-870,810 |
| L74I | 0 | 4.3 | 0 | Raltegravir |
| T97A | 0 | 2.2 | 0 | L-870,810/raltegravir |
| T112I | 3.2 | 4.2 | 22.2 | MK-2048 |
| V151I | 16.1 | 0 | 0 | L-708,906/L-731,988/L-870,810/raltegravir |
| M154I | 3.2 | 2.2 | 0 | L-708,906/L-731,988 |
| K156N | 6.5 | 0 | 0 | L-870,810 |
| E157Q | 3.2 | 0 | 0 | Elvitegravir |
| G163K | 0 | 0 | 3.7 | Raltegravir |
| V165I | 0 | 2.2 | 40.7 | S-1360/V-165 |
| V201I | 45.2 | 97.8 | 100 | S-1360 |

G163K, V165I, and V201I). Some of them could be even considered as the typical molecular signatures (>90%) for the C and F subtypes. Indeed, the V72I mutation was observed as a relatively frequent polymorphism in samples corresponding to subtypes B (41.9%) and F (25.9%), and they seem to be the typical signature in subtype C (91.4%). Other mutations were observed in substantial frequencies, for example, V151I in subtype B (16.2%) and T112I and V165I in subtype F (22.2% and 40.7%, respectively). The V201I mutation was observed as a polymorphism in subtype B (45.2%) and represents a molecular signature for subtypes C (97.8%) and F (100%). The remaining mutations were observed in low frequencies.

It is important to point out that the major mutations N155H, Q148K/R/H, and Y143R/C associated to raltegravir and T66I and E92Q associated to elvitegravir resistance were not observed in the Brazilian subtypes B, C, and F samples that we analyzed. Only the minor V151I mutation, described for raltegravir resistance, was observed among the subtype B samples in high frequency (16.1%). Moreover, the T112I mutation described to confer *in vitro* resistance to the second generation of the IN inhibitor MK-2048 was observed in high frequencies in the subtype F samples (22.2%).

To evaluate the selective pressure on the polymerase gene by long-term treatment with the current protease and reverse transcriptase antiretroviral drugs, a subset of subtype B-infected patients failing HAART was included in the present study. However, no statistically significant difference was observed in the frequency of resistance mutations associated with IN inhibitors when compared with the untreated group (data not shown).

DISCUSSIONS

IN is considered a key target for therapeutic interventions. IN inhibitors have been extensively investigated, and at the present time, 2 drugs—raltegravir (MK-0518) and elvitegravir (GS-9137)—have shown promising results as potent inhibitors of HIV-1 replication. They also have good pharmacokinetic characteristics and are well tolerated by the patients.^{18–21} In 2007, raltegravir was approved by Food and Drug Administration to be used as an additional drug in antiretroviral therapy, and elvitegravir is currently in phase III of clinical trials. In Brazil, the National Health Surveillance Agency (Anvisa) has already approved the use of raltegravir in the country. Nevertheless, resistance mutations associated with these drugs and to other IN inhibitors have already been described *in vitro* and also *in vivo*.^{16,17,22–36} Despite these observations, few studies concerning drug resistance and genetic diversity of IN have been published so far.^{38–44}

In the present study, we confirmed the conservation of the HHCC and DDE motifs, and the positions associated with the interaction with LEDGF/p75, demonstrating the importance of these sites to IN activity. Moreover, the major mutations T66I, E92Q, Y143R/C, Q148K/H/R, and N155H associated with elvitegravir or raltegravir resistance were not detected. Other mutations associated with these drugs including L74I, T97A, V151I, E157Q, and G163K were observed at a very low frequency, independent of HIV-1 subtype. This provides a good rationale for the introduction of

these drugs in Brazil. It is important to point out, however, that the sensitivity of bulk DNA sequencing, as used in our study, may underestimate the occurrence of minority population bearing resistance mutations associated with IN inhibitors.

Naturally occurring IN polymorphisms have already been described and, depending on the position, could contribute to the reduction of the IN inhibitors' effectiveness. As observed in this and other studies,^{41,42} V72I, described as conferring resistance to the L-870,810 IN inhibitor,²⁸ was identified as an important polymorphism for subtypes B and F. This mutation occurred as a typical molecular signature in subtype C samples. The V151I mutation was observed in 16.1% of the Brazilian HIV-1 subtype B samples, which is more than 3-fold the frequency (4.9%) observed for the subtype B samples available in the LASDB.⁴¹ Mutation V165I was found in roughly 41% of the Brazilian subtype F samples, whereas very low frequencies of this mutation were observed for both subtypes B and C in the present study, confirming previous data available for subtype B.⁴¹

A high frequency of the V201I mutation (83.6%) was verified for a set of samples including B subtype and non-B subtypes and recombinant genomes (A, B, C, D, AE, AG).⁴² As observed in the present work, the V201I mutation corresponded to a typical signature for subtypes C and F samples (>97%), which could contribute to its high frequency as previously observed.⁴² This mutation was also present in around 45% of the subtype B samples analyzed in the present study and elsewhere.⁴¹ The mutation T112I, recently described as conferring resistance to the second-generation IN inhibitor MK-2048,²² was observed in 22% of the Brazilian subtype F samples. Very low frequencies (1 or 2 samples) were positive for the mutations T112I, M154I, K156N, and E157Q in subtype B; L74I, T97A, M154I, and V165I in subtype C; and G163K in subtype F. Interestingly, some polymorphic sites in the IN region, independent of the HIV-1 subtype, are associated with the substitution of valine (codons GTT, GTC, GTA, and GTG) by isoleucine (ATT, ATC, and ATA), which correspond to G>A hypermutation, frequently observed in retroviruses.⁴⁵

As demonstrated in this study, some mutations described as conferring resistance to IN inhibitors correspond to polymorphisms and typical molecular signatures, mainly for subtypes C and F and even in subtype B. Typical signatures for the Brazilian subtypes B, C, and F samples were also observed when compared with the consensus sequences for these subtypes available in the LASDB, corresponding to HIV-1 sequences described worldwide. However, these typical signatures do not occur at positions associated with resistance mutations to the currently available IN inhibitors.

The frequencies of resistance-related mutations to IN inhibitors observed in patients failing HAART were similar to those described for the untreated group, suggesting that the selective pressure on the *pol* gene due to protease inhibitor and reverse transcriptase inhibitor treatment does not impact the IN region. This result corroborates the role of the IN inhibitor as a potential powerful salvage therapy in patients failing HAART, as previously demonstrated by clinical trials.^{18–21}

The findings here described, based on the analysis of HIV-1 samples obtained from drug-naive individuals, confirm

the polymorphic nature of the IN gene and depict the occurrence of typical HIV-1 subtype molecular signatures. Further studies including HIV-1–positive individuals infected by distinct HIV-1 subtypes placed under selective pressure by IN inhibitors will be of paramount importance to assess the profile of resistance development and the impact of natural polymorphisms in treatment with this class of drugs.

ACKNOWLEDGMENTS

We wish to thank Dr. David Watkins, Dr. Vera Bongertz, and Dr. Gonzalo Bello for helpful discussions, for critical suggestions, and for reviewing the article.

REFERENCES

- Chiu TK, Davies DR. Structure and function of HIV-1 integrase. *Curr Top Med Chem*. 2004;4:965–977.
- Zheng R, Jenkins TM, Craigie R. Zinc folds the N-terminal domain of HIV-1 integrase, promotes multimerization, and enhances catalytic activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93:13659–13664.
- Lee SP, Xiao J, Knutson JR, et al. Zn²⁺ promotes the self-association of human immunodeficiency virus type-1 integrase in vitro. *Biochemistry*. 1997;36:173–180.
- Bushman FD, Engelman A, Palmer I, et al. Domains of the integrase protein of human immunodeficiency virus type 1 responsible for polynucleotidyl transfer and zinc binding. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90:3428–3432.
- Engelman A, Craigie R. Identification of conserved amino acid residues critical for human immunodeficiency virus type 1 integrase function in vitro. *J Virol*. 1992;66:6361–6369.
- Drelich M, Wilhelm R, Mous J. Identification of amino acid residues critical for endonuclease and integration activities of HIV-1 IN protein in vitro. *Virology*. 1992;188:459–468.
- Vink C, Oude Groeneger AM, Plasterk RH. Identification of the catalytic and DNA-binding region of the human immunodeficiency virus type 1 integrase protein. *Nucleic Acids Res*. 1993;21:1419–1425.
- Engelman A, Mizuuchi K, Craigie R. HIV-1 DNA integration: mechanism of viral DNA cleavage and DNA strand transfer. *Cell*. 1991;67:1211–1221.
- LaFemina RL, Schneider CL, Robbins HL, et al. Requirement of active human immunodeficiency virus type 1 integrase enzyme for productive infection of human T-lymphoid cells. *J Virol*. 1992;66:7414–7419.
- Sakai H, Kawamura M, Sakuragi J, et al. Integration is essential for efficient gene expression of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol*. 1993;67:1169–1174.
- Miller MD, Farnet CM, Bushman FD. Human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes: studies of organization and composition. *J Virol*. 1997;71:5382–5390.
- Van Maele B, Debyser Z. HIV-1 integration: an interplay between HIV-1 integrase, cellular and viral proteins. *AIDS Rev*. 2005;7:26–43.
- Yoder KE, Bushman FD. Repair of gaps in retroviral DNA integration intermediates. *J Virol*. 2000;74:11191–11200.
- Pommier Y, Johnson AA, Marchand C. Integrase inhibitors to treat HIV/AIDS. *Nat Rev Drug Discov*. 2005;4:236–248.
- Dayam R, Al-Mawsawi LQ, Neamati N. HIV-1 integrase inhibitors: an emerging clinical reality. *Drugs R D*. 2007;8:155–168.
- Cooper D, Gatell J, Rockstroh J, et al. Results of BENCHMRK-1, a phase III study evaluating the efficacy and safety of MK-0518, a novel HIV-1 integrase inhibitor, in patients with triple-class resistant virus. Presented at: 14th Conference on Retroviruses & Opportunistic Infections; February 27, 2007; Los Angeles, CA. Abstract 105aLB.
- Steigbigel R, Kumar P, Eron J, et al. Results of BENCHMRK-2, a Phase III Study Evaluating the Efficacy and Safety of MK-0518, a Novel HIV-1 Integrase Inhibitor, in Patients with Triple-class Resistant Virus. Presented at: 14th Conference on Retroviruses & Opportunistic Infections; February 27, 2007; Los Angeles, CA. Abstract 105bLB.
- Grinsztejn B, Nguyen BY, Katlama C, et al. Safety and efficacy of the HIV-1 integrase inhibitor raltegravir (MK-0518) in treatment-experienced patients with multidrug-resistant virus: a phase II randomised controlled trial. *Lancet*. 2007;369:1261–1269.
- Markowitz M, Morales-Ramirez JO, Nguyen BY, et al. Antiretroviral activity, pharmacokinetics, and tolerability of MK-0518, a novel inhibitor of HIV-1 integrase, dosed as monotherapy for 10 days in treatment-naïve HIV-1-infected individuals. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2006;43:509–515.
- DeJesus E, Berger D, Markowitz M, et al. Antiviral activity, pharmacokinetics, and dose response of the HIV-1 integrase inhibitor GS-9137 (JTK-303) in treatment-naïve and treatment-experienced patients. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2006;43:1–5.
- Zolopa AR, Mullen M, Berger D, et al. The HIV Integrase Inhibitor GS-9137 demonstrates potent antiretroviral activity in treatment-experienced patients. Presented at: 14th Conference on Retroviruses & Opportunistic Infections; February 28, 2007; Los Angeles, CA. Abstract 143LB.
- Wai J, Fisher T, Embrey M, et al. Next generation of inhibitors of HIV-1 integrase strand transfer inhibitor: structural diversity and resistance profiles. Presented at: 14th Conference on Retroviruses & Opportunistic Infections; February 27, 2007; Los Angeles, CA. Abstract 87.
- King PJ, Robinson WE Jr. Resistance to the anti-human immunodeficiency virus type 1 compound L-chicoric acid results from a single mutation at amino acid 140 of integrase. *J Virol*. 1998;72:8420–8424.
- Hazuda DJ, Felock P, Witmer M, et al. Inhibitors of strand transfer that prevent integration and inhibit HIV-1 replication in cells. *Science*. 2000;287:646–650.
- Billich A. S-1360 Shionogi-GlaxoSmithKline. *Curr Opin Investig Drugs*. 2003;4:206–209.
- Fikkert V, Van Maele B, Vercammen J, et al. Development of resistance against diketo derivatives of human immunodeficiency virus type 1 by progressive accumulation of integrase mutations. *J Virol*. 2003;77:11459–11470.
- King PJ, Lee DJ, Reinke RA, et al. Human immunodeficiency virus type-1 integrase containing a glycine to serine mutation at position 140 is attenuated for catalysis and resistant to integrase inhibitors. *Virology*. 2003;306:147–161.
- Hazuda DJ, Anthony NJ, Gomez RP, et al. A naphthyridine carboxamide provides evidence for discordant resistance between mechanistically identical inhibitors of HIV-1 integrase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101:11233–11238.
- Fikkert V, Hombrouck A, Van Remoortel B, et al. Multiple mutations in human immunodeficiency virus-1 integrase confer resistance to the clinical trial drug S-1360. *AIDS*. 2004;18:2019–2028.
- Lee DJ, Robinson WE Jr. Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) integrase: resistance to diketo acid integrase inhibitors impairs HIV-1 replication and integration and confers cross-resistance to L-chicoric acid. *J Virol*. 2004;78:5835–5847.
- Jones G, Ledford R, Yu F, et al. Resistance profile of HIV-1 mutants in vitro selected by the HIV-1 integrase inhibitor, GS-9137 (JTK-303). Presented at: 14th Conference on Retroviruses & Opportunistic Infections; 2007; Los Angeles, CA. Abstract 627.
- Hazuda DJ, Miller MD, Nguyen BY, et al. Resistance to the HIV-integrase inhibitor raltegravir: analysis of protocol 005, a phase II study in patients with triple class resistance HIV-1 infection. *Antivir Ther*. 2007;12:S10.
- Cooper DA, Steigbigel RT, Gatell JM, et al. Subgroup and resistance analyses of raltegravir for resistant HIV-1 infection. *N Engl J Med*. 2008;359:355–365.
- Malet I, Delelis O, Valantin MA, et al. Mutations associated with failure of raltegravir treatment affect integrase sensitivity to the inhibitor in vitro. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;52:1351–1358.
- Charpentier C, Karmochkine M, Laureillard D, et al. Drug resistance profiles for the HIV integrase gene in patients failing raltegravir salvage therapy. *HIV Med*. 2008;9:765–770.
- McColl DJ, Fransen S, Gupta S, et al. Resistance and cross-resistance to first generation integrase inhibitors: insights from a phase II study of elvitegravir (GS-9137). *Antivir Ther*. 2007;12:S11.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol*. 2007;24:1596–1599.
- Burns CC, Gleason LM, Mozaffarian A, et al. Sequence variability of the integrase protein from a diverse collection of HIV type 1 isolates representing several subtypes. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2002;18:1031–1041.

39. Swanson P, Devare SG, Hackett J Jr. Molecular characterization of 39 HIV isolates representing group M (subtypes A–G) and group O: sequence analysis of gag p24, pol integrase, and env gp41. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2003;19:625–629.
40. Herring BL, Cunningham AL, Dwyer DE. Potential drug resistance polymorphisms in the integrase gene of HIV type 1 subtype A. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2004;20:1010–1014.
41. Lataillade M, Chiarella J, Kozal MJ. Natural polymorphism of the HIV-1 integrase gene and mutations associated with integrase inhibitor resistance. *Antivir Ther*. 2007;12:563–570.
42. Zioni R, Rhee S, Liu T, et al. Natural variation of HIV-1 group M integrase: implications for integrase inhibitor therapy. Presented at: 14th Conference on Retroviruses & Opportunistic Infections; February 28, 2007; Los Angeles, CA. Abstract 623.
43. Hackett J Jr, Harris B, Holzmayer V, et al. Naturally occurring Polymorphisms in HIV-1 Group M, N and O integrase: implications for Integrase Inhibitors. Presented at: 15th Conference on Retroviruses & Opportunistic Infections; February 4, 2008; Boston, MA. Abstract 872.
44. Leoz M, Depatureaux A, Vessière A, et al. Integrase polymorphism and HIV-1 group O diversity. *AIDS*. 2008;22:1239–1243.
45. Vartanian JP, Meyerhans A, Asjo B, et al. Selection, recombination, and G→A hypermutation of human immunodeficiency virus type 1 genomes. *J Virol*. 1991;65:1779–1788.

3.2) Documento 2 – “*HIV-1 genetic diversity and drug resistance among treatment naïve patients from Southern Brazil: an association of HIV-1 subtypes with exposure categories*”

Autores: Tiago Gräf, Caroline P.B. Passaes, Luis G.E. Ferreira, Edmundo C. Grisard, Mariza G. Morgado, Gonzalo Bello, Aguinaldo R. Pinto

Periódico: Journal of Clinical Virology 51 (2011) 186–191

O presente estudo foi conduzido em colaboração com a Universidade Federal de Santa Catarina e teve como principais objetivos descrever a epidemiologia molecular do HIV-1 em diferentes categorias de exposição em amostras de indivíduos virgens de tratamento coletadas na região metropolitana de Florianópolis - SC, bem como avaliar os níveis de resistência primária nesta população.

Entre 2008 e 2009, 82 amostras foram coletadas de pacientes HIV positivos, virgens de tratamento antirretroviral. Os resultados de epidemiologia molecular demonstram que o subtipo mais frequente é o C (65,8%), seguido dos recombinantes BC (18,3%), subtipo B (13,4%), subtipo F (1,2%) e recombinantes BCF1 (1,2%). Foi observada uma forte associação entre o subtipo C e recombinantes BC e a população heterossexual, e entre o subtipo B e a população de homens que fazem sexo com homens ($p < 0.001$). Os níveis de resistência primária observados foram 11%, sendo 2,4% relacionados aos PI, 5% aos NRTI, 3,6% aos NNRTI e 1,2% aos INTI.

Estes dados indicam um aumento da prevalência de infecções pelo subtipo C no estado de SC e a associação deste subtipo com a transmissão heterossexual, o que está de acordo com os dados epidemiológicos. Além disso, estes resultados indicam níveis de resistência primária aos inibidores de PR/RT em torno de 10%, maior do que a média nacional (6–8%), contudo menor do que descrito para outras cidades brasileiras com alta incidência (18–37%). No que se refere à integrase, foi observado apenas um paciente portando mutações associadas à resistência aos INTI. No entanto essas mutações não podem ser consideradas um caso de transmissão, uma vez que o ano de diagnóstico deste paciente foi 2002, vários anos antes da introdução do raltegravir no Brasil, sendo consideradas substituições raras. Esses resultados reforçam a avaliação dos níveis de resistência primária aos

inibidores de integrase em amostras do subtipo C, encorajando o uso destas drogas antirretrovirais na região Sul do Brasil.



HIV-1 genetic diversity and drug resistance among treatment naïve patients from Southern Brazil: An association of HIV-1 subtypes with exposure categories

Tiago Gräf^a, Caroline P.B. Passaes^b, Luis G.E. Ferreira^c, Edmundo C. Grisard^a, Mariza G. Morgado^b, Gonzalo Bello^b, Aguinaldo R. Pinto^{a,*}

^a Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, 88040-900 Florianópolis, SC, Brazil

^b Laboratório de AIDS e Imunologia Molecular, Instituto Oswaldo Cruz, Av. Brasil, 4365 Manguinhos, 21045-900 Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^c Hospital Regional Homero de Miranda Gomes, Rua Adolfo Donato da Silva, Praia Comprida, 88.103-901 São José, SC, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 January 2011

Received in revised form 13 April 2011

Accepted 25 April 2011

Keywords:

HIV-1

Molecular epidemiology

Drug resistance mutations

Southern Brazil

ABSTRACT

Background: The AIDS epidemic in Southern Brazil has unique features, showing co-circulation of HIV-1 subtypes C, B and recombinant forms. Florianópolis has the second highest AIDS incidence among Brazilian capitals, but limited information is available about HIV molecular epidemiology and prevalence of primary drug resistance.

Objectives: To investigate the molecular epidemiology of HIV-1 in Florianópolis and to describe the prevalence of primary HIV-1 drug resistance mutations (DMRs).

Study design: Epidemiological and clinical data from 82 untreated patients from Florianópolis (2008–2009) were analyzed. The HIV-1 subtype at envelope, protease, reverse transcriptase and integrase regions were determined by phylogenetic and bootscanning analyses and the drug resistance profile were analyzed at the Stanford HIV Drug Resistance Database.

Results: The most frequent HIV-1 genetic form was subtype C (65.8%) followed by mosaics BC (18.3%), subtype B (13.4%), subtype F1 (1.2%) and BCF1 recombinant (1.2%). HIV-1 subtype C and BC recombinants were much more frequent in the heterosexual exposure category, whereas subtype B was more common in the MSM exposure category. DRMs were seen in 11% of the sequences, 2.4% of them were related to PI, 5% to NRTI, 3.6% to NNRTI and 1.2% was related to INTI.

Conclusions: The present study confirms the high prevalence of subtype C and BC recombinants in Santa Catarina State and revealed a significant difference in the subtype distribution among distinct virus exposure categories. This study also shows a relative high prevalence of protease/reverse transcriptase primary drug resistance mutations and corroborates the usefulness of the integrase inhibitors in southern Brazil.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Background

The HIV/AIDS pandemic has a major impact in Brazil, being the most affected Country in Latin America with over 600,000 people infected.¹ The Brazilian HIV-1 epidemic can be divided in two distinct scenarios. While subtype B prevails in most of the Country, with a secondary occurrence of subtype F1 and BF1

recombinants,^{2–9} Southern Brazil presents a distinct pattern with high frequency of subtypes C, B and BC recombinants, following a lower proportion of subtype F1 and BF1 recombinants,^{10–17} comprising 19% of the infected individuals in the Country.

The universal access of Brazilian HIV-positive patients to free-of-cost licensed antiretroviral drugs has substantially reduced the AIDS-related mortality.¹ The effectiveness of antiretroviral therapy, however, may be limited by the increasing of resistance to antiretroviral drugs and by transmission of such drug-resistant viruses to drug-naïve patients. National surveys suggest that primary HIV resistance in Brazil is generally low, ranging from 6% to 8%.^{2,18,19} However, very high prevalence of HIV primary drug resistance (18–37%) were observed in some localities, such as the City of Santos (Southeastern region)^{20,21} and the State of Bahia (North-eastern region),²² indicating important differences across country regions.

Most of the molecular epidemiology studies on HIV in the Southern region were carried out in the State of Rio Grande do Sul, but

Abbreviations: AIDS, acquired immune deficiency syndrome; ARV, antiretroviral; CPR, calibrated population resistance tool; CRF, circulating recombinant form; DRMs, drug resistance mutations; INT, integrase; INTI, integrase inhibitors; HIV, human immunodeficiency virus; MSM, men who have sex with men; NJ, neighbor-joining; NNRTI, non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors; NRTI, nucleoside reverse transcriptase inhibitors; PCR, polymerase chain reaction; PI, protease inhibitors; PR, protease; RT, reverse transcriptase; URF, unique recombinant form.

* Corresponding author. Tel.: +55 48 3721 5206; fax: +55 48 3721 9258.

E-mail address: pintoar@ccb.ufsc.br (A.R. Pinto).

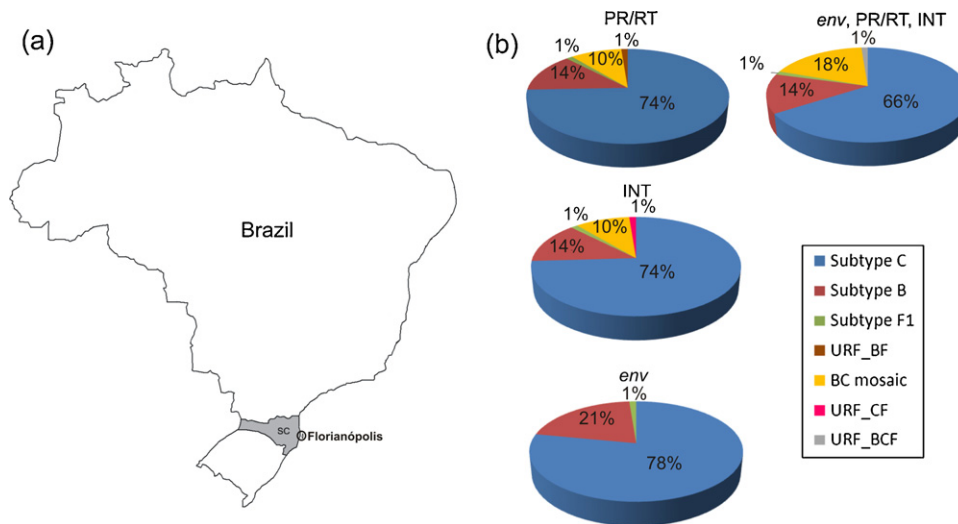


Fig. 1. Geographical location of Florianópolis and frequency of HIV-1 subtypes at the different genomic regions analyzed. (a) Map of Brazil highlighting the state of Santa Catarina (SC) and the metropolitan region of Florianópolis. (b) HIV-1 subtypes were determined by phylogenetic and bootscanning analyses, as described in Section 3.

limited data concerning the prevalence of HIV-1 subtypes and HIV primary drug resistance in the other southern states (Santa Catarina and Paraná) is available. Noteworthy, Santa Catarina State ranks third on AIDS incidence rate in Brazil (29.6 new cases per 100,000 inhabitants in 2008), while its capital, Florianópolis city, occupies the second position in the ranking of capitals (53.7 new cases per 100,000 inhabitants in 2008).¹ Moreover, Florianópolis city is a very important tourist pole in Southern Brazil, receiving people from other South American countries, mainly Argentina and Uruguay, which could have implications on the distribution of HIV subtypes and recombinant forms.

2. Objectives

This study describes the HIV-1 genetic diversity among different exposure categories and the prevalence of HIV primary drug resistance mutations based on sequence analyses of protease, reverse transcriptase, integrase and envelope genes among naïve patients from Florianópolis metropolitan area, Santa Catarina, Brazil.

3. Study design

3.1. Patients

Blood samples were collected from 82 HIV-infected patients followed up at Hospital Homero de Miranda Gomes located in metropolitan region of Florianópolis, Santa Catarina, Brazil. The individuals were selected from May-2008 to February-2009 and inclusion criteria included age over 18-year old, no sign or symptom of AIDS and no previous antiretroviral therapy. The Universidade Federal de Santa Catarina Ethics Committee approved the study and informed consent was obtained from all volunteers.

3.2. Extraction, amplification and sequencing of HIV-1 DNA

PBMC was isolated from 4 ml of blood by the Histopaque (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA) density gradient method and genomic DNA was extracted using a QIAmp Blood Kit (Qiagen Inc., Chatswoth, CA, USA). HIV-1 protease (PR), reverse transcriptase (RT), integrase (INT) and envelope (*env*) genes were

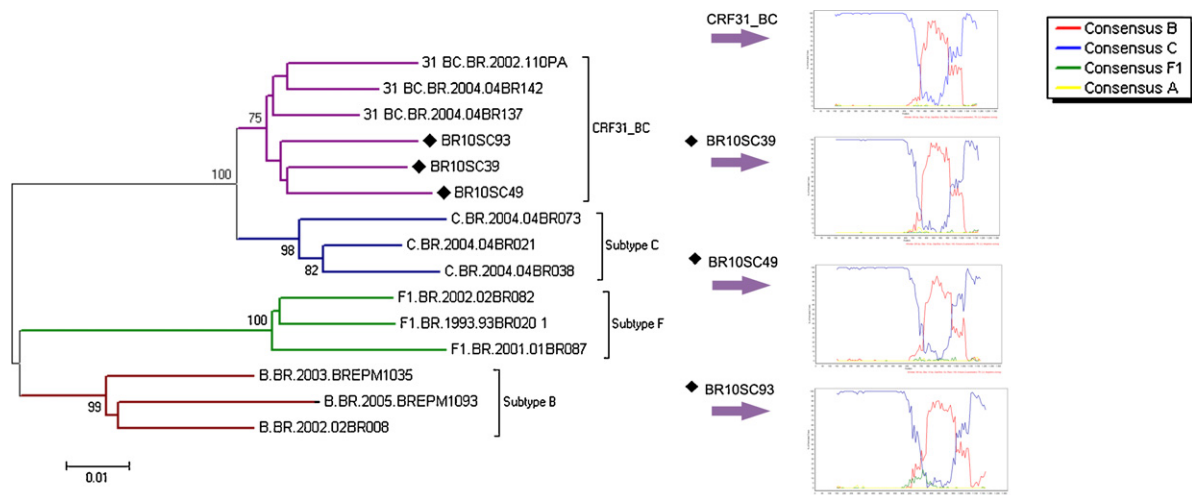


Fig. 2. Phylogenetic analysis of CRF31_BC-like sequences. (a) Neighbor-joining phylogenetic tree of PR/RT region (2316–3316 nt relative to HXB2), including only the CRF31_BC-like sequences from Santa Catarina (black diamonds) and subtype reference sequences. Reliability was tested with 1000 replicates bootstrapped, values considering significant (above 70%) are shown. (b) Bootscanning patterns corresponding to a CRF31_BC reference sequence and the three sequences from Santa Catarina classified as CRF31_BC like. Reference sequences were extracted from HIV Los Alamos Database.

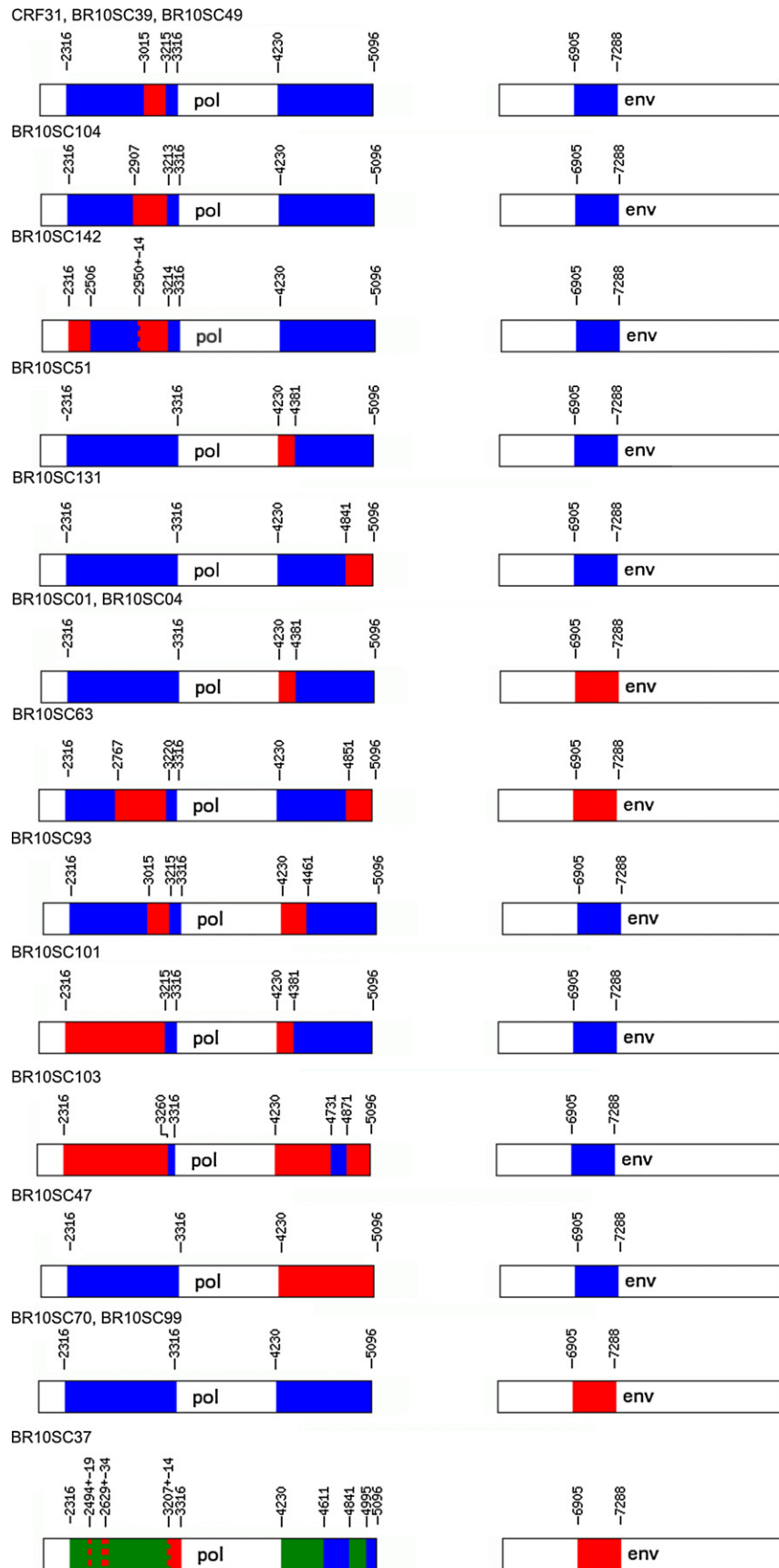


Fig. 3. Schematic drawing showing breakpoint pattern of the mosaics viruses found in the study. Breakpoint positions were obtained using Simplot 3.5.1 and numbered according to HXB2 reference. The *pol* (PR/RT, INT) and *env* (*gp120-C2V3*) genes are colored according to the subtype: subtype B is red, subtype C is blue and subtype F1 is represented in green. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

Table 1
General characteristics of HIV-1 infected individuals according to the HIV-1 subtypes.

| | Total (n=82) | Subtype C (n=54) | Subtype B (n=11) | BC mosaic (n=15) |
|---|--------------|------------------|------------------|------------------|
| Mean age (years) | 37.8 ± 10 | 39 ± 9.2 | 31.3 ± 9.3 | 37 ± 11 |
| Sex (%) | | | | |
| Male | 40 (48.8%) | 23 (43%) | 9 (82%) | 7 (46.7%) |
| Female | 42 (51.2%) | 31 (57%) | 2 (18%) | 8 (53.3%) |
| Mean diagnostic year | 2004 ± 3.8 | 2004 ± 4.3 | 2005 ± 2.1 | 2005 ± 2.7 |
| Exposure categories | | | | |
| Heterosexual | 58 (70.6%) | 41 (76%) | 3 (27.3%) | 12 (80%) |
| MSM | 18 (22%) | 9 (16.5%) | 8 (72.7%) | 1 (6.6%) |
| Injection drug user | 4 (5%) | 3 (5.5%) | – | 1 (6.6%) |
| Unknown | 2 (2.4%) | 1 (2%) | – | 1 (6.6%) |
| Mean CD4 T-cell count | 513 ± 312 | 492 ± 269 | 563 ± 429 | 522 ± 366 |
| Mean viral load (log ₁₀ copies/ml) | 4.1 ± 0.8 | 4.1 ± 0.8 | 4.4 ± 0.9 | 3.9 ± 0.7 |

Values are expressed ± standard deviation of the mean.

amplified by a nested-PCR as described elsewhere.^{23–25} Purified products were sequenced using MegaBace® 1000 DNA Analysis System (GE Healthcare). Sequences were visually inspected and assembled by using SeqMan software, LaserGene package (DNAS-TAR, Madison, WI, USA). Sequences were submitted to GeneBank under accession numbers JF773818–JF774062.

3.3. HIV-1 subtype classification

Nucleotide sequences were aligned by using Clustal X program.²⁶ The two *pol* gene alignments cover almost whole PR and part of RT (nucleotides 2316–3316 relative to HXB2) and whole INT (nucleotides 4230–5096 relative to HXB2), while the *env* gene alignment covers *gp120-C2V3* region (nucleotides 6905–7288 relative to HXB2). Phylogenetic analyses were performed by the Neighbor-Joining (NJ) algorithm using the Tamura-Nei nucleotide substitution model,²⁷ in 1000 bootstrap replicates, as implemented in MEGA v4 program.²⁸ Analysis of recombination was performed by bootscanning analysis (sliding window of 250 bp, incremental steps of 10 bases, and the Kimura two-parameter model²⁹) using Simplot 3.5.1 software.³⁰ Bootstrap support was calculated based on 100 re-samplings.

3.4. Resistance analysis

Drug-resistance mutations (DRMs) profile and antiretroviral (ARV) susceptibility were inferred by submitting the PR/RT sequences to the Calibrated Population Resistance Tool (CPR) (version 5.0 beta; available at <http://cpr.stanford.edu/cpr/Servlet/CPR>) and the INT sequences to the Stanford HIV Resistance Database (<http://hivdb.stanford.edu/>). The CPR program provides a standard

approach to estimating the prevalence of transmitted HIV drug resistance using population-sampled sequence data and disregard natural occurring polymorphisms and mutations occurring in a frequency higher than 0.5% in untreated subjects.^{31,32}

3.5. Statistical analysis

The Chi-squared test was employed to evaluate possible association of HIV-1 subtype with demographic, exposure category and clinical variables. A *p* value <0.05 was considered significant.

4. Results

Out of 82 HIV-1 isolates analyzed at the PR/RT, INT and *env* regions, 54 (65.8%) were classified as subtype C, 15 (18.3%) as B/C inter-subtype recombinants, 11 (13.5%) as subtype B, one (1.2%) as subtype F1 and one (1.2%) as B/C/F mosaic form (Fig. 1). Three (3.6%) BC recombinant sequences displayed a CRF31_BC-like recombination profile at PR/RT and clustered among CRF31_BC reference sequences in the *pol* (PR/RT) NJ tree (Fig. 2). One of these sequences (BR10SC93) displayed one additional B/C recombination point at INT and was classified as a unique recombinant form (URF), as well as the remaining inter-subtype recombinant sequences (Fig. 3).

Table 1 summarizes the demographic characteristics, exposure category, clinical and genetic HIV subtype data of the 82 patients analyzed. Forty (48.8%) patients were males and 42 (51.2%) were females, with a mean age of 37.8 years. The major exposure category was heterosexual (70.6%), followed by men who have sex with men (MSM) (22%) and injection drug users (5%). The herein presented data shows a highly significant association (*p* < 0.001) between exposure category and HIV-1 subtype. Eighty percent of

Table 2
Primary drug resistance mutations associated to protease, reverse transcriptase and integrase genes among treatment naïve patients.

| Sample | <i>Pol</i> subtype | PI resistance mutations | NRTI resistance mutations | NNRTI resistance mutations | INTI resistance mutations | Resistance profile | | |
|-----------|--------------------|-------------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|--------------------|--------------|---------------|
| | | | | | | Low | Intermediate | High |
| BR10SC06 | C | | | | S147R + E138A | RAL, ELV | | |
| BR10SC07 | C | N88D | | | | | NFV | |
| BR10SC29 | B | | K219Q | | | AZT | | |
| BR10SC42 | C | M46I | | | | | NFV | |
| BR10SC46 | B | | V75M | | | DDI | d4T | |
| BR10SC47 | C | | | K101E, V106M, G190A, M230L | | | ETR | DLV, EFV, NVP |
| BR10SC50 | C | | M41L, T215C | | | ABC, DDI, TDF | AZT, d4T | |
| BR10SC107 | C | | M41L | G190A | | AZT, d4T, ETR | EFV | NVP |
| BR10SC131 | C | | | K103N | | | | DLV, EFV, NVP |

PI, protease inhibitors; NRTI, nucleoside reverse transcriptase inhibitors; NNRTI, non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors; INTI, integrase inhibitors; ABC, abacavir; AZT, zidovudine; DDI, didanosine; DLV, delavirdine; d4T, stavudine; EFV, efavirenz; ETR, etravirine; NFV, nelfinavir; NVP, nevirapine; TDF, tenofovir; RAL, raltegravir; ELV, elvitegravir.

BC recombinants (URFs_BC + CRF31_BC-like) and 76% of subtype C sequences were amplified from individuals of the heterosexual exposure category, whereas 73% of subtype B sequences were in MSM exposure category (Table 1). Subtype B sequences represent 44% of viruses circulating in the MSM population, but only 5% of viruses circulating among heterosexual or female populations. No statistically significant differences at CD4 T cell count, RNA viral load or mean age were found among HIV-1 subtypes.

Among 82 HIV-1 *pol* sequences obtained from drug naïve patients, the presence of at least one DRM was observed in 9 (11.0%) patients (Table 2). DRMs to protease inhibitors (PI) were observed in two (2.4%) patients. Polymorphisms and mutations at protease secondary codons were seen in 17 (20.7%) sequences, being L101/V and T74S the most frequently found (data not shown). Mutations related with resistance to nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTI) were observed in four (5%) sequences, and M41L was the most common. DRMs to non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTI) were observed in three (3.6%) of the sequences analyzed, and G190A was the most common. Resistance to integrase inhibitors (INTI) was observed in only one (1.2%) patient who displayed the resistance mutations S147R and E138A, which confer a low-level of resistance to raltegravir and elvitegravir. Minor drug resistance mutations at INT were observed in 11 (13.5%) sequences, being V151I the most frequently found, especially among subtype B samples (data not shown).

One patient showed DRMs to more than one class of antiretroviral drugs. Among the 11 HIV-1 subtype B *pol* sequences, two (18%) displayed DRM, whereas among the 56 HIV-1 subtype C *pol* sequences, eight (14.3%) showed at least one DRM. Nevertheless, that difference was not significant ($p > 0.05$) and no correlation between resistance mutations and HIV-1 subtypes at *pol* was found.

5. Discussion

The present work describes a high prevalence (65.8%) of HIV-1 subtype C in Florianópolis metropolitan area, consistent with two recent studies which described a subtype C prevalence of 64% and 79% in other cities of Santa Catarina State.^{13,16} This confirms the higher prevalence of subtype C in Santa Catarina when compared with other Southern Brazilian states: 20–30% in Paraná^{15,17} and 27–42% in Rio Grande do Sul.^{12,13} The molecular epidemiology scenario of Florianópolis also shows a high frequency (18.3%) of BC recombinants. Two out of 15 BC recombinant sequences identified showed a CRF31_BC-like recombinant pattern at *pol* (PR/RT/INT) and *env* genes, reinforcing that HIV-1 CRF31_BC circulates at low frequency in Santa Catarina, consistent with previous studies.^{13,16} One URF_BC identified herein displayed a CRF31_BC-like pattern at PR/RT, but one additional B/C breakpoint at INT, while others URFs_BC displayed one coincident recombination breakpoint with CRF31_BC at PR/RT, but larger subtype B fragments. These variants may be second generation recombinants originated from recombination between CRF31_BC and subtype B strains, as was recently described in Rio Grande do Sul.²⁵ Although Florianópolis receives a very important number of tourists from Argentina and Uruguay, we found no evidence of circulation of BF recombinant forms commonly observed in those countries (such as CRF12_BF and CRF38_BF)³³, pointing to a minor impact of international tourism on the HIV molecular epidemiology scenario of Florianópolis.

A significant association was observed between HIV-1 subtype and exposure category, suggesting that two independent epidemics are occurring in Santa Catarina. It seems that HIV-1 subtype C broke up the barriers that separate the exposure categories and circulates at high prevalence within both heterosexual (70.7%) and MSM (50%) groups. By contrast, HIV-1 subtype B circulates at high prevalence within MSM group (44.4%), but not within heterosexual

group (5.2%). On the other hand, the high prevalence of URFs_BC reflects frequent episodes of coinfections and/or superinfections in the studied population. The connection between subtypes B and C epidemics seems to be more frequent in heterosexual population, but further investigations with a higher number of MSM patients are necessary to confirm this observation.

Comparison of the HIV-1 *env* gene results from the current work with those obtained in a previous study performed in the same area¹⁴ revealed a significant increase in the proportion of subtype C at heterosexual population from 56% in 2004 to 83% in 2008/2009; while the proportion of *env* subtype B decreases from 38% to only 15% in the same period. This result suggests a faster spread of subtype C than subtype B among heterosexual population over last years in Santa Catarina. These observations may reveal a different efficacy of homosexual/heterosexual transmission of subtypes B and C, or may reflect different entries and dissemination networks of these subtypes in Santa Catarina. The high proportion of subtype B among females in Rio Grande do Sul and Paraná (38–42%),^{12,17} and the recent expansion of subtype C among MSM in São Paulo (Brazil),³⁴ strongly favor the second hypothesis.

Our findings indicate a prevalence of PR/RT primary DRMs (10%) higher than the national average (6–8%),^{2,18,19} although lower than those described in other Brazilian regions (18–37%).^{20–22} Notwithstanding, the prevalence of primary resistance presented herein may be underestimated due mostly selected patients were chronic cases (>12 months since HIV infection), and HIV tends to return to wild type over time without ARV selective pressure as DRMs reduce the viral fitness.³⁵ We also observed one patient with low-level resistance to INTI. Such resistance mutations, however, should not be considered a case of transmitted resistance since the diagnostic date of that patient was 2002, several years before the introduction of Raltegravir in Brazil (2009). Those mutations probably reflect rare substitutions in the integrase gene as described elsewhere.^{36–38} These results encourage the use of this new drug in the treatment of AIDS patients in Southern Brazil.

In conclusion, our study indicates an increase of HIV-1 subtype C prevalence in the metropolitan area of Florianópolis with a significantly association between virus subtypes and exposure categories. The Southern region shows the highest incidence of HIV-1 infections in the country, which combined with the increasing contribution of HIV-1 infections among heterosexuals, might explain the expansion of subtype C in the Brazilian epidemic. This combination makes southern Brazil an interesting site for development of health innovations and vaccine trials.³⁹ The presented work also describes a prevalence of DRMs above the national average, pointing to the importance of sustained surveillance studies in this region.

Conflict of interest

Authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments

The authors are grateful to the Medical Staff for support during recruitment, to Patrícia H. Stoco and Aline D. Schlindwein for helping with sequencing, and to Fundação de Apoio à Pesquisa Científica e Tecnológica do Estado de Santa Catarina (FAPESC) for financial support.

References

1. *Boletim epidemiológico, AIDS & DST*. Brasil: Ministério da Saúde; 2010.
2. Couto-Fernandez JC, Morgado MG, Bongertz V, Tanuri A, Andrade T, Brites C, et al. HIV-1 subtyping in Salvador, Bahia, Brazil: a city with African sociodemographic characteristics. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1999;22(3):288–93.

3. Bongertz V, Bou-Habib DC, Brigido LF, Caseiro M, Chequer PJ, Couto-Fernandez JC, et al. HIV-1 diversity in Brazil: genetic, biologic, and immunologic characterization of HIV-1 strains in three potential HIV vaccine evaluation sites. Brazilian Network for HIV isolation and characterization. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2000;**23**(2):184–93.
4. Brindeiro RM, Diaz RS, Sabino EC, Morgado MG, Pires IL, Brigido L, et al. Brazilian Network for HIV Drug Resistance Surveillance (HIV-BResNet): a survey of chronically infected individuals. *AIDS* 2003;**17**(7):1063–9.
5. Gadelha SR, Shindo N, Cruz JN, Morgado MG, Galvao-Castro B. Molecular epidemiology of human immunodeficiency virus-1 in the state of Ceara, Northeast, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2003;**98**(4):461–3.
6. Cabral VP, Cunha CB, Magalhaes EF, Pinto-Neto LF, Couto-Fernandez JC, Dietze R, et al. Human immunodeficiency virus type-1 subtypes of infected patients in Espirito Santo, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006;**101**(8):881–5.
7. Veras NM, Veras VS, Ramalho ED, Kyaw C, Silva RR, Brigido MM, et al. HIV type 1 genetic variability in central Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2007;**23**(12):1481–90.
8. Cardoso LP, Queiroz BB, Stefani MM. HIV-1 pol phylogenetic diversity and antiretroviral resistance mutations in treatment naive patients from Central West Brazil. *J Clin Virol* 2009;**46**(2):134–9.
9. Machado LF, Ishak MO, Vallinoto AC, Lemos JA, Azevedo VN, Moreira MR, et al. Molecular epidemiology of HIV type 1 in northern Brazil: identification of subtypes C and D and the introduction of CRF02_AG in the Amazon region of Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2009;**25**(10):961–6.
10. Soares EA, Santos RP, Pellegrini JA, Sprinz E, Tanuri A, Soares MA. Epidemiologic and molecular characterization of human immunodeficiency virus type 1 in southern Brazil. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2003;**34**(5):520–6.
11. Rodrigues R, Scherer LC, Oliveira CM, Franco HM, Spherhacker RD, Ferreira JL, et al. Low prevalence of primary antiretroviral resistance mutations and predominance of HIV-1 clade C at polymerase gene in newly diagnosed individuals from south Brazil. *Virus Res* 2006;**116**(1–2):201–7.
12. Santos AF, Schrago CG, Martinez AM, Mendoza-Sassi R, Silveira J, Sousa TM, et al. Epidemiologic and evolutionary trends of HIV-1 CRF31_BC-related strains in southern Brazil. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2007;**45**(3):328–33.
13. Brigido LF, Nunes CC, Oliveira CM, Knoll RK, Ferreira JL, Freitas CA, et al. HIV type 1 subtype C and CRF31_BC recombinants prevail at the cities with the highest AIDS prevalence rate in Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2007;**23**(12):1579–86.
14. Locatelli D, Stoco PH, de Queiroz AT, Alcantara LC, Ferreira LG, Zanetti CR, et al. Molecular epidemiology of HIV-1 in Santa Catarina State confirms increases of subtype C in Southern Brazil. *J Med Virol* 2007;**79**(10):1455–63.
15. Ferreira JL, Thomaz M, Rodrigues R, Harrad D, Oliveira CM, Oliveira CA, et al. Molecular characterisation of newly identified HIV-1 infections in Curitiba, Brazil: preponderance of clade C among males with recent infections. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2008;**103**(8):800–8.
16. Rodrigues R, Manenti S, Romao PR, de Paula Ferreira JL, Batista JP, Siqueira AF, et al. Young pregnant women living with HIV/AIDS in Criciúma, Southern Brazil, are infected almost exclusively with HIV type 1 clade C. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2010;**26**(3):351–7.
17. Toledo PV, de Carvalho DS, de Rossi SG, Brindeiro R, de Queiroz-Telles F. Genetic diversity of human immunodeficiency virus-1 isolates in Parana, Brazil. *Braz J Infect Dis* 2010;**14**(3):230–6.
18. Inocencio LA, Pereira AA, Supicira MC, Fernandez JC, Jorge CP, Souza DF, et al. Brazilian Network for HIV Drug Resistance Surveillance: a survey of individuals recently diagnosed with HIV. *J Int AIDS Soc* 2009;**12**(1):20.
19. Sprinz E, Netto EM, Patelli M, Lima JS, Furtado JJ, da Eira M, et al. Primary antiretroviral drug resistance among HIV type 1-infected individuals in Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2009;**25**(9):861–7.
20. Supicira MC, Caseiro MM, Alves K, Tescarollo G, Janini LM, Sabino EC, et al. High levels of primary antiretroviral resistance genotypic mutations and B/F recombinants in Santos, Brazil. *AIDS Patient Care STDS* 2007;**21**(2):116–28.
21. de Sa-Filho DJ, Ambar RF, Duarte NB, Matias RB, Candido V, Gagliani LH, et al. HIV type 1 diversity from newly diagnosed patients in Santos metropolitan area/Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2009;**25**(9):925–9.
22. Pedroso C, Queiroz AT, Alcantara LC, Drexler JF, Diaz RS, Weyll N, et al. High prevalence of primary antiretroviral resistance among HIV-1-infected adults and children in Bahia, a northeast state of Brazil. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2007;**45**(2):251–3.
23. Delwart EL, Herring B, Rodrigo AG, Mullins JL. Genetic subtyping of human immunodeficiency virus using a heteroduplex mobility assay. *PCR Methods Appl* 1995;**4**(5):S202–16.
24. Bello G, Passaes CP, Guimaraes ML, Lorete RS, Matos Almeida SE, Medeiros RM, et al. Origin and evolutionary history of HIV-1 subtype C in Brazil. *AIDS* 2008;**22**(15):1993–2000.
25. Passaes CP, Bello G, Lorete RS, Matos Almeida SE, Junqueira DM, Veloso VG, et al. Genetic characterization of HIV-1 BC recombinants and evolutionary history of the CRF31_BC in Southern Brazil. *Infect Genet Evol* 2009;**9**(4):474–82.
26. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 1994;**22**(22):4673–80.
27. Tamura K, Nei M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol Biol Evol* 1993;**10**(3):512–26.
28. Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 2007;**24**(8):1596–9.
29. Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* 1980;**16**(2):111–20.
30. Lole KS, Bollinger RC, Paranjape RS, Gadkari D, Kulkarni SS, Novak NG, et al. Full-length human immunodeficiency virus type 1 genomes from subtype C-infected seroconverters in India, with evidence of intersubtype recombination. *J Virol* 1999;**73**(1):152–60.
31. Bennett DE, Camacho RJ, Otelea D, Kuritzkes DR, Fleury H, Kiuchi M, et al. Drug resistance mutations for surveillance of transmitted HIV-1 drug-resistance: 2009 update. *PLoS One* 2009;**4**(3):e4724.
32. Shafer RW, Rhee SY, Pillay D, Miller V, Sandstrom P, Schapiro JM, et al. HIV-1 protease and reverse transcriptase mutations for drug resistance surveillance. *AIDS* 2007;**21**(2):215–23.
33. Bello G, Aulicino PC, Ruchansky D, Guimarães ML, Lopez-Galindez C, Casado C, et al. Phylodynamics of HIV-1 circulating recombinant forms 12_BF and 38_BF in Argentina and Uruguay. *Retrovirology* 2010;**22**(3):7–22.
34. Brigido LF, Ferreira JL, Almeida VC, Rocha SQ, Ragazzo TG, Estevam DL, et al. Type 1 C expansion into the State of São Paulo, Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2010;**26**(00):1–6.
35. Payne BA, Nsutebu EF, Hunter ER, Olarinde O, Collini P, Dunbar JA, et al. Low prevalence of transmitted antiretroviral drug resistance in a large UK HIV-1 cohort. *J Antimicrob Chemother* 2008;**62**(3):464–8.
36. Lataillade M, Chiarella J, Kozal MJ. Natural polymorphism of the HIV-1 integrase gene and mutations associated with integrase inhibitor resistance. *Antivir Ther* 2007;**12**(4):563–70.
37. Rhee SY, Liu TF, Kiuchi M, Zion R, Gifford RJ, Holmes SP, et al. Natural variation of HIV-1 group M integrase: implications for a new class of antiretroviral inhibitors. *Retrovirology* 2008;**5**(8):74.
38. Ceccherini-Silberstein F, Malet I, Fabeni L, Dimonte S, Svicher V, D'Arrigo R, et al. Specific HIV-1 integrase polymorphisms change their prevalence in untreated versus antiretroviral-treated HIV-1-infected patients, all naive to integrase inhibitors. *J Antimicrob Chemother* 2010;**65**(11):2305–18.
39. Ersching J, Pinto AR. HIV-1 vaccine clinical trials: the Brazilian experience. *Rev Med Virol* 2009;**19**(5):301–11.

3.3) Documento 3 - “*Monitoring the emergence of resistance mutations in patients under salvage therapy with raltegravir in Rio de Janeiro, Brazil: a follow-up study*”

Autores: Caroline Pereira Bittencourt Passaes, Monick Lindenmeyer Guimarães, Sandra Wagner Cardoso, José Henrique Pilotto, Valdilea Veloso, Beatriz Grinsztejn, Mariza Gonçalves Morgado.

Periódico: submetido ao Journal of Medical Virology

Com a aprovação do uso do raltegravir na terapia de resgate no Brasil e a permissão para a troca de enfuvirtida (T20) por raltegravir em pacientes com supressão virológica, iniciamos o acompanhamento de 19 pacientes multi-experimentados em uso de esquemas antirretrovirais contendo RAL, a fim de monitorar os benefícios advindos da terapia com esta nova classe de antirretrovirais e o desenvolvimento de resistência a esta nova classe de antirretrovirais.

Neste trabalho, dois grupos de pacientes foram analisados: aqueles que fizeram a troca de T20 por raltegravir (Grupo 1, n=9) e aqueles que estavam em uso de raltegravir na terapia de resgate (Grupo 2, n=10). A cada visita foram realizadas contagens de células T CD4+ e carga viral. A genotipagem da PR, RT e IN foram realizadas no *baseline* e no momento em que foi detectada a falha virológica.

As contagens de células T CD4+ aumentaram em ambos os grupos seis e doze meses após o início da terapia com raltegravir. A carga viral se manteve abaixo do limite de detecção no Grupo 1 e diminuiu significativamente após o início da terapia com RAL para o Grupo 2. Três dentre os 10 pacientes do Grupo 2 apresentaram falha virológica. As mutações Q148H e G140S foram observadas em dois destes pacientes, enquanto que no terceiro paciente não observamos mutações de resistência na integrase.

Até o presente momento, este é o primeiro estudo descrevendo o acompanhamento de pacientes em terapia com raltegravir no Brasil, mostrando a segurança da troca de T20, o incremento nas contagens de células T CD4+ e supressão da carga viral nesses pacientes, além de descrever os primeiros casos de resistência ao raltegravir no país.



Monitoring the emergence of resistance mutations in patients under salvage therapy with raltegravir in Rio de Janeiro, Brazil: a follow-up study

| | |
|-------------------------------|--|
| Journal: | <i>Journal of Medical Virology</i> |
| Manuscript ID: | Draft |
| Wiley - Manuscript type: | Research Article |
| Date Submitted by the Author: | n/a |
| Complete List of Authors: | <p>Passaes, Caroline; Fundação Oswaldo Cruz, Laboratório de AIDS e Imunologia Molecular</p> <p>Guimarães, Monick; Fundação Oswaldo Cruz, Laboratório de AIDS e Imunologia Molecular</p> <p>Cardoso, Sandra; Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas</p> <p>Pilotto, José Henrique; Fundação Oswaldo Cruz, Laboratório de AIDS e Imunologia Molecular; Hospital Geral de Nova Iguaçu,</p> <p>Veloso, Valdilea; Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas</p> <p>Grinsztejn, Beatriz; Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas</p> <p>Morgado, Mariza; Fundação Oswaldo Cruz, Laboratório de AIDS e Imunologia Molecular; Oswaldo Cruz Foundation, Immunology</p> |
| Keywords: | HIV-1 resistance mutations, integrase inhibitors, raltegravir, enfuvirtide switches, Brazil |
| | |

SCHOLARONE™
Manuscripts

1
2
3
4 **1 Monitoring the emergence of resistance mutations in patients under salvage therapy**
5
6 **2 with raltegravir in Rio de Janeiro, Brazil: a follow-up study**
7
8
9

10
11 4 Running Title: A follow-up of Brazilian patients under salvage therapy with raltegravir
12
13

14
15 6 Caroline Pereira Bittencourt Passaes¹ MSc; Monick Lindenmeyer Guimarães¹ PhD; Sandra
16
17 7 Wagner Cardoso² MD; José Henrique Pilotto^{1,3} MD, PhD; Valdilea Veloso² MD, PhD;
18
19 8 Beatriz Grinsztejn² MD, PhD; Mariza Gonçalves Morgado¹ PhD.
20
21

22
23
24 10 ¹ Laboratório de AIDS e Imunologia Molecular, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de
25
26 11 Janeiro, Brazil;

27
28 12 ² Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (IPEC), FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil;

29
30 13 ³ Hospital Geral de Nova Iguaçu (HGNI), Rio de Janeiro, Brazil.
31
32

33
34
35 15 Corresponding author: Caroline Pereira Bittencourt Passaes

36
37 16 Address: Laboratório de AIDS e Imunologia Molecular, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ.

38
39 17 Av. Brasil 4365, Leonidas Deane Building, room 413 - Rio de Janeiro, Brazil. 21040-900

40
41 18 E-mail: cpassaes@ioc.fiocruz.br

42
43 19 Telephone number: 55-21-38658106 / Fax number: 55-21-38658173
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4 21 **Abstract:**
5

6 22 The present study describes the pattern of emerging raltegravir resistance in a series of
7
8 23 patients with HIV/AIDS using a raltegravir-containing HAART regimen for salvage therapy
9
10 24 in Brazil. Prospective, observational cohort of 19 multidrug-experienced patients from Rio de
11
12 25 Janeiro, Brazil taking a HAART regimen containing raltegravir, and under follow up since
13
14 26 2009. Two groups of patients were analyzed: switch from T20 to RAL (Group 1, n=9) and
15
16 27 salvage therapy containing RAL (Group 2, n=10). Blood samples were drawn for CD4+ T-
17
18 28 cell counts and HIV-1 viral load during all scheduled follow-up visits. Protease, reverse
19
20 29 transcriptase and integrase genotyping were performed at baseline and at the time of
21
22 30 virological failure. CD4+ T-cell increased at 6 and 12 months in both groups; HIV-1 VL was
23
24 31 sustained suppressed for Group 1, and for the Group 2 it significantly decreased after starting
25
26 32 a RAL-containing regimen. Three out of ten patients from Group 2 could not suppress HIV-1
27
28 33 VL. The mutations Q148H and G140S were observed for two patients and for the third patient
29
30 34 only mutations to PR/RT inhibitors were detected. The present study describes for the first
31
32 35 time in Brazil, the close follow-up of a series of patients using a raltegravir-containing
33
34 36 HAART, showing the safety of enfuvirtide switch to RAL and the effectiveness of a
35
36 37 therapeutic regimen with RAL in promoting immune reconstitution and suppressing HIV
37
38 38 replication, besides documenting the occurrence of resistance to integrase inhibitors in the
39
40 39 country.
41
42 40

43
44
45
46
47
48 41 **Key words:** HIV-1, integrase inhibitors, raltegravir, resistance mutations, enfuvirtide
49
50 42 switches, Brazil.
51
52 43
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4 44 **Introduction:**

5
6 45 The integration process is an essential step for the HIV replication cycle. The integrase
7
8 46 is the enzyme responsible for catalyzing this reaction and it also affects retrotranscription and
9
10 47 assembly [Chiu and Davies, 2004; Dobard et al., 2007; Wilkinson et al., 2009; Wu et al.,
11
12 48 1999; Zhu et al., 2004]. In this context, the integrase is an important target for antiretroviral
13
14 49 therapy. Raltegravir (Isentress®) is the first integrase inhibitor approved by the FDA (October
15
16 50 2007) and used as part of salvage therapy regimens in heavily drug-experienced
17
18 51 patients[2007a; 2007b; Cahn and Sued, 2007] as well as for ARV naïve patients[Gandhi et al.,
19
20 52 2010]. Results from clinical trials have shown that raltegravir is a potent inhibitor of HIV
21
22 53 replication, leading to a rapid decay in HIV-1 viral load and, in consequence, to undetectable
23
24 54 levels in few weeks[Cooper et al., 2008; Grinsztejn et al., 2007; Markowitz et al., 2006;
25
26 55 Steigbigel et al., 2008; Steigbigel et al., 2010].
27
28
29

30 56 Raltegravir was originally approved to be used in salvage regimens in patients infected
31
32 57 with multidrug-resistant virus who have few remaining treatment options. However, due to its
33
34 58 excellent antiviral activity, good pharmacokinetics and tolerability, raltegravir has also been
35
36 59 considered to be used as a component of first-line therapy and in switch-therapy
37
38 60 approaches[2009; De Castro et al., 2009; Grant et al., 2009; Lennox et al., 2010; Lennox et
39
40 61 al., 2009; Markowitz et al., 2009; Santos et al., 2009; Talbot et al., 2009]. Recently published
41
42 62 data has shown conflicting results in regards of the raltegravir activity on the suppression of
43
44 63 HIV residual replication in intensification studies[Buzon et al., 2010; Gandhi et al., 2010].
45
46
47

48 64 In spite of the powerful capacity of raltegravir to suppress HIV-1 replication, it hasn't
49
50 65 a high genetic barrier, therefore, allowing for the appearance of resistance mutations rapidly
51
52 66 after the virological failure[Baldanti et al., 2010; Caby et al., 2010; Tommasi et al., 2010].
53
54 67 The dynamics of the emergence of resistance mutations during treatment with raltegravir has
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4 68 been largely demonstrated. Three main resistance pathways have been described presenting
5
6 69 the major resistance mutations N155H, Q148H/K/R, and Y143R/C. Moreover, secondary
7
8 70 mutations such as L74M, E92Q, Q95K, T97A, E138A/K, G140S/A, Y143H, V151I and
9
10 71 G163R emerge to compensate the loss of viral fitness[Charpentier et al., 2008; Cooper et al.,
11
12 72 2008; Delelis et al., 2009; Delelis et al., 2010; Ferns et al., 2009; Fransen et al., 2009; Fun et
13
14 73 al., 2010; Hatano et al., 2010; Malet et al., 2009; Malet et al., 2008; Quercia et al., 2009;
15
16 74 Reigadas et al., 2010].

17
18
19 75 In Brazil, raltegravir (RAL) was approved in 2009 for salvage therapy and
20
21 76 subsequently incorporated in the Brazilian ARV Guidelines to be used for those patients with
22
23 77 previous use of PIs, NRTIs and NNRTIs. In a previous study we analyzed Brazilian samples
24
25 78 of subtypes B, C and F and no major primary resistance mutations for the integrase inhibitors
26
27 79 were found[Passaes et al., 2009a], which provided encouraging results to support the
28
29 80 introduction of integrase inhibitors in Brazil. Moreover, raltegravir can be used as a substitute
30
31 81 for enfuvirtide for those patients using enfuvirtide and have an undetectable viral load
32
33 82 (switch).

34
35
36
37 83 In the present study we assessed the clinical, virological and immunological outcomes,
38
39 84 as well as the emergence of integrase resistance mutations in a prospective, observational
40
41 85 cohort of AIDS patients, receiving a raltegravir containing regimen.
42
43

44 86

45
46 87
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60**88 Methods:****89 Patients**

90 A prospective, observational cohort of HAART-experienced patients has been
91 followed-up at the Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (IPEC) (n=08) and at the
92 Hospital Geral de Nova Iguaçu (HGNI) (n=11), Rio de Janeiro, Brazil, since 2009.

93 Participants were eligible for inclusion in the study if a switch from T20 to RAL was
94 indicated (Group 1, n=9) and if they were starting RAL use for salvage therapy (Group 2,
95 n=10). Most of these patients had more than 5 years of HIV-1 infection and had already used
96 at least three classes of antiretrovirals (ARV) during this period. These patients have been
97 under follow-up for a minimum of 6 months after starting a raltegravir-containing regimen.
98 Blood samples were drawn for CD4+ T-cell counts and HIV-1 viral load (VL) measurement
99 at each visit during the study follow up period. Protease, reverse transcriptase and integrase
100 genotyping were performed at baseline and at the time of virological failure. Moreover, gp41
101 genotyping was performed for patients under an enfurvirtide-containing regimen. This study
102 was approved by the IPEC and the HGNI Ethical Research Committees and all patients have
103 provided written informed consent.

104 Methods

106 CD4+ T-cells were measured by flow cytometry (FACS Calibur, BD) and HIV-1 viral
107 load was determined using the bDNA method (Versant HIV-qRNA3.0 Assay, Bayer).
108 Genomic RNA was extracted from plasma samples using a RNA extraction column kit
109 (QIAamp Viral RNA Mini Kit; QIAGEN, Valencia, CA) and the reverse transcription
110 reaction was performed using the SuperScriptIII enzyme and a random primer protocol. HIV-
111 1 protease, reverse transcriptase and integrase regions were genotyped using an in-house

1
2
3
4 112 amplification and sequencing methodology, as previously described[Passaes et al., 2009b].
5
6 113 HIV-1 gp41 was amplified by a nested PCR using MM5 (5'-
7
8 114 TGARRGACAATTGGAGAAGTG-3') and NEF06AS (5'-
9
10 115 ATTGGTCTTAAAGGYACCTG-3') for the first round of amplification and SCDOS (5'-
11
12 116 TTGAACCATTAGGAGTAGCACCCAC-3') and NEF05AS (5'-
13
14 117 TCTYGAGAYRCTGCTCC-3') for the second round. Subtype determination was inferred
15
16 118 based on phylogenetic analysis (Neighbor Joining with Tamura-Nei correction, as available in
17
18 119 the Mega 5.04 software). Sequences were submitted to the Stanford Database
19
20 120 (<http://hivdb.stanford.edu>) in order to estimate the resistance level to the antiretroviral drugs.
21
22 121 The IAS mutations list was used for gp41 resistance analysis.
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

122

123 *Statistics*

124 P values were calculated by Mann-Whitney and Friedman tests using the Graph Pad
125 Prism software. P values were considered statistically significant at 5% (p=0.05).

126

127

1
2
3
4 128 **Results:**

5
6 129 A total of 19 patients receiving a raltegravir containing HAART regimen were
7
8 130 analyzed. They were divided in two groups: those who received raltegravir as part of a switch
9
10 131 strategy (Group 1, n=9), and those who received raltegravir as part of a new HAART regimen
11
12 132 for salvage therapy (Group 2, n=10), as described in Table 1.

13
14
15 133 CD4+ T-cell counts and HIV-1 VL values were analyzed at baseline, 6 and 12 months
16
17 134 after RAL-containing therapy was initiated. For Group 1, median CD4+ T-cell was 305 (IQR:
18
19 135 237-534.5), 338 (IQR: 169.5-779.3) and 577 (IQR: 239.8-1260) at baseline, 6 months and 12
20
21 136 months, respectively. For Group 2 these values were 100.5 (IQR: 32.5-269.3), 225 (IQR:
22
23 137 103.3-447.8) and 249 (IQR: 119-457.8) respectively. In both groups, CD4+ T-cell increased
24
25 138 at 6 and 12 months (Figure 1a).

26
27
28 139 Group 1 participants presented a sustained virological suppression after T20
29
30 140 substitution for RAL, with HIV-1 VL values below the lower limit of detection during all
31
32 141 follow-up visits. For Group 2, HIV-1 VL significantly decreased after starting a RAL-
33
34 142 containing regimen ($p<0.0001$). Nine out of 10 patients achieved VL below the limit of
35
36 143 detection after a mean of 3.7 months, and it was sustained at six and 12-month visits (Figure
37
38 144 1b). However, three out of ten patients from this group could not suppress HIV-1 VL during
39
40 145 the period of follow-up, suggesting the occurrence of virological failure during this period.
41
42 146 Two patients (RIIn017 and RIIn018), had complete viral load suppression during the first
43
44 147 months of observation, followed by a rebound. For the other patient (RIIn016), a complete
45
46 148 suppression was not achieved after initiating the RAL-regimen. The median time between
47
48 149 raltegravir initiation and virological failure for these three patients was seven months (IQR:
49
50 150 4-8 months) and the median time of follow-up for our cohort was 15 months (IQR: 10-21
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4 151 months). After virologic failure, no subsequent VL suppression was observed, as illustrated in
5
6 152 Figure 2.
7

8
9 153 The mutational profile of these patients was analyzed at baseline and at virological
10
11 154 failure. At baseline, all patients showed resistance to protease, nucleoside and non-nucleoside
12
13 155 reverse transcriptase inhibitors, but not to the integrase (Table 2) or to the fusion inhibitors
14
15 156 (patient RIIIn016, data not shown). The mutations for protease and reverse transcriptase
16
17 157 inhibitors persisted during the follow-up period. Mutations to integrase inhibitors emerged for
18
19 158 two patients after four and seven months of exposure to raltegravir (Figure 2). The Q148H
20
21 159 and G140S mutations were observed for these two patients, conferring high level of resistance
22
23
24 160 to RAL. Moreover, HIV-1 viral load levels had surpassed the values observed at baseline.
25

26 161

27
28 162
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4 163 **Discussion:**

5
6 164 Raltegravir was approved to be used in salvage therapy in Brazil in 2009 and access to
7
8 165 raltegravir has been restricted to those patients presenting with on therapeutic failure and
9
10 166 triple-class resistance and also for switch therapy for well suppressed patients taking
11
12 167 enfuvirtide. In order to achieve a better understanding of the effectiveness and safety profile
13
14 168 of raltegravir in the clinical setting, we evaluated a cohort of multiple-experienced HIV-1
15
16 169 patients treated in Rio de Janeiro with raltegravir and optimized background therapy (OBT).

17
18
19 170 In the present study we followed up 19 HIV-1 infected patients using a HAART
20
21 171 regimen containing RAL and receiving care at one of the two urban outpatients clinics in
22
23 172 the Rio de Janeiro . Nine out of 19 patients switched from T20 to RAL and all of them
24
25 173 presented higher CD4+ T-cell levels and had sustained viral suppression during the follow up
26
27 174 period. These findings are in agreement with previous studies, which showed that switching
28
29 175 from enfuvirtide to raltegravir in patients with undetectable HIV-1 viral load levels seems to
30
31 176 be safe[De Castro et al., 2009; Grant et al., 2009; Santos et al., 2009; Talbot et al., 2009]. In
32
33 177 Brazil, since 2010, the Ministry of Health approved enfuvirtide switches to raltegravir in
34
35 178 virologically suppressed patients but, to date, there is no data regarding the effectiveness of
36
37 179 this strategy. In this context, our study might bring knowledge for a safer clinical management
38
39 180 of this new class of drug for multidrug-experienced patients in the country.

40
41
42 181 Conversely, in the group of patients on a failing HAART regimen, three out of ten did
43
44 182 not obtain a virological response to the new RAL-containing regimen. Raltegravir failure is
45
46 183 currently associated with three mutational pathways, being the substitutions at positions 148
47
48 184 and 155 the most common. In the present study, all the samples that have been analyzed,
49
50 185 displayed mutations at positions 148 and 140, occasionally followed by the secondary
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4 186 mutation S230N, conferring high level of raltegravir resistance . Virologic failure was
5
6 187 observed for 3 patients from Group 2 and was due to resistance and insufficient adherence.
7

8
9 188 In general, the addition of a new antiretroviral drug, such as raltegravir, to an
10
11 189 optimized regimen, has changed the scenario of antiretroviral treatment. Despite the cases of
12
13 190 virologic failure observed in the present study, most patients who had detectable HIV-1 viral
14
15 191 load levels at the baseline presented a complete virological suppression after starting therapy
16
17 192 with RAL. For these patients, the increase of CD4⁺ T-cells at the 12 month-visit was
18
19 193 statistically significant in comparison to baseline values, showing the effectiveness of a RAL
20
21 194 containing regimen in promoting immune reconstitution, mainly in the group that switched
22
23 195 from T20 to RAL. Moreover, HIV-1 viral load significantly decreased to undetectable levels
24
25 196 after starting RAL, confirming the powerful capacity of this new drug class in suppressing
26
27 197 HIV-1 viremia, even in multidrug-experienced patients, consequently reducing morbidity and
28
29 198 mortality, and also increasing life expectancy.
30
31

32
33 199 Our study describes for the first time in Brazil, the close follow-up of a series of
34
35 200 patients under HAART, taking a RAL-containing regimen, besides documenting the
36
37 201 occurrence of resistance to integrase inhibitors in the country.
38

39
40 202 One of the strengths of our study is that it is a cohort that includes prospectively
41
42 203 collected data. Patients were enrolled and followed at the same health care facility at each site,
43
44 204 where they received primary HIV 1 care, and it is unlikely that any important clinical,
45
46 205 virological and immunological events were missed among those patients. However, our study
47
48 206 is limited by the small sample size and relatively short follow-up time.
49

50
51 207 Since the first cases of transmitted resistance to integrase inhibitors have been recently
52
53 208 described[Boyd et al., 2011; Young et al., 2011], more attention has been addressed to the use
54
55 209 of this new class of antiretroviral in multidrug-experienced patients.
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

210 In summary, our results highlight the importance of the close monitoring of patients
211 taking HAART, under a RAL-containing regimen, in order to guarantee good clinical,
212 virological and immunological outcomes in the short and long-term.
213

For Peer Review

1
2
3
4 214 **Acknowledgments:**
5

6 215 We wish to thank Dr. Gonzalo Bello for the helpful discussions and critical
7
8 216 suggestions. We also thank BSc Priscilla Guimarães, BSc Giselle Borges and Isabel Monteiro
9
10 217 for the laboratorial support at FIOCRUZ and Goldman Pereira for the administrative support
11
12 218 at HGNI.
13

14
15 219

16
17 220 **Funding:**
18

19 221 This study was supported by PAPES V - FIOCRUZ/CNPq and POM FIOCRUZ
20
21 222 grants.
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

223 **References**

- 224 2007a. Approval recommended for raltegravir in experienced patients. *AIDS Patient Care*
225 *STDS* 21(9):702.
- 226 2007b. FDA approves raltegravir tablets. *AIDS Patient Care STDS* 21(11):889.
- 227 2009. FDA notifications. FDA approves raltegravir for HIV-1 treatment-naive patients. *AIDS*
228 *Alert* 24(9):106-107.
- 229 Baldanti F, Paolucci S, Gulminetti R, Brandolini M, Barbarini G, Maserati R. 2010. Early
230 emergence of raltegravir resistance mutations in patients receiving HAART salvage
231 regimens. *J Med Virol* 82(1):116-122.
- 232 Boyd SD, Maldarelli F, Sereti I, Ouedraogo GL, Rehm CA, Boltz V, Shoemaker D, Pau AK.
233 2011. Transmitted raltegravir resistance in an HIV-1 CRF_AG-infected patient.
234 *Antivir Ther* 16(2):257-261.
- 235 Buzon MJ, Massanella M, Llibre JM, Esteve A, Dahl V, Puertas MC, Gatell JM, Domingo P,
236 Paredes R, Sharkey M, Palmer S, Stevenson M, Clotet B, Blanco J, Martinez-Picado J.
237 2010. HIV-1 replication and immune dynamics are affected by raltegravir
238 intensification of HAART-suppressed subjects. *Nat Med* 16(4):460-465.
- 239 Caby F, Valin N, Marcelin AG, Schneider L, Andrade R, Guiguet M, Tubiana R, Canestri A,
240 Valantin MA, Peytavin G, Pacanowski J, Morand-Joubert L, Calvez V, Girard PM,
241 Katlama C. 2010. Raltegravir as functional monotherapy leads to virological failure
242 and drug resistance in highly treatment-experienced HIV-infected patients. *Scand J*
243 *Infect Dis* 42(6-7):527-532.
- 244 Cahn P, Sued O. 2007. Raltegravir: a new antiretroviral class for salvage therapy. *Lancet*
245 369(9569):1235-1236.
- 246 Charpentier C, Karmochkine M, Laureillard D, Tisserand P, Belec L, Weiss L, Si-Mohamed
247 A, Piketty C. 2008. Drug resistance profiles for the HIV integrase gene in patients
248 failing raltegravir salvage therapy. *HIV Med* 9(9):765-770.
- 249 Chiu TK, Davies DR. 2004. Structure and function of HIV-1 integrase. *Curr Top Med Chem*
250 4(9):965-977.
- 251 Cooper DA, Steigbigel RT, Gatell JM, Rockstroh JK, Katlama C, Yeni P, Lazzarin A, Clotet
252 B, Kumar PN, Eron JE, Schechter M, Markowitz M, Loutfy MR, Lennox JL, Zhao J,
253 Chen J, Ryan DM, Rhodes RR, Killar JA, Gilde LR, Strohmaier KM, Meibohm AR,
254 Miller MD, Hazuda DJ, Nessly ML, DiNubile MJ, Isaacs RD, Teppler H, Nguyen BY.
255 2008. Subgroup and resistance analyses of raltegravir for resistant HIV-1 infection. *N*
256 *Engl J Med* 359(4):355-365.
- 257 De Castro N, Braun J, Charreau I, Pialoux G, Cotte L, Katlama C, Raffi F, Weiss L, Meynard
258 JL, Yazdanpanah Y, Delaugerre C, Madelaine-Chambrin I, Aboulker JP, Molina JM.
259 2009. Switch from enfuvirtide to raltegravir in virologically suppressed multidrug-
260 resistant HIV-1-infected patients: a randomized open-label trial. *Clin Infect Dis*
261 49(8):1259-1267.
- 262 Delelis O, Malet I, Na L, Tchertanov L, Calvez V, Marcelin AG, Subra F, Deprez E,
263 Mouscadet JF. 2009. The G140S mutation in HIV integrases from raltegravir-resistant
264 patients rescues catalytic defect due to the resistance Q148H mutation. *Nucleic Acids*
265 *Res* 37(4):1193-1201.
- 266 Delelis O, Thierry S, Subra F, Simon F, Malet I, Alloui C, Sayon S, Calvez V, Deprez E,
267 Marcelin AG, Tchertanov L, Mouscadet JF. 2010. Impact of Y143 HIV-1 integrase
268 mutations on resistance to raltegravir in vitro and in vivo. *Antimicrob Agents*
269 *Chemother* 54(1):491-501.

- 1
2
3
4 270 Dobard CW, Briones MS, Chow SA. 2007. Molecular mechanisms by which human
5 271 immunodeficiency virus type 1 integrase stimulates the early steps of reverse
6 272 transcription. *J Virol* 81(18):10037-10046.
- 7 273 Ferns RB, Kirk S, Bennett J, Williams I, Edwards S, Pillay D. 2009. The dynamics of
8 274 appearance and disappearance of HIV-1 integrase mutations during and after
9 275 withdrawal of raltegravir therapy. *AIDS* 23(16):2159-2164.
- 10 276 Fransen S, Gupta S, Danovich R, Hazuda D, Miller M, Witmer M, Petropoulos CJ, Huang W.
11 277 2009. Loss of raltegravir susceptibility by human immunodeficiency virus type 1 is
12 278 conferred via multiple nonoverlapping genetic pathways. *J Virol* 83(22):11440-11446.
- 13 279 Fun A, Van Baelen K, van Lelyveld SF, Schipper PJ, Stuyver LJ, Wensing AM, Nijhuis M.
14 280 2010. Mutation Q95K enhances N155H-mediated integrase inhibitor resistance and
15 281 improves viral replication capacity. *J Antimicrob Chemother* 65(11):2300-2304.
- 16 282 Gandhi RT, Zheng L, Bosch RJ, Chan ES, Margolis DM, Read S, Kallungal B, Palmer S,
17 283 Medvik K, Lederman MM, Alatrakchi N, Jacobson JM, Wiegand A, Kearney M,
18 284 Coffin JM, Mellors JW, Eron JJ. 2010. The effect of raltegravir intensification on low-
19 285 level residual viremia in HIV-infected patients on antiretroviral therapy: a randomized
20 286 controlled trial. *PLoS Med* 7(8).
- 21 287 Grant PM, Palmer S, Bendavid E, Talbot A, Slamowitz DC, Cain P, Kobayashi SS, Balamane
22 288 M, Zolopa AR. 2009. Switch from enfuvirtide to raltegravir in virologically
23 289 suppressed HIV-1 infected patients: effects on level of residual viremia and quality of
24 290 life. *J Clin Virol* 46(4):305-308.
- 25 291 Grinsztejn B, Nguyen BY, Katlama C, Gatell JM, Lazzarin A, Vittecoq D, Gonzalez CJ, Chen
26 292 J, Harvey CM, Isaacs RD. 2007. Safety and efficacy of the HIV-1 integrase inhibitor
27 293 raltegravir (MK-0518) in treatment-experienced patients with multidrug-resistant
28 294 virus: a phase II randomised controlled trial. *Lancet* 369(9569):1261-1269.
- 29 295 Hatano H, Lampiris H, Fransen S, Gupta S, Huang W, Hoh R, Martin JN, Lalezari J,
30 296 Bangsberg D, Petropoulos C, Deeks SG. 2010. Evolution of integrase resistance
31 297 during failure of integrase inhibitor-based antiretroviral therapy. *J Acquir Immune*
32 298 *Defic Syndr* 54(4):389-393.
- 33 299 Lennox JL, DeJesus E, Berger DS, Lazzarin A, Pollard RB, Ramalho Madruga JV, Zhao J,
34 300 Wan H, Gilbert CL, Tepler H, Rodgers AJ, Barnard RJ, Miller MD, Dinubile MJ,
35 301 Nguyen BY, Leavitt R, Sklar P. 2010. Raltegravir versus Efavirenz regimens in
36 302 treatment-naive HIV-1-infected patients: 96-week efficacy, durability, subgroup,
37 303 safety, and metabolic analyses. *J Acquir Immune Defic Syndr* 55(1):39-48.
- 38 304 Lennox JL, DeJesus E, Lazzarin A, Pollard RB, Madruga JV, Berger DS, Zhao J, Xu X,
39 305 Williams-Diaz A, Rodgers AJ, Barnard RJ, Miller MD, DiNubile MJ, Nguyen BY,
40 306 Leavitt R, Sklar P. 2009. Safety and efficacy of raltegravir-based versus efavirenz-
41 307 based combination therapy in treatment-naive patients with HIV-1 infection: a
42 308 multicentre, double-blind randomised controlled trial. *Lancet* 374(9692):796-806.
- 43 309 Malet I, Delelis O, Soulie C, Wirden M, Tchertanov L, Mottaz P, Peytavin G, Katlama C,
44 310 Mouscadet JF, Calvez V, Marcelin AG. 2009. Quasispecies variant dynamics during
45 311 emergence of resistance to raltegravir in HIV-1-infected patients. *J Antimicrob*
46 312 *Chemother* 63(4):795-804.
- 47 313 Malet I, Delelis O, Valantin MA, Montes B, Soulie C, Wirden M, Tchertanov L, Peytavin G,
48 314 Reynes J, Mouscadet JF, Katlama C, Calvez V, Marcelin AG. 2008. Mutations
49 315 associated with failure of raltegravir treatment affect integrase sensitivity to the
50 316 inhibitor in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 52(4):1351-1358.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

- 317 Markowitz M, Morales-Ramirez JO, Nguyen BY, Kovacs CM, Steigbigel RT, Cooper DA,
318 Liporace R, Schwartz R, Isaacs R, Gilde LR, Wenning L, Zhao J, Tepler H. 2006.
319 Antiretroviral activity, pharmacokinetics, and tolerability of MK-0518, a novel
320 inhibitor of HIV-1 integrase, dosed as monotherapy for 10 days in treatment-naive
321 HIV-1-infected individuals. *J Acquir Immune Defic Syndr* 43(5):509-515.
- 322 Markowitz M, Nguyen BY, Gotuzzo E, Mendo F, Ratanasuwan W, Kovacs C, Prada G,
323 Morales-Ramirez JO, Crumpacker CS, Isaacs RD, Campbell H, Strohmaier KM, Wan
324 H, Danovich RM, Tepler H. 2009. Sustained antiretroviral effect of raltegravir after
325 96 weeks of combination therapy in treatment-naive patients with HIV-1 infection. *J*
326 *Acquir Immune Defic Syndr* 52(3):350-356.
- 327 Passaes CB, Guimaraes ML, Fernandez SL, Lorete Rdos S, Teixeira SL, Fernandez JC,
328 Morgado MG. 2009a. Lack of primary mutations associated with integrase inhibitors
329 among HIV-1 subtypes B, C, and F circulating in Brazil. *J Acquir Immune Defic*
330 *Syndr* 51(1):7-12.
- 331 Passaes CP, Bello G, Lorete RS, Matos Almeida SE, Junqueira DM, Veloso VG, Morgado
332 MG, Guimaraes ML. 2009b. Genetic characterization of HIV-1 BC recombinants and
333 evolutionary history of the CRF31_BC in Southern Brazil. *Infect Genet Evol*
334 9(4):474-482.
- 335 Quercia R, Dam E, Perez-Bercoff D, Clavel F. 2009. Selective-advantage profile of human
336 immunodeficiency virus type 1 integrase mutants explains in vivo evolution of
337 raltegravir resistance genotypes. *J Virol* 83(19):10245-10249.
- 338 Reigadas S, Anies G, Masquelier B, Calmels C, Stuyver LJ, Parissi V, Fleury H, Andreola
339 ML. 2010. The HIV-1 integrase mutations Y143C/R are an alternative pathway for
340 resistance to Raltegravir and impact the enzyme functions. *PLoS One* 5(4):e10311.
- 341 Santos JR, Llibre JM, Ferrer E, Domingo P, Imaz A, Molto J, Martin-Iguacel R, Caum C,
342 Podzamczar D, Clotet B. 2009. Efficacy and safety of switching from enfuvirtide to
343 raltegravir in patients with virological suppression. *HIV Clin Trials* 10(6):432-438.
- 344 Steigbigel RT, Cooper DA, Kumar PN, Eron JE, Schechter M, Markowitz M, Loutfy MR,
345 Lennox JL, Gatell JM, Rockstroh JK, Katlama C, Yeni P, Lazzarin A, Clotet B, Zhao
346 J, Chen J, Ryan DM, Rhodes RR, Killar JA, Gilde LR, Strohmaier KM, Meibohm AR,
347 Miller MD, Hazuda DJ, Nessly ML, DiNubile MJ, Isaacs RD, Nguyen BY, Tepler H.
348 2008. Raltegravir with optimized background therapy for resistant HIV-1 infection. *N*
349 *Engl J Med* 359(4):339-354.
- 350 Steigbigel RT, Cooper DA, Tepler H, Eron JJ, Gatell JM, Kumar PN, Rockstroh JK,
351 Schechter M, Katlama C, Markowitz M, Yeni P, Loutfy MR, Lazzarin A, Lennox JL,
352 Clotet B, Zhao J, Wan H, Rhodes RR, Strohmaier KM, Barnard RJ, Isaacs RD,
353 Nguyen BY. 2010. Long-term efficacy and safety of Raltegravir combined with
354 optimized background therapy in treatment-experienced patients with drug-resistant
355 HIV infection: week 96 results of the BENCHMRK 1 and 2 Phase III trials. *Clin*
356 *Infect Dis* 50(4):605-612.
- 357 Talbot A, Machouf N, Thomas R, Marcotte S, Therrien R, Lessard B, Dufresne S, Lalonde R.
358 2009. Switch from enfuvirtide to raltegravir in patients with undetectable viral load:
359 efficacy and safety at 24 weeks in a Montreal cohort. *J Acquir Immune Defic Syndr*
360 51(3):362-364.
- 361 Tommasi C, Ceccherini-Silberstein F, D'Arrigo R, Bellagamba R, Tempestilli M, Dessi C,
362 Santoro MM, Forbici F, Nicastrì E, Pucillo LP, Perno CF, Narciso P. 2010. Use of
363 novel antiretroviral agents in rescue regimens: a case of early virological failure to
364 raltegravir. *Scand J Infect Dis* 42(3):237-239.

- 1
2
3
4 365 Wilkinson TA, Januszyk K, Phillips ML, Tekeste SS, Zhang M, Miller JT, Le Grice SF,
5 366 Clubb RT, Chow SA. 2009. Identifying and characterizing a functional HIV-1 reverse
6 367 transcriptase-binding site on integrase. *J Biol Chem* 284(12):7931-7939.
7 368 Wu X, Liu H, Xiao H, Conway JA, Hehl E, Kalpana GV, Prasad V, Kappes JC. 1999. Human
8 369 immunodeficiency virus type 1 integrase protein promotes reverse transcription
9 370 through specific interactions with the nucleoprotein reverse transcription complex. *J*
10 371 *Virology* 73(3):2126-2135.
11 372 Young B, Fransen S, Greenberg KS, Thomas A, Martens S, St Clair M, Petropoulos CJ, Ha B.
12 373 2011. Transmission of integrase strand-transfer inhibitor multidrug-resistant HIV-1:
13 374 case report and response to raltegravir-containing antiretroviral therapy. *Antivir Ther*
14 375 16(2):253-256.
15 376 Zhu K, Dobard C, Chow SA. 2004. Requirement for integrase during reverse transcription of
16 377 human immunodeficiency virus type 1 and the effect of cysteine mutations of
17 378 integrase on its interactions with reverse transcriptase. *J Virol* 78(10):5045-5055.
18 379
19 380
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4 381 **Legends:**

5
6 382

7
8 383 **Figure 1:** Median and interquartile range of CD4⁺ T cell counts (a) and HIV-1 viral load (b)
9
10 384 of the patients at baseline, 6 and 12 months after start antiretroviral therapy under a RAL
11
12 385 containing regimen. Black dots represent patients of Group 1 (switched from enfuvirtide) and
13
14 386 white diamonds represent patients of Group 2 (salvage therapy with RAL). A dashed line
15
16 387 indicates the RNA assay limit of detection.
17
18

19
20 388

21
22 389 **Figure 2:** CD4⁺ T cell counts, HIV viral load and the development of resistance to integrase
23
24 390 inhibitors for those patients with evidence of virological failure. Symbols and lines in black
25
26 391 indicate viral load, symbols and lines in grey indicate CD4⁺ T cell counts. Mutations to
27
28 392 integrase inhibitors are indicated at each point analyzed.
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Table 1. Baseline characteristics of patients

| | Patient | Year of first positive serology | Previous regimen | RAL-containing regimen | Subtype | CD4 (cells/mm ³) | Viral load (copies/mL) | Months of follow-up |
|--------------------------|---------|---------------------------------|------------------------|------------------------|---------|------------------------------|------------------------|---------------------|
| Switch from T20 to RAL | RIIn001 | 2004 | TDF/3TC/DRVr/T20 | TDF/3TC/DRVr/RAL | B | 305 | <50 | 23 |
| | RIIn002 | 2001 | TDF/3TC/DRVr/T20 | TDF/3TC/DRVr/RAL | B | 279 | <50 | 19 |
| | RIIn003 | 1994 | TDF/3TC/DRVr/T20 | TDF/3TC/DRVr/RAL | NA | 252 | <50 | 6 |
| | RIIn004 | 1997 | AZT/3TC/TDF/DRVr/T20 | AZT/3TC/TDF/DRVr/RAL | B | 572 | <50 | 22 |
| | RIIn005 | 2006 | AZT/3TC/TDF/DRVr/T20 | AZT/3TC/TDF/DRVr/RAL | B | 354 | <50 | 11 |
| | RIIn006 | 1997 | AZT/3TC/TDF/fAPVr/T20 | AZT/3TC/TDF/fAPVr/RAL | B | 222 | <50 | 6 |
| | RIIn007 | 1993 | TDF/3TC/ DRVr/T20 | TDF/3TC/ DRVr /RAL | F | 497 | <50 | 10 |
| | RIIn008 | 1990 | AZT/3TC/TDF/ DRVr /T20 | AZT/3TC/TDF/ DRVr /RAL | B | 1010 | <50 | 21 |
| | RIIn009 | 1997 | AZT/3TC/TDF/ DRVr /T20 | AZT/3TC/TDF/DRVr/RAL | NA | 150 | <50 | 10 |
| Salvage therapy with RAL | RIIn010 | 1996 | TDF/3TC/LPVr/T20/MVC | TDF/3TC/DRVr/RAL | B | 10 | 25269 | 21 |
| | RIIn011 | 1997 | TDF/DDI/3TC/LPVr | TDF/3TC/DRVr/RAL | B | 25 | 74062 | 21 |
| | RIIn012 | 1993 | 3TC/d4T/LPVr | 3TC/DRVr/T20/RAL | B | 43 | 114516 | 23 |
| | RIIn013 | 1997 | AZT/3TC/LPVr | TDF/3TC/DRVr/RAL | B | 36 | 32214 | 10 |
| | RIIn014 | 1997 | AZT/3TC/LPVr | TDF/3TC/DRVr/ T20/RAL | B | 202 | 88508 | 15 |
| | RIIn015 | 1995 | TDF/DDI/3TC/LPVr | TDF/3TC/DRVr/RAL | B | 471 | 203 | 18 |
| | RIIn016 | 1986 | AZT/3TC/TDF/DRVr/T20 | AZT/3TC/TDF/DRVr/RAL | B | 42 | 20179 | 24 |
| | RIIn017 | 1991 | TDF/3TC/DRVr/ETR | TDF/3TC/fAPV/RAL | B | 531 | 879 | 15 |
| | RIIn018 | 1999 | TDF/3TC/ LPVr | 3TC/TDF/DRVr/RAL | B | 158 | 133 | 6 |
| | RIIn019 | 1992 | AZT/3TC/TDF/DRVr | AZT/3TC/TDF/DRVr/RAL | B | 169 | 376 | 11 |

3TC: lamivudine; AZT: zidovudine; d4T: stavudine; DRV: darunavir; DDI: didanosine; ETR: etravirine; fAPV: fosamprenavir; LPV: lopinavir; MVC: maraviroc; RAL: raltegravir; T20: enfuvirtide; TDF: tenofovir. NA – not analyzed

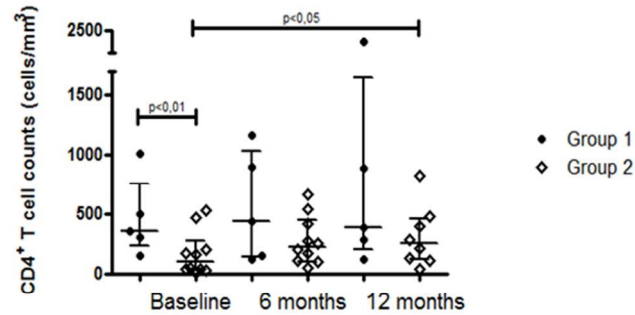
Table 2. Mutational characteristics of patients at baseline and failure

| Patients | Resistance mutations | | | |
|----------------|--|---|--------------|---------------------|
| | PI | NRTI | NNRTI | INI |
| RIIn016 | | | | |
| Baseline | M46L, V82A, I84V, L10I, L33F, I85V | M41L, T215C | K103N | None |
| 3 months | M46L, V82A, I84V, L10I, L33F, I85V | M41L, T215C | K103N | None |
| 8 months | M46L, V82A, I84V, L10I, L33F, I85V | M41L, T215C | K103N | None |
| 12 months | M46L, V82A, I84V, L10I, L33F, I85V | T215C | K103N | None |
| 16 months | M46L, V82A, I84V, L10V, L33F | M41L, T215C | K103N | None |
| 24 months | M46L, V82A, I84V, L10V, L33F | T215C | K103N | None |
| RIIn017 | | | | |
| Baseline | M46L, G48V, I54S, V82A, L10V, A71V | M41L, M184V, L210W, T215Y | Y188L | None |
| 4 months | M46L, G48V, I54S, V82A, L10V, A71V | M41L, M184V, L210W, T215Y | Y188L | G140S, Q148H, S230N |
| 9 months | M46L, I54S, V82A, L10V, A71V | M41L, M184V, L210W, T215Y | Y188L | G140S, Q148H, S230N |
| 15 months | M46I, G48V, I54S, V82A, L10V, L33F, A71V | M41L, M184V, L210W, T215Y | Y188L | G140S, Q148H |
| RIIn019 | | | | |
| Baseline | V32I, M46I, I47V, G48L, I54T, V82T, I84V, L10I, L33F, A71V | D67d, T69G, K70R, L74I, M184V, T215F, K219E | V108I, Y181C | None |
| 7 months | G48V, I50V, I54S, V82A, L10I, L33F, A71V | D67d, T69G, K70R, L74I, M184V, T215F, K219E | V108I, Y181C | G140S, Q148H |
| 11 months | G48V, I50V, I54S, V82A, L10I, L33F, A71V | D67d, T69G, K70R, L74I, M184V, T215F, K219E | V108I, Y181C | G140S, Q148H |

PI: protease inhibitors; NRTI: nucleoside reverse transcriptase inhibitors; NNRTI: non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors; INI: integrase inhibitors; FI: fusion inhibitors.

Figure 1

a



b

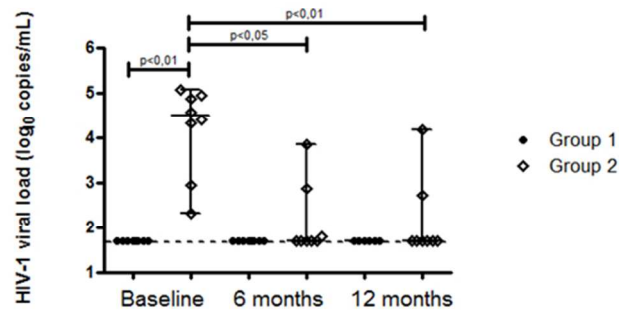


Figure 1: Median and interquartile range of CD4⁺ T cell counts (a) and HIV-1 viral load (b) of the patients at baseline, 6 and 12 months after start antiretroviral therapy under a RAL containing regimen. Black dots represent patients of Group 1 (switched from enfuvirtide) and white diamonds represent patients of Group 2 (salvage therapy with RAL). A dashed line indicates the RNA assay limit of detection. 190x254mm (96 x 96 DPI)

Figure 2

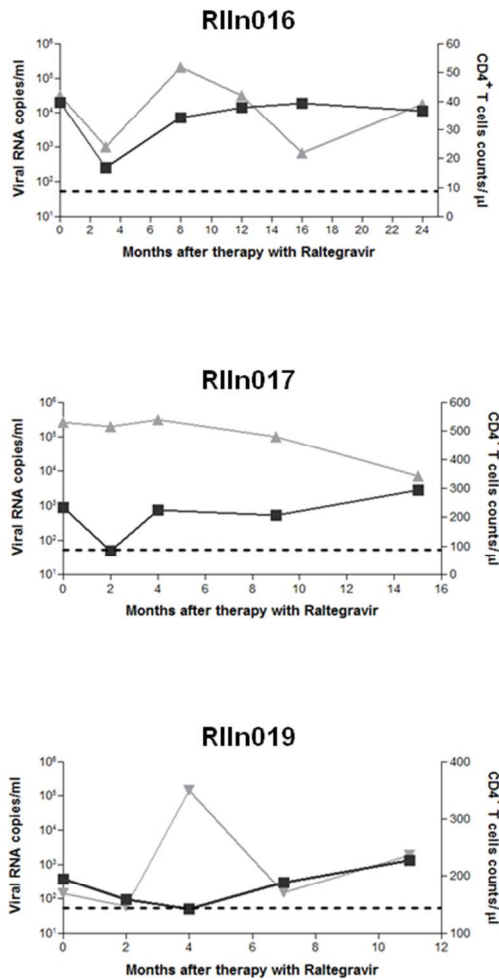


Figure 2: CD4+ T cell counts, HIV viral load and the development of resistance to integrase inhibitors for those patients with evidence of virological failure. Symbols and lines in black indicate viral load, symbols and lines in grey indicate CD4+ T cell counts. Mutations to integrase inhibitors are indicated at each point analyzed.

190x254mm (96 x 96 DPI)

3.4) Documento 4 - “Desenvolvimento de uma metodologia nacional de genotipagem da integrase do HIV-1: ampliação do protocolo e avaliação da estabilidade e reprodutibilidade do método para monitoramento dos pacientes sob terapia com o raltegravir”

3.4.1) Documento 4a: “Development and evaluation of a one step in-house assay for HIV-1 integrase drug resistance genotyping”

Autores: Caroline Pereira Bittencourt Passaes, Edson Oliveira Delatorre, Monick Lindenmeyer Guimarães, Mariza Gonçalves Morgado.

Manuscrito em preparação

3.4.2) Documento 4b: “Plataforma Brasileira de Genotipagem da Integrase - Manual de utilização da técnica - Versão 1.0”

Autores: Caroline Pereira Bittencourt Passaes, Edson Oliveira Delatorre, Monick Lindenmeyer Guimarães, Mariza Gonçalves Morgado.

Com a introdução do raltegravir na prática clínica no Brasil e devido à rápida emergência de variantes resistentes a esta droga, foi evidenciada a necessidade do desenvolvimento de métodos de genotipagem da integrase para monitorar o desenvolvimento de resistência aos inibidores de integrase no país.

Como consequência dos trabalhos de pesquisa relacionados à integrase que vinham sendo conduzidos no laboratório e motivados pela necessidade de implementação de uma metodologia de genotipagem que pudesse ser utilizada para o manejo dos indivíduos HIV positivos em terapia com raltegravir, o Laboratório de AIDS e Imunologia Molecular do Instituto Oswaldo Cruz iniciou o desenvolvimento de uma metodologia de genotipagem da integrase do HIV-1. Essa metodologia vem sendo amplamente utilizada em nosso laboratório, sendo capaz de amplificar amostras dos subtipos de HIV-1 prevalentes no Brasil e também de outros subtipos menos freqüentes em nosso país com alta sensibilidade.

Uma vez que há uma política de incentivo de projetos que tenham por objetivo o desenvolvimento tecnológico e a inovação, gerando produtos nacionais, o

Ministério da Saúde do Brasil incentivou o desenvolvimento de metodologias nacionais de genotipagem dos novos alvos terapêuticos. Numa primeira etapa, aprimoramos a metodologia de genotipagem da integrase já em uso corrente em nosso laboratório visando o desenvolvimento de um ensaio de PCR *single round* para ser utilizado na prática clínica.

Esta metodologia foi desenvolvida para ser introduzida na Microrrede para Novos Alvos Terapêuticos, da Rede Nacional de Genotipagem (RENAGENO), sendo aplicada na avaliação do *status* de resistência de pacientes sob terapia de resgate com o raltegravir no país, o que representa uma importante contribuição para o SUS.

O manuscrito descrevendo a técnica desenvolvida e o manual técnico desenvolvido para ser apresentado ao Ministério da Saúde do Brasil como produto final deste projeto serão apresentados a seguir.

Development and evaluation of a one step in-house assay for HIV-1 integrase drug resistance genotyping

Running title: HIV integrase genotyping

Caroline Pereira Bittencourt Passaes*, Edson Oliveira Delatorre*, Monick Lindenmeyer Guimarães, Mariza Gonçalves Morgado**.

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

* Both authors contributed equally to this work.

**Corresponding author: Mariza G Morgado

Address: Laboratório de AIDS e Imunologia Molecular, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ

Av. Brasil 4365, Pav. Leonidas Deane, room 413.

Rio de Janeiro, Brazil. 21040-900

E-mail: mmorgado@ioc.fiocruz.br

Telephone number: 55-21-38658106 / Fax number: 55-21-38658173

Abstract

Background: Due to the increased use of the integrase inhibitor raltegravir in the clinical practice in Brazil and the high cost of commercial genotyping tests, the development of an efficient in-house assay to assess HIV-1 integrase drug resistance genotyping is highly required. Thus, the aim of the present study is to describe a sensitive in-house single round genotyping method to evaluate resistance to integrase inhibitors in samples of HIV-1 subtypes B, C and F prevalent in Brazil.

Study Design: A panel of 55 samples collected from drug naïve patients infected with HIV-1 subtypes B, C and F with plasma viral load ranging from 1,000 to 340,000 copies/ml was used to achieve the sensitivity and specificity of the genotyping test.

Results: Successful genotyping was achieved for 81.2%, 87.5% and 100% of samples with viral load ranging from 1000-3000, 3001-10,000 and >10,000 copies/ml, respectively. The successful amplification rate was not statistically different among different subtypes analyzed. The overall success rate of the single round test was 93%.

Conclusions: The single round integrase genotyping assay here described represents a cost-effective and useful tool for the detection of resistance mutations to integrase inhibitors in the context of raltegravir use in the public health system in Brazil.

Key words: HIV-1 integrase, in-house genotyping assay, drug resistance, integrase inhibitors, raltegravir.

Introduction:

Since the introduction of the highly active antiretroviral therapy (HAART), morbidity and mortality of HIV infected patients decreased significantly (PALELLA *et al.*, 1998). Antiretroviral combinations usually comprise three drugs, of which nucleoside, non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors and protease inhibitors are the most currently used (CAHN & SUED, 2007). In 2007, the Food and Drug Administration (FDA) approved the use of the first integrase inhibitor - raltegravir - in the salvage therapy of heavily drug-experienced patients (FDA notifications, 2007a, 2007b). More recently, in 2009, this drug was also approved to be used in first-line therapy, due to its excellent antiviral activity (FDA notifications, 2009). Raltegravir is one of the most potent and well tolerated antiretroviral drugs and based on its characteristics, it has been considered to be used in switch, simplification and intensification approaches (MARKOWITZ *et al.*, 2007; GRINSZTEJN *et al.*, 2007; DE CASTRO *et al.*, 2009; TOWNER *et al.*, 2009; BUZON *et al.*, 2010; ERON *et al.*, 2010; GALLIEN *et al.*, 2011). In spite of the powerful capacity of raltegravir in suppress HIV replication, the genetic barrier for this drug is low, therefore resistance mutations emerge rapidly after virological failure. Three major resistance mutations were described N155H, Q148H/K/R, and Y143C/R; moreover, secondary mutations use to appear to compensate the loss of viral fitness (DELAUGERRE, 2010). HIV genotyping has been widely used to determine drug resistance and to predict the response to antiretroviral therapy, and thus can be used to guide the clinical management of the disease; however, the high costs may limit the accessibility of resistance testing in limited-resource countries. Due to the increased use of the integrase inhibitor raltegravir in the clinical practice in Brazil, the development of an efficient in-house assay to assess HIV-1 integrase drug resistance genotyping is highly required. Thus, the aim of the present study is to describe a sensitive in-house single round genotyping method to evaluate

resistance to integrase inhibitors in samples of HIV-1 subtypes B, C and F prevalent in Brazil.

Methods:

Study group

A panel of 55 samples collected from drug naïve patients infected with HIV-1 subtypes B, C and F was used to achieve the sensitivity and specificity of the genotyping test. Plasma viral load ranged from 1,000 to 340,000 copies/ml and was quantified using NASBA (NUCLISENS EASYQ[®], bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) or bDNA methods (Versant 3.0, Siemens, Erlangen, Germany).

HIV RNA extraction

Viral RNA was extracted from 140µl of HIV-1 positive plasma samples using the QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) according to the manufacturer's protocol, with a final elution of RNA in 60 µl of the elution buffer.

cDNA synthesis

The cDNA synthesis was performed using 10µl of purified viral RNA in a 20µl volume reagent mix containing 1X First-Strand Buffer (Tris-HCl 250mM pH8.3; KCl 375mM; MgCl₂ 15mM), 5mM of DTT, 40U of RNaseOUT[™] (Life Technologies, CA, USA), 0.5mM of dNTP mix, 4.0µM of the reverse primer INT6 (Table 1) and 200U of SuperScript[®] III reverse transcriptase enzyme (Life Technologies, CA, USA). The reaction was incubated at 55°C for 60 minutes followed by a final heat of 70°C for 15 minutes for enzyme denaturation.

Amplification of the integrase region by a single round PCR protocol

PCR single round reactions were carried out using 150U of Platinum® Taq DNA Polymerase (Life Technologies, CA, USA) in a 50 µl reaction volume containing 1X PCR Buffer (Tris-HCl pH 8.4 200mM, KCl 500mM), 2.5mM of MgCl₂, 0.3mM of dNTPs and 0.45µM of each RT7 (forward) and INT6 (reverse) primers (Table 1). The cDNA volume used in each PCR reaction was 5µl. Cycling conditions were as follows: 2 minutes at 94°C; 40 cycles of 20 seconds at 94°C, 45 seconds at 56°C, 3 minutes at 72°C; and a final extension step of 10 minutes at 72°C.

Purification and quantification

The PCR products were purified using the Illustra GFX PCR DNA purification kit (GE Healthcare) according to the manufacturer's protocol. The purified products were quantified by electrophoresis on 2% agarose gels and visualized with ethidium bromide under UV light. The estimated amount of PCR products were estimated based on the Low DNA Mass Ladder reagent (Life Technologies, CA, USA), according to the manufacturer's protocol.

Rescue protocol

For those samples presenting negative results for the single round amplification described above, a nested PCR reaction was performed using 5ul of the first round product in a final volume of 50ul reaction containing 150U of Platinum® Taq DNA Polymerase 150U (Life Technologies, CA, USA), 1X PCR Buffer (Tris-HCl pH 8.4 200mM, KCl 500mM), 2.5mM of MgCl₂, 0.3mM of dNTPs and 0.25µM of RT2 (forward) and INT9 (reverse) primers (Table 1). Cycling conditions were as follows: 2 minutes at 94°C; 32 cycles of 20 seconds at 94°C, 45 seconds at 56°C, 3 minutes at 72°C; and a final extension step of 10 minutes at 72°C.

Sequencing

Purified DNA was sequenced using the ABI BigDye Terminator v.3.1 cycle sequencing ready reaction kit (Applied Biosystem, CA, US). For each sample, five primers (RT2, INT3, INT4, INT6, and SCCOAS) were used for sequencing the entire integrase gene (HXB2 positions 4230-5096), as described in Table 1. Sequencing reactions were carried out according to the manufacturer's instructions using 0.2 μ M of each primer/reaction. Cycling conditions were as follows: 25 cycles of 30 seconds at 96°C, 20 seconds at 50°C, and 4 minutes at 60 ° C. Non-incorporated dideoxynucleoside triphosphates were removed by isopropanol precipitation and pellet was suspended in Formamide Hi-Di (Life Technologies) for denaturation. Sequences were processed with an automated ABI 3100 Genetic Analyzer (Life Technologies).

Resistance analysis

Nucleotide sequences were assembled and manually edited using freely available software packages. A fragment of 867 nucleotides (positions 4230 to 5096 relative to HXB2) corresponding to the entire integrase gene of each sample was submitted to the Stanford HIV Drug Resistance Database (<http://hivdb.stanford.edu/>) to assess the level of resistance to integrase inhibitors.

Statistical analysis

The nonparametric Kruskal-Wallis test was used for group comparisons. Chi-square test was used to analyze whether the percentage of positive PCR was significantly different among groups. A P value less than 0.05 was considered significant. GraphPad Prism 5 was used to perform statistical analyzes.

Results:*Efficiency of the in house genotyping assay*

Amplification was attempted for all of the 55 samples included in this study independent of their viral load. Of them 22 had viral load values ranging from 1,000 to 3,000 copies/ml (range A), 16 ranged from > 3,000 to 10,000 (range B), and for 17 samples viral load was higher than 10,000 (range C). Successful genotyping was achieved for 81.2%, 87.5% and 100% of samples from ranges A, B and C, respectively, as shown in Figure 1. The overall success rate of the single round test was 90%. Of the 6 samples that failed amplification, two of them were subsequently amplified using the rescue protocol increasing the overall amplification rate from 90% to 93%. The efficiency of the test was not statistically different among different viral load ranges.

Performance of the single round genotyping assay for different HIV-1 subtypes

A total of 55 samples of the subtype panel were tried for amplification, being 22 subtype B, 18 subtype C and 17 subtype F. The genotyping of HIV-1 integrase was successfully achieved for 90.3%, 84.1% and 95.8% for subtypes B, C and F samples, respectively. Our method failed to amplify two samples of subtype B, three samples of subtype C and one sample of subtype F. The percentage of amplification based on HIV-1 subtype and viral load range is shown in Figure 2. The rescue protocol was able to amplify one sample of subtype C and one of subtype F, giving a total success rate of 93% For samples with viral load higher than 10,000 the percentage of amplification was 100% independent of the HIV-1 subtype. The successful amplification rate was not statistically different among different subtypes.

Detection of IN inhibitors resistance mutations

All 55 integrase sequences were submitted to resistance analysis in order to verify if the test detects primary resistance mutations and genetic polymorphisms in Brazilian samples. No major resistance mutations were detected in those samples, but some polymorphisms that are considered accessory mutations were identified: V151I (22.7%) and L74M (4.5%) for subtype B samples, T97A for a subtype F sample (5.5%), and G163R for a subtype C sample (5.8%).

Discussion:

The Brazilian program of AIDS has long been considered a reference, according UNAIDS (AIDS EPIDEMIC UPDATE, 2010), providing universal access to the antiretroviral drugs for all HIV infected patients that need treatment. The integrase inhibitor raltegravir was recently approved to be used in salvage therapy in the country; therefore, an accurate method to monitor the emergence of resistant strains became highly necessary. The high cost of commercial genotyping tests may be a barrier for an appropriate follow-up of treatment, mainly in developing countries. In-house genotyping assays represent an alternative and a less expensive manner to monitor HIV resistance for laboratories with established infrastructure and expertise for molecular biology technologies, as PCR and DNA sequencing. The total cost of these assays usually corresponds to less than 50% of the costs of commercial kits. In the present study, an in-house method to genotype HIV-1 integrase is described using single round PCR in the amplification step. The application of PCR amplification methods to assess HIV sequences has been largely used; however, just one single round method is currently available, based on a commercial One Step RT-PCR technology (HEARPS *et al.*, 2009). Single round assays represent a reduction in potential laboratory cross-contamination problems, error rates, and hands-on time, being a more accurate methodology to be implemented not only for research purposes, but also in the

clinical practice. Although previous studies have already described in-house genotyping assays to assess integrase drug resistance mutations, they were based on the usage of the ViroSeq HIV-1 Genotyping System - Sample Preparation Module (Celera Diagnostics) for the RNA extraction step (VAN LAETHEM *et al.*, 2008; ESHLEMAN *et al.*, 2009; HEARPS *et al.*, 2009), which may increase the price of the in-house assays mainly for laboratories not currently using this commercial assay for their routine to assess protease/reverse transcriptase drug resistance mutations. Although the primers designed to be used for the method here described were developed to amplify samples of HIV-1 subtypes B, C and F, that are prevalent in Brazil, the alignment of the HIV-1 sequences available in the Los Alamos dataset did not show any polymorphism in the corresponding primer annealing regions that could impair the application of this method for other HIV-1 subtypes from the M group. Overall, the successful rate of the genotyping method here described was higher than 90%, demonstrating the high rate of amplification in samples with viral load higher than 1000 copies/ml. The less percentage of amplification (~83%) was in those samples ranging from 1000 to 3000 copies/ml. In order to prevent unsuccessful amplification, the establishment of a cut off around 2000 copies/ml is strongly recommended, similarly to the required for some commercial PR/RT genotyping assays. Three main pathways have been associated to raltegravir resistance, being N155H, Q148H/K/R, and Y143R/C considered major resistance mutations and L74M, E92Q, Q95K, T97A, E138A/K, G140S/A, Y143H, V151I and G163R described as secondary mutations that emerge to compensate the loss of viral fitness (COOPER *et al.*, 2008). The method here described is able to detect resistance mutations at integrase in patients under therapy with raltegravir. The single round integrase genotyping assay here presented represents a cost-effective and useful tool for the detection of resistance mutations to integrase inhibitors in the context of raltegravir use in the public health system in Brazil.

Acknowledgments:

This work was supported by the National Department of HIV/AIDS and Viral Hepatitis of the Brazilian Ministry of Health.

References

- 2007a. Approval recommended for raltegravir in experienced patients. **AIDS Patient Care STDS** 21(9):702.
- 2007b. FDA approves raltegravir tablets. **AIDS Patient Care STDS** 21(11):889.
2009. FDA notifications. FDA approves raltegravir for HIV-1 treatment-naive patients. **AIDS Alert** 24(9):106-107.
- AIDS EPIDEMIC UPDATE.** UNAIDS. Published jointly by UNAIDS and the World Health Organization. [on-line]. 2010. [capturado em 05 de dezembro de 2011]. Disponível em: <http://www.unaids.org>.
- Buzón MJ, Massanella M, Llibre JM, Esteve A, Dahl V, Puertas MC *et al.* HIV-1 replication and immune dynamics are affected by raltegravir intensification of HAART-suppressed subjects. **Nat Med.** 2010; 16(4):460-465.
- Cahn P, Sued O. Raltegravir: a new antiretroviral class for salvage therapy. **Lancet.** 2007; 369(9569):1235-1236.
- Cooper DA, Steigbigel RT, Gatell JM, Rockstroh JK, Katlama C, Yeni P *et al.* Subgroup and resistance analyses of raltegravir for resistant HIV-1 infection. **N Engl J Med.** 2008; 359(4):355-365.
- De Castro N, Braun J, Charreau I, Pialoux G, Cotte L, Katlama C *et al.* Switch from enfuvirtide to raltegravir in virologically suppressed multidrug-resistant HIV-1-infected patients: a randomized open-label trial. **Clin Infect Dis.** 2009; 49(8):1259-1267.
- Delaugerre C. Barrière génétique à la résistance des antirétroviraux: Le point sur le raltégravir, premier inhibiteur d'intégrase. **Med Mal Infect.** 2010; 40 Suppl 1:S1-10.
- Eron JJ, Young B, Cooper DA, Youle M, Dejesus E, Andrade-Villanueva J *et al.* Switch to a raltegravir-based regimen versus continuation of a lopinavir-ritonavir-based regimen in stable HIV-infected patients with suppressed viraemia (SWITCHMRK 1 and 2): two multicentre, double-blind, randomised controlled trials. **Lancet.** 2010; 375(9712):396-407.
- Eshleman SH, Hudelson SE, Smith P, Hackett J, Holzmayer V, Swanson P *et al.* Analysis of pol integrase sequences in diverse HIV type 1 strains using a prototype genotyping assay. **AIDS Res Hum Retroviruses.** 2009; 25(3):343-345.
- Gallien S, Braun J, Delaugerre C, Charreau I, Reynes J, Jeanblanc F *et al.* Efficacy and safety of raltegravir in treatment-experienced HIV-1-infected patients switching from enfuvirtide-based regimens: 48 week results of the randomized EASIER ANRS 138 trial. **J Antimicrob Chemother.** 2011; 66(9):2099-2106.
- Grinsztejn B, Nguyen BY, Katlama C, Gatell JM, Lazzarin A, Vittecoq D *et al.* Safety and efficacy of the HIV-1 integrase inhibitor raltegravir (MK-0518) in treatment-experienced patients with multidrug-resistant virus: a phase II randomised controlled trial. **Lancet.** 2007;

369(9569):1261-1269.

Hearps AC, Greengrass V, Hoy J, Crowe SM. An HIV-1 integrase genotype assay for the detection of drug resistance mutations. **Sex Health**. 2009; 6(4):305-309.

Markowitz M, Nguyen BY, Gotuzzo E, Mendo F, Ratanasuwan W, Kovacs C *et al*. Rapid and durable antiretroviral effect of the HIV-1 Integrase inhibitor raltegravir as part of combination therapy in treatment-naive patients with HIV-1 infection: results of a 48-week controlled study. **J Acquir Immune Defic Syndr**. 2007; 46(2):125-133.

Palella FJ Jr, Delaney KM, Moorman AC, Loveless MO, Fuhrer J, Satten GA *et al*. Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigators. **N Engl J Med**. 1998; 338(13):853-860.

Towner W, Klein D, Kerrigan HL, Follansbee S, Yu K, Horberg M. Virologic outcomes of changing enfuvirtide to raltegravir in HIV-1 patients well controlled on an enfuvirtide based regimen: 24-week results of the CHEER study. **J Acquir Immune Defic Syndr**. 2009; 51(4):367-373.

Van Laethem K, Schrooten Y, Covens K, Dekeersmaeker N, De Munter P, Van Wijngaerden E *et al*. A genotypic assay for the amplification and sequencing of integrase from diverse HIV-1 group M subtypes. **J Virol Methods**. 2008; 153(2):176-181.

Legends

Figure 1: Efficiency of the integrase genotyping assay for different viral load ranges. Results are expressed in %. Light grey represents viral load range 1000 to 3000, dark grey represents range from 3001 to 10000 and black represents viral load >10000 copies/ml.

Figure 2: Efficiency of the integrase genotyping assay for different HIV-1 subtypes and viral load ranges. Results are expressed in %. Light grey represents subtype B, dark grey represents subtype C and black represents subtype F.

Figure 1

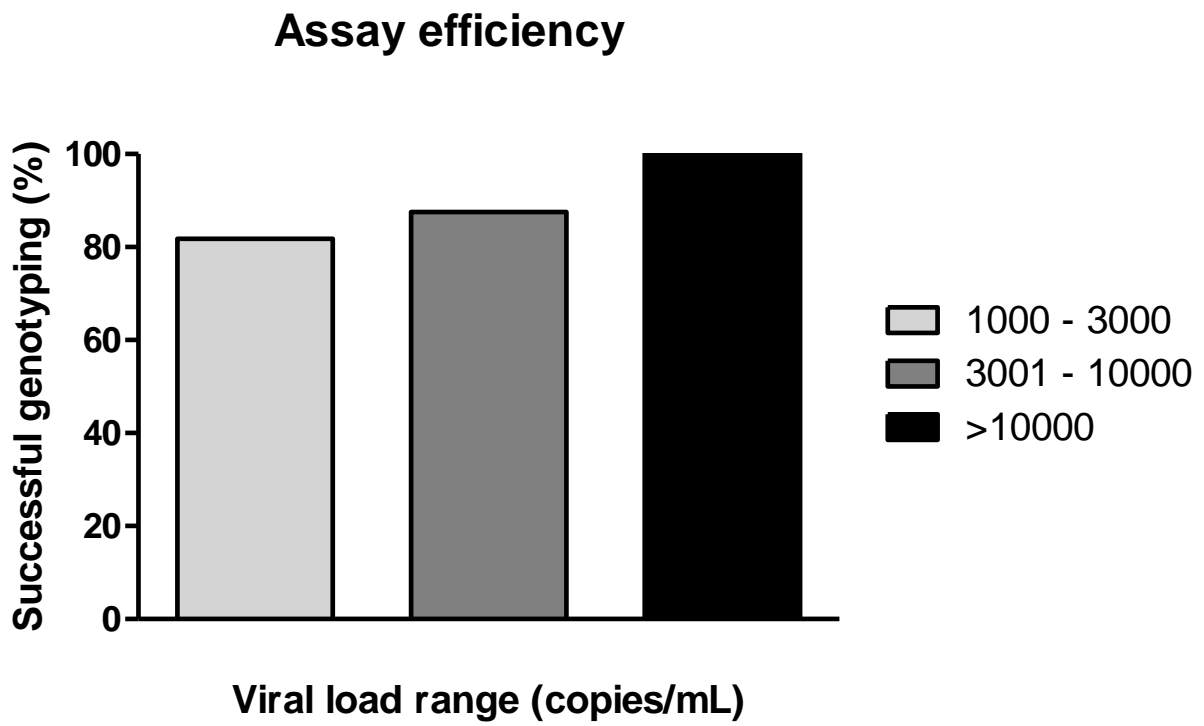


Figure 2

Assay efficiency based on HIV-1 subtypes

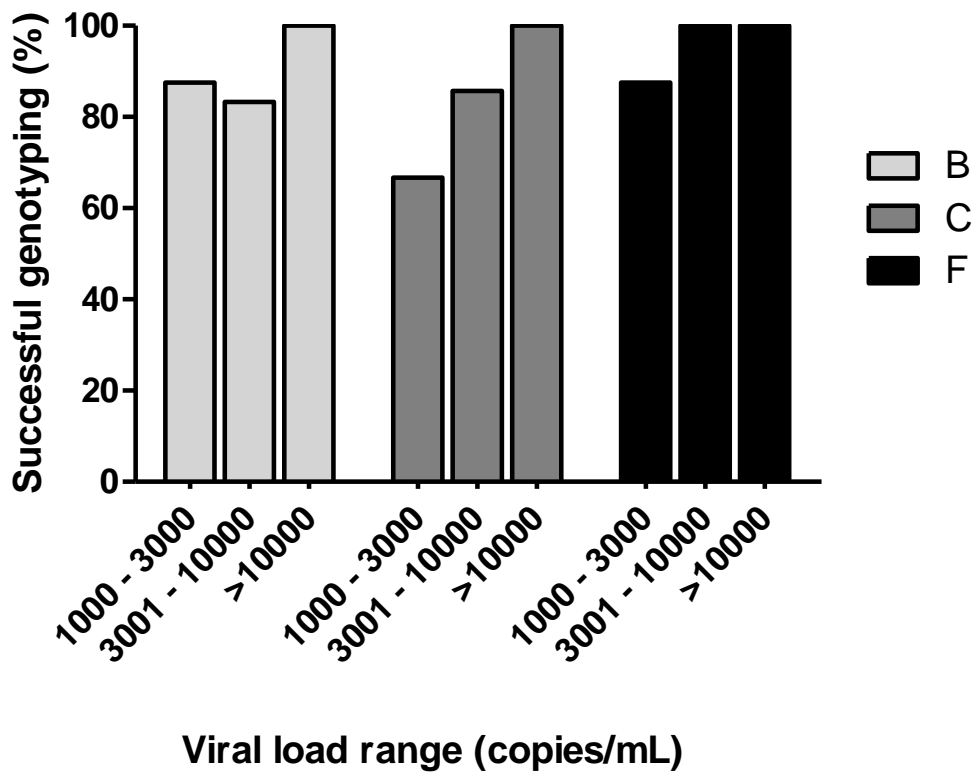
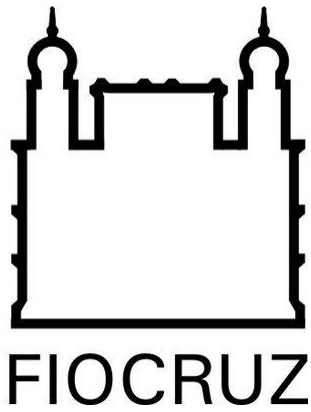


Table 1. Primers used for amplification and sequencing

| Fragment | Primer name | Sequence (5' > 3') | Position based on HXB2 isolate |
|------------------|-------------|------------------------------|--------------------------------|
| Single round PCR | | | |
| | RT7 (F) | CATGGGTACCAGCAC | 4150-4165 |
| | INT6 (R) | GGGATGTGTACTTCTGAACTT | 5193-5213 |
| Rescue PCR | | | |
| | RT2 (F) | ATTGGAGGAAATGAACAAGTAGA | 4173-4195 |
| | MMINT9 (R) | TGTCCCTGTAATAAACCCGAAAATTTTG | 4890-4917 |
| Sequencing | | | |
| | INT3 (F) | CCCTACAATCCCCAAAGTCAAG | 4653-4674 |
| | INT4 (R) | CTTGACTTTGGGGATTGTAGGG | 4653-4674 |
| | SCCOAS (R) | TATTCTTTCCCCTGCACTGTA | 4809-4829 |

F: Forward primer, R: Reverse primer



PBG Int

Plataforma Brasileira de Genotipagem da Integrase

Manual de utilização da técnica

Versão 1.0

[2011]



Índice

| | |
|--|-----------|
| INTRODUÇÃO..... | 01 |
| EXPLICAÇÃO DO TESTE..... | 04 |
| CONTEÚDO DO KIT E CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO..... | 06 |
| MATERIAL NECESSÁRIO | 09 |
| PROCEDIMENTOS DO ENSAIO..... | 11 |
| Extração do RNA viral..... | 12 |
| Retrotranscrição do RNA viral | 15 |
| Amplificação..... | 17 |
| Purificação dos produtos amplificados..... | 19 |
| Quantificação do produto purificado..... | 21 |
| Resgate das amostras negativas..... | 23 |
| Reação de sequenciamento..... | 25 |
| Precipitação da reação de sequenciamento..... | 27 |
| Preparo do sequenciador..... | 28 |
| Edição das sequências..... | 33 |
| Interpretação do resultado..... | 39 |
| Referências bibliográficas..... | 41 |
| EQUIPE ENVOLVIDA NO PROJETO..... | 43 |

[Introdução]



O processo de integração do HIV-1 é uma etapa essencial para o ciclo de replicação viral. A integrase é a enzima viral responsável por catalisar esta reação. Por este motivo e por não possuir um equivalente na célula hospedeira, é considerada um alvo terapêutico importante para o tratamento da infecção pelo HIV.

O raltegravir foi o primeiro inibidor de integrase aprovado pelo FDA em outubro de 2007 para ser usado na terapia de resgate de pacientes multi-experimentados. Durante os ensaios clínicos, esta droga apresentou uma potente capacidade de inibir a replicação do HIV, levando a carga viral a níveis indetectáveis em poucas semanas (Grinsztejn et al., 2007; Steigbigel et al., 2008).

Apesar da potente capacidade do raltegravir de suprimir a replicação viral, sua barreira genética é baixa. Devido a isso, mutações emergem rapidamente após a ocorrência de falha virológica. Três mutações principais foram descritas: N155H, Q148H/K/R, e Y143R, e além destas, mutações acessórias costumam emergir para compensar a perda do *fitness* viral (Cooper et al., 2008).

A genotipagem do HIV vem sendo amplamente usada para determinar as mutações de resistência às drogas antirretrovirais, fornecendo subsídio para a conduta terapêutica dos pacientes em tratamento para a infecção pelo HIV.

No Brasil, o raltegravir passou a ser distribuído gratuitamente pelo Ministério da Saúde aos pacientes que necessitem de terapia de resgate em 2009. Contudo, métodos comerciais de genotipagem da integrase ainda não estão disponíveis no mercado para atender a necessidade dos pacientes que já estão em tratamento com esta nova droga.

O Laboratório de AIDS e Imunologia Molecular vem trabalhando no sentido de desenvolver um método de genotipagem da integrase desde 2005. Inicialmente, com um protocolo padronizado para análise de amostras de DNA, foi possível avaliar o polimorfismo da integrase em amostras brasileiras de HIV-1 de diferentes subtipos virais e evidenciar a ausência de resistência primária a inibidores de integrase (Passaes *et al.*, 2009).

Posteriormente, com a introdução de inibidores de integrase na terapia antiretroviral de resgate, iniciamos a padronização do método a partir de amostras de plasma de pacientes e estamos demonstrando a ocorrência de mutações de resistência ao raltegravir em pacientes sob tratamento em esquema contendo essa droga (Passaes *et al.* 2010, Abstract WEAB0205, AIDS 2010).

O método de genotipagem da integrase foi aprimorado e avaliado quanto a sua sensibilidade e estabilidade, visando o estabelecimento de um kit *in-house* para a testagem na micro-rede de genotipagem, coordenada pelo Departamento de DST, AIDS e Hepatites Virais do Ministério da Saúde do Brasil. Futuramente, este método será utilizado pela Rede Nacional de Genotipagem (RENAGENO).

Este manual visa apresentar o método, bem como descrever os procedimentos para sua realização.

Dra Mariza Gonçalves Morgado

Coordenadora do projeto de desenvolvimento do kit de genotipagem da integrase do HIV-1

[Explicação do teste]



A terapia antirretroviral (TARV) contribuiu para uma redução expressiva nos níveis de morbidade e mortalidade dos pacientes infectados pelo HIV. Contudo, um dos principais desafios no tratamento destes pacientes é a emergência de mutações de resistência aos antirretrovirais. Esse mecanismo leva à falha terapêutica, ou seja, os vírus adquirem capacidade de se replicar mesmo na presença da droga e devido a isso, os pacientes deixam de responder ao tratamento.

O teste de genotipagem consiste na análise do material genético dos vírus a fim de identificar a presença de mutações que possam conferir resistência a determinadas drogas. Com base no resultado do teste, o médico tem recursos para identificar quais drogas não possuem efeito naquele paciente e com isso, determinar qual é a conduta terapêutica mais adequada.

O kit de genotipagem da integrase do HIV-1 foi desenvolvido para identificar mutações de resistência aos inibidores de integrase em pacientes que estejam em um regime terapêutico que contenha esta classe de drogas.

Este ensaio baseia-se no sequenciamento de aproximadamente 1100pb do gene pol, cobrindo toda a região da integrase.

O procedimento consiste das seguintes etapas:

1. Extração do RNA viral;
2. Retrotranscrição;
3. Amplificação;
4. Sequenciamento automatizado;
5. Análise das mutações.

[Conteúdo do Kit e condições de armazenamento]



O kit é composto de três caixas de reagentes, contendo material suficiente para a realização de 50 testes.

CAIXA 1: ARMAZENAR A -20°C

| REAGENTE | FABRICANTE |
|--|-------------------------|
| ✓ RT MIX | Ver composição – pág. 8 |
| ✓ RNaseOUT™ | LIFE TECHNOLOGIES |
| ✓ DTT | LIFE TECHNOLOGIES |
| ✓ 5X first-strand buffer | LIFE TECHNOLOGIES |
| ✓ SuperScript III® Reverse Transcriptase | LIFE TECHNOLOGIES |
| ✓ PCR MIX | Ver composição – pág. 8 |
| ✓ Platinum® Taq DNA Polimerase | LIFE TECHNOLOGIES |
| ✓ SEQ MIX 1 | Ver composição – pág. 8 |
| ✓ SEQ MIX 2 | Ver composição – pág. 8 |
| ✓ SEQ MIX 3 | Ver composição – pág. 8 |
| ✓ SEQ MIX 4 | Ver composição – pág. 8 |
| ✓ SEQ MIX 5 | Ver composição – pág. 8 |
| ✓ Low DNA Mass Ladder | LIFE TECHNOLOGIES |

CAIXA 2: ARMAZENAR A -70°C

- ✓ Controles positivo e negativo

CAIXA 3: ARMAZENAR A TEMPERATURA AMBIENTE

- ✓ Kit de extração de RNA - QIAamp® Viral RNA Mini Kit, QIAGEN
(atentar para as condições de estocagem dos reagentes após abertura do kit)
- ✓ Kit de purificação dos produtos amplificados - illustra™ GFX™ PCR DNA Purification Kit – GE HealthCare

COMPOSIÇÃO DOS MIXES FORNECIDOS

1) RT MIX:

- ✓ Iniciador específico - LIFE TECHNOLOGIES
- ✓ dNTPs - LIFE TECHNOLOGIES

2) PCR MIX:

- ✓ 10X *PCR Buffer* - LIFE TECHNOLOGIES
- ✓ Cloreto de Magnésio 50mM - LIFE TECHNOLOGIES
- ✓ Iniciadores específicos - LIFE TECHNOLOGIES
- ✓ dNTPs - LIFE TECHNOLOGIES
- ✓ Água DEPC - LIFE TECHNOLOGIES

3) PCR II MIX:

- ✓ 10X *PCR Buffer* - LIFE TECHNOLOGIES
- ✓ Cloreto de Magnésio 50mM - LIFE TECHNOLOGIES
- ✓ Iniciadores específicos - LIFE TECHNOLOGIES
- ✓ dNTPs - LIFE TECHNOLOGIES
- ✓ Água DEPC - LIFE TECHNOLOGIES

4) SEQ MIX 1-5:

- ✓ Big Dye Terminator v.3.1 – Applied Biosystems
- ✓ 5X *Sequencing Buffer* – Applied Biosystems
- ✓ Iniciador específico - LIFE TECHNOLOGIES

[Material necessário]



Material Fornecido

- ✓ Placa de sequenciamento
- ✓ Água DEPC
- ✓ TBE10X (diluir para 1X)

Material Não Fornecido

- ✓ Ponteiras com barreira 10 μ l
- ✓ Ponteiras com barreira 20 μ l
- ✓ Ponteiras com barreira 200 μ l
- ✓ Ponteiras com barreira 1000 μ l
- ✓ Microtubo 0,2mL
- ✓ Microtubo 0,5mL
- ✓ Microtubo 1,5mL
- ✓ Tubo plástico 15mL
- ✓ Tubo plástico 50mL
- ✓ Pipetas de 10, 20, 200 e 1000 μ l
- ✓ Centrífuga
- ✓ Centrífuga de placas
- ✓ Estantes para tubos e microtubos
- ✓ Vortex
- ✓ Etanol P.A.
- ✓ Isopropanol P.A.
- ✓ Cooler para tubos de 0,2 e 1,5mL
- ✓ Termociclador
- ✓ Sistema de eletroforese para gel de agarose
- ✓ Transiluminador acoplado a sistema fotográfico
- ✓ Sequenciador ABI 3100 Analyzer
- ✓ Pipeta multicanal 10 e 100 μ l
- ✓ Geladeira (2 a 8°C)
- ✓ Freezer (-20°C)
- ✓ Freezer (-70°C)
- ✓ Fluxo laminar
- ✓ Capela (com luz UV)

[Procedimentos do Ensaio]



Extração do RNA viral

A extração será feita com o QIAamp® Viral RNA Mini Kit, QIAGEN.

USANDO LUVAS, LIMPAR TODAS AS
PIPETAS E A ÁREA DE TRABALHO
COM ETANOL 70%.

PREPARAÇÃO

1. Dissolver o precipitado do Buffer AVL, se houver, colocando no banho-maria a 80°C por no máximo 5 minutos.
2. Verificar se o Buffer AVL *carrier*, Buffer AW1 e Buffer AW2 foram preparados de acordo com as instruções do fabricante.

NOTA:

1) Ressuspensão do Carrier RNA liofilizado: adicionar 310µL do *buffer* AVE ao tubo do *Carrier* RNA liofilizado. Homogeneizar por inversão cuidadosamente. Aliquotar 56µL do *Carrier* RNA ressuspenso em 5 microtubos de 0,5mL. Armazenar a -20°C e não ultrapassar 3 ciclos de congelamento e descongelamento para cada alíquota.

2) Preparo do Buffer AVL contendo o Carrier RNA: No momento da utilização, adicionar o volume do *buffer* AVL correspondente ao número de amostras num tubo plástico de 15mL. Retirar o volume de *Carrier* RNA apropriado e misturar com o *buffer* AVL previamente aliquotado no tubo plástico de 15mL. Homogeneizar por inversão. A tabela a seguir facilita o preparo do *buffer* AVL + *Carrier* RNA para diferentes quantidades de amostras.

| Nº de amostras | Vol. <i>buffer</i> AVL (mL) | Vol. <i>Carrier</i> RNA-AVE (µL) |
|----------------|-----------------------------|----------------------------------|
| 1 | 0,56 | 5,6 |
| 2 | 1,12 | 11,2 |
| 3 | 1,68 | 16,8 |
| 4 | 2,24 | 22,4 |
| 5 | 2,80 | 28 |
| 6 | 3,36 | 33,6 |
| 7 | 3,92 | 39,2 |
| 8 | 4,48 | 44,8 |
| 9 | 5,04 | 50,4 |
| 10 | 5,60 | 56,0 |
| 11 | 6,16 | 61,6 |
| 12 | 6,72 | 67,2 |
| 13 | 7,28 | 72,8 |

3) Preparo do Tampão AW1: Antes de usar pela primeira vez, adicionar 25mL de etanol (96-100%) e marcar o frasco como indicado no rótulo.

4) Preparo do Tampão AW2: Antes de usar pela primeira vez, adicionar 30mL de etanol (96-100%) e marcar o frasco como indicado no rótulo.

3. Organizar e numerar os tubos e colunas (para cada amostra: 1 coluna com tubo coletor; 2 microtubos de 1,5 mL; 3 tubos coletores do kit).
4. Descongelar as amostras de plasma a temperatura ambiente.
5. Homogeneizar as amostras de plasma no vórtex durante 3 segundos.
6. Centrifugar durante 5 segundos a 9000rpm para reunir o conteúdo no fundo do tubo.
7. Manter o plasma no gelo até o momento da utilização.
(Não utilizar plasma colhido em tubo de heparina, somente EDTA).

ISOLAMENTO DO RNA VIRAL DO HIV-1

***EVITAR** tocar a coluna de sílica com a ponteira para que não ocorra desprendimento de partículas ou que a membrana seja danificada.
SEMPRE pipetar os reagentes no centro da coluna para que sejam distribuídos de forma homogênea*

- a) Pipetar **560µL** do (**Buffer AVL + Carrier RNA**) nos tubos de 1,5mL previamente identificados.
- b) Homogeneizar o plasma com o auxílio de uma pipeta. Adicionar **140µL** do plasma já homogeneizado ao seu respectivo microtubo contendo o *buffer* AVL + Carrier RNA.
 - Vortexar por 15 segundos.
- c) Incubar a temperatura ambiente por **10 minutos**.
 - Centrifugar durante 5 segundos a 9000rpm para remover o líquido da tampa.
- d) Adicionar **560µL** de **etanol absoluto** (96-100%) à amostra e agitar em vórtex por 15 segundos.
 - Centrifugar durante 5 segundos a 9000rpm para remover o líquido da tampa.

- e) Aplicar cuidadosamente **630µL** da **mistura** na coluna (inserida em um tubo coletor de 2mL) sem molhar a borda. Fechar a tampa e centrifugar a **8000rpm por 1 minuto**. Colocar a coluna em um tubo coletor limpo e descartar o tubo contendo o filtrado.
- f) Abrir cuidadosamente a coluna e repetir o passo anterior, aplicando os **630µL** restantes da mistura na coluna.
- g) Abrir cuidadosamente a coluna e adicionar **500µL** do *buffer AW1* sem molhar a borda. Fechar a tampa e centrifugar a **8000rpm por 1 minuto**. Colocar a coluna em um tubo coletor de 2mL e descartar o tubo coletor contendo o filtrado.
- h) Abrir cuidadosamente a coluna e adicionar **500µL** do *buffer AW2* sem molhar a borda. Fechar a tampa e centrifugar a **14000rpm por 3 minutos**.
 - Se por trepidação houver contato do filtrado com a coluna, lavar com *buffer AW2*, colocando a coluna em um novo tubo de 1,5mL (um tubo comum com a tampa cortada) e descartar o tubo coletor com o filtrado. Centrifugar a **14000rpm por 1 minuto**.
- i) Colocar a coluna em um novo tubo de 1,5mL e descartar o tubo coletor contendo o filtrado. Abrir cuidadosamente a coluna e adicionar **60µL** do *buffer AVE* (recomendado para estocagem).
- j) Incubar a temperatura ambiente por **1 minuto** e então centrifugar a **8000 rpm por 1 minuto** para eluição do RNA viral.
- k) Após a eluição, colocar os tubos contendo o RNA extraído imediatamente no gelo.
- l) Quando o procedimento terminar, prosseguir para a **retrotranscrição** (mantendo o RNA no gelo) ou armazenar o **RNA a -70°C**.

Retrotranscrição do RNA viral

PREPARAÇÃO:

1. Manter todos os reagentes a 2-8°C ou no gelo durante **TODO** o procedimento.
2. Rotular um tubo de reação de 0,2 mL para cada amostra.
3. Descongelar os reagentes RT MIX, 5X FS *Buffer* e DTT.
Homogeneizar no vórtex durante 3 segundos.
4. Retirar os reagentes RNaseOUT™ e a SuperScript III® do kit.
5. Centrifugar todos os tubos de reagentes e as amostras durante 5 segundos a 9000rpm para reunir o conteúdo no fundo do tubo.

RETROTRANSCRIÇÃO DO RNA VIRAL DO HIV-1

OBS.: Programar o termociclador antes da preparação da reação. Consultar o manual de utilização do termociclador para obter instruções detalhadas sobre a programação.

a) Preparar o **MIX1** em um tubo de **0,5 mL** (preparar volume para 1 reação extra):

| N° de reações | Componentes (µL) | | | | Volume final |
|---------------|------------------------|-----------------------|------------|------------------------|--------------|
| | 5X FS <i>Buffer</i> | RNaseOUT™ (40U/µL) | DTT (0,1M) | SuperScript III® RT | |
| 1 | 4 | 1 | 1 | 1 | 7 |
| 2 | 8 | 2 | 2 | 2 | 14 |
| 3 | 12 | 3 | 3 | 3 | 21 |
| 4 | 16 | 4 | 4 | 4 | 28 |
| 5 | 20 | 5 | 5 | 5 | 35 |
| 6 | 24 | 6 | 6 | 6 | 42 |
| 7 | 28 | 7 | 7 | 7 | 49 |
| 8 | 32 | 8 | 8 | 8 | 56 |
| 9 | 36 | 9 | 9 | 9 | 63 |
| 10 | 40 | 10 | 10 | 10 | 70 |
| 11 | 44 | 11 | 11 | 11 | 77 |
| 12 | 48 | 12 | 12 | 12 | 84 |
| 13 | 52 | 13 | 13 | 13 | 91 |

- b) Adicionar em cada tubo de 0,2mL, nomeado previamente, **3 μ L** do **RT MIX**.
- c) Descongelar as amostras de RNA, caso estejam congeladas.
- d) Adicionar **10 μ L do RNA** de cada amostra ao tubo correspondente.
- e) Em um termociclador previamente programado, aquecer o **RTMIX + RNA** a **65°C por 5 minutos** e colocar imediatamente no **cooler** ou no **gelo por 1 minuto**.
- f) Adicionar **7 μ L do MIX1** a cada tubo de reação de 0,2 mL e misturar pipetando vagarosamente.
- g) Tampar e colocar imediatamente os tubos de reação no termociclador configurado com a seguinte ciclagem:

| Temperatura (°C) | Tempo | Procedimento |
|------------------|------------|----------------------|
| 55 | 60 minutos | Transcrição Reversa |
| 70 | 15 minutos | Inativação da enzima |
| 4 | ∞ | Manutenção do cDNA |

- h) Quando o programa terminar, **prosseguir para a PCR** ou armazenar o **cDNA a -20°C**.

Amplificação

PREPARAÇÃO:

1. Se as amostras de cDNA estiverem congeladas, descongelá-las a temperatura ambiente.
2. Descongelar o **PCR MIX**.
Homogeneizar no vórtex durante 3 segundos.
3. Retirar a enzima **Platinum[®] Taq DNA Polymerase**, e colocar no *cooler* ou gelo.
4. **Centrifugar** o PCR MIX durante 5 segundos a 9000rpm para reunir o conteúdo no fundo do tubo.

AMPLIFICAÇÃO da região da integrase do HIV-1

OBS.: Programar o termociclador antes da preparação da reação. Consultar o manual de utilização do termociclador para obter instruções detalhadas sobre a programação.

a) Preparo do MASTER MIX da PCR

Em um microtubo estéril de 1,5mL, adicionar os seguintes componentes:

| Nº de reações | Componentes (µL) | | |
|---------------|------------------|--------------------------------------|--------------|
| | PCR MIX | Platinum [®] Taq DNA Pol | Volume final |
| 1 | 29,7 | 0,3 | 30 |
| 2 | 59,4 | 0,6 | 60 |
| 3 | 89,1 | 0,9 | 90 |
| 4 | 118,8 | 1,2 | 120 |
| 5 | 148,5 | 1,5 | 150 |
| 6 | 178,2 | 1,8 | 180 |
| 7 | 207,9 | 2,1 | 210 |
| 8 | 237,6 | 2,4 | 240 |
| 9 | 267,3 | 2,7 | 270 |
| 10 | 297,0 | 3,0 | 300 |
| 11 | 326,7 | 3,3 | 330 |
| 12 | 356,4 | 3,6 | 360 |
| 13 | 386,1 | 3,9 | 390 |

OBS.: Preparar um volume suficiente para 1 reação extra para compensar perda de volume durante a pipetagem.

- b) Homogeneizar o MASTER MIX da PCR no vórtex por 3 segundos.
- c) Centrifugar durante 5 segundos a 9000rpm para reunir o conteúdo no fundo do tubo.
- d) Adicionar **30 μ L** do MASTER MIX da PCR nos tubos de 0,2 mL contendo o cDNA.
- e) Configurar o programa do termociclador da seguinte forma:

| Temperatura (°C) | Tempo | Ciclos |
|------------------|-------------|--------|
| 94 | 2 minutos | 1 |
| 94 | 20 segundos | |
| 56 | 45 segundos | 40 |
| 72 | 3 minutos | |
| 72 | 10 minutos | 1 |
| 4 | ∞ | 1 |

OBS.: Quando for pedido pelo equipamento, definir o volume de reação como 50 μ L.

- f) Transferir os tubos para o termociclador e iniciar o programa.
- g) Quando o programa estiver concluído:
- Prosseguir para os passos da purificação, ou
 - Parar e conservar as amostras a -20°C.

Purificação dos produtos amplificados

A purificação dos produtos da PCR será realizada utilizando o kit *illustra™ GFX™ PCR DNA Purification Kit* – GE HealthCare.

PREPARAÇÃO

1. Organizar e identificar os tubos e colunas (para cada amostra: 1 coluna com tubo coletor, 2 tubos de 0,5mL e 1 tubo de 1,5mL).
2. Verificar se o *Wash buffer type 1* foi preparado corretamente.

NOTA:

1) **Preparo do *Wash buffer type 1* (tampa amarela):** Antes de usar pela primeira vez, adicionar 100mL de etanol absoluto (100%). Misturar por inversão. Indicar no local adequado do rótulo a adição de etanol.

3. Se as amostras (produto da amplificação) estiverem congeladas, descongelá-las à temperatura ambiente.

PROCEDIMENTO

- a) Adicionar **250µL do *Capture buffer type 3*** nos tubos de 0,5mL .
- b) Adicionar os **50µL do produto de amplificação** de cada amostra nos tubos de 0,5mL previamente rotulados e misturar pipetando vagarosamente.
- c) Transferir a mistura ***Capture buffer type 3* + produto de amplificação** para a coluna.
Centrifugar a 14000rpm por 30 segundos.
- d) Descartar o conteúdo do tubo e colocar a coluna no mesmo tubo coletor.
- e) Adicionar 250µL do ***Wash buffer type 1***.
Centrifugar a 14000rpm por 30 segundos.
- f) Transferir a coluna para um tubo de 1,5mL limpo.
- g) Adicionar 40µL do ***Elution buffer type 6*** na coluna e incubar por 1 minuto a temperatura ambiente.
- h) Centrifugar por 14000rpm por 1 minuto.

- i) Transferir o líquido eluído para um tubo de 0,5mL previamente identificado.
- j) Quando a purificação estiver concluída:
 - Prosseguir para a etapa de quantificação, ou
 - Conservar as amostras a uma temperatura de -20°C .

Quantificação do produto purificado

Quantificar o DNA purificado em gel de agarose 2% utilizando o Low DNA Mass Ladder como marcador.

NOTA:

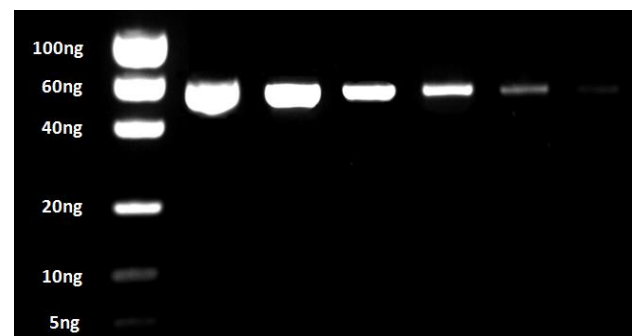
1) Preparo do gel de agarose 2% (volume de 100mL): Pesar 2g de agarose e adicionar num erlenmeyer contendo 100mL de tampão TBE 1X. Aquecer em forno de microondas até dissolver a agarose. **CORAR O GEL COM BROMETO DE ETÍDEO ANTES OU APÓS A CORRIDA DE ACORDO COM O PROTOCOLO ESTABELECIDO NO LABORATÓRIO.**

2) Preparo do Low DNA Mass ladder: Misturar 4 partes do Low DNA Mass ladder com 1 parte de tampão de corrida. Estocar a 2-8°C.

QUANTIFICAÇÃO DO PRODUTO DE AMPLIFICAÇÃO PURIFICADO

- Aplicar 2 μ L de amostra misturada com 1 μ L de tampão de corrida em cada poço do gel de agarose 2%.
- Aplicar 2 μ L do Low DNA Mass Ladder no poço adjacente a última amostra.
- Submeter o gel à eletroforese (10V/cm até que o azul de bromofenol tenha migrado pelo menos 5 cm).
- Fotografar o gel, expondo à luz ultravioleta e utilizando um sistema de captura de imagem.
- Estimar a quantidade de DNA de cada amostra comparando a intensidade da banda com a intensidade das bandas do padrão Low DNA Mass Ladder de acordo com a tabela e foto a seguir:

| Tamanho do fragmento (pb) | Quantidade estimada de DNA (ng) |
|---------------------------|---------------------------------|
| 2000 | 100 |
| 1200 | 60 |
| 800 | 40 |
| 400 | 20 |
| 200 | 10 |
| 100 | 5 |



- f) Diluir os produtos purificados da PCR de acordo com a quantificação, com base na tabela abaixo:

| Intensidade da banda correspondente a: | Fator de diluição | Cálculo da diluição | Quantidade de produto na reação (ng) |
|---|--------------------------|--|---|
| 5 a <20ng | Não diluir | Não diluir | 15 a 30 |
| 20ng | 1:2 | 15µL do produto purificado 15µL de água DEPC | 30 |
| >20 a <40ng | 1:3 | 10µL do produto purificado 20µL de água DEPC | 25 a 35 |
| 40 a <60ng | 1:4 | 7,5µL do produto purificado 22,5µL de água DEPC | 30 a 41 |
| 60 a <100ng | 1:6 | 5µL do produto purificado 25µL de água DEPC | 30 a 45 |
| 100ng | 1:8 | 4µL do produto purificado 26µL de água DEPC | 37,5 |

- g) Homogeneizar cada amostra diluída no vórtex durante 3 segundos.
- h) Centrifugar cada amostra durante 5 segundos por 9000rpm para remover gotículas da tampa.
- i) Terminada esta etapa:
- seguir para a etapa de sequenciamento, ou
 - congelar os produtos diluídos a -20°C.

Resgate de amostras negativas

Amostras que possuírem bandas no gel de agarose com intensidade próxima ou inferior a 5ng de DNA pela comparação com as bandas do padrão Low DNA Mass Ladder, deverão ser conduzidas para a reação de resgate, que consiste em uma segunda etapa de amplificação.

PREPARAÇÃO:

1. Descongelar o produto amplificado de cada amostra selecionada.
2. Descongelar o **PCR MIX II**.
Homogeneizar no vórtex durante 3 segundos.
3. Retirar a enzima **Platinum[®] Taq DNA Polymerase**, e colocar no *cooler* ou gelo.
4. **Centrifugar** o PCR MIX II durante 5 segundos a 9000rpm para reunir o conteúdo no fundo do tubo.

REAMPLIFICAÇÃO da região da integrase do HIV-1

OBS.: Programar o termociclador antes da preparação da reação. Consultar o manual de utilização do termociclador para obter instruções detalhadas sobre a programação.

- a) Preparo do MASTER MIX II da PCR: Em um microtubo estéril de 1,5mL, adicionar os seguintes componentes:

| Nº de reações | Componentes (µL) | | Volume final |
|---------------|------------------|-----------------------------------|--------------|
| | PCR MIX II | Platinum [®] Taq DNA Pol | |
| 1 | 44,7 | 0,3 | 45 |
| 2 | 89,4 | 0,6 | 90 |
| 3 | 134,1 | 0,9 | 135 |
| 4 | 178,8 | 1,2 | 180 |
| 5 | 223,5 | 1,5 | 225 |
| 6 | 268,2 | 1,8 | 270 |
| 7 | 312,9 | 2,1 | 315 |
| 8 | 357,6 | 2,4 | 360 |
| 9 | 402,3 | 2,7 | 405 |
| 10 | 447 | 3 | 450 |
| 11 | 491,7 | 3,3 | 495 |
| 12 | 536,4 | 3,6 | 540 |
| 13 | 581,1 | 3,9 | 585 |

OBS.: Preparar um volume suficiente para 1 reação extra para compensar perda de volume durante a pipetagem.

- b) Homogeneizar o MASTER MIX II da PCR no vórtex por 3 segundos.
- c) Centrifugar durante 5 segundos a 9000rpm para reunir o conteúdo no fundo do tubo.
- d) Adicionar **45µL** do MASTER MIX II da PCR nos tubos de 0,2 mL previamente identificados.
- e) Adicionar **5µL** do produto amplificado em cada tubo de 0,2mL correspondente.
- f) Configurar o programa do termociclador da seguinte forma:

| Temperatura (°C) | Tempo | Ciclos |
|------------------|-------------|--------|
| 94 | 2 minutos | 1 |
| 94 | 20 segundos | |
| 56 | 45 segundos | 32 |
| 72 | 3 minutos | |
| 72 | 10 minutos | 1 |
| 4 | ∞ | 1 |

OBS.: Quando for pedido pelo equipamento, definir o volume de reação como 50µL.

- g) Transferir os tubos para o termociclador e iniciar o programa.
- h) Quando o programa estiver concluído, correr gel de agarose 2% para verificar se houve amplificação (instruções de preparo e procedimento na página 21).
- i) Caso as amostras sejam positivas:
- prosseguir para a etapa de purificação.
 - parar e conservar as amostras a -20°C.
- j) Caso as amostras sejam negativas, encaminhar o plasma para o laboratório de referência em genotipagem da integrase (Laboratório de AIDS e Imunologia Molecular – IOC – FIOCRUZ).

Reação de sequenciamento

PREPARAÇÃO

1. Separar os produtos purificados.
2. Descongelar os **SEQ MIX** a temperatura ambiente.
Homogeneizar em vórtex durante 3 segundos.
Centrifugar a 9000rpm por 5 segundos para reunir o conteúdo no fundo do tubo.
3. Colocar os SEQ MIX imediatamente no *cooler* ou no gelo (Esses reagentes são foto sensíveis, prevenir a exposição excessiva à luz).
4. Separar uma placa MicroAmp Optical com 96 poços.

REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO

- a) Preencher a planilha indicando a posição de cada combinação de SEQ MIX e amostra.
- b) Para cada amostra serão realizadas **5 reações de sequenciamento**, utilizando cada um dos 5 SEQ MIX fornecidos.
- c) Em cada poço, adicionar:

| Componente | Volume/reação |
|--|---------------|
| Adicionar SOMENTE UM em cada reação SEQ MIX 1 a 5 | 4µL |
| Produto da PCR purificado (diluído ou não) | 6µL |
| Volume final da reação de sequenciamento: | 10µL |

- d) Vedar a placa com a cobertura plástica apropriada.
- e) Centrifugar a **900rpm por 1 minuto** a temperatura ambiente para concentrar os componentes da reação de sequenciamento no fundo do tubo.

- f) Iniciar a reação de sequenciamento utilizando um termociclador previamente configurado com a seguinte ciclagem:

| Temperatura (°C) | Tempo | Ciclos |
|-------------------------|--------------|---------------|
| 96 | 30 segundos | |
| 50 | 20 segundos | 25 |
| 60 | 4 minutos | |
| 4 | ∞ | 1 |

- g) Quando o programa terminar seguir para a etapa de precipitação.

Precipitação da reação de sequenciamento

PREPARAÇÃO

1. Preparar as soluções de isopropanol 70%.

NOTA:

1) Preparo da solução de Isopropanol 70% (10mL): Misturar 7mL de Isopropanol P.A. com 3mL de água DEPC em um tubo plástico de 50mL, misturar por inversão e estocar a temperatura ambiente. PREPARAR NO MOMENTO DA PRECIPITAÇÃO.

PRECIPITAÇÃO

- a) Adicionar **80µl de isopropanol 70%** em cada poço.
- b) Incubar a placa por **15 minutos** a temperatura ambiente, protegida da luz.
- c) Centrifugar a **4000rpm por 45 minutos** a temperatura ambiente.
- d) Verter o conteúdo da placa e centrifugar a mesma invertida sobre papel **absorvente a 900rpm por 1 minuto.**
- e) Secar a placa em termociclador a **75°C por 5 minutos.**
- f) Terminada esta etapa:
 - Ressuspender o pellet em **10µL de Hi-Di formamida**, aquecer no termociclador a **95°C por 5 minutos** e colocar imediatamente no gelo até o momento de colocar no sequenciador, ou
 - Armazenar a placa a **-20°C** sob abrigo da luz por no máximo **7 dias.**

Preparo do sequenciador

PREPARAÇÃO

1. Após ligar o computador, observar se os programas OrbixWeb Daemon e AE Server estão abertos (na barra inferior esquerda do Windows).
2. Ligar o sequenciador.
Espere a luz verde estabilizar.
3. Retire o Tampão com EDTA 10X e o POP6 da geladeira para ficarem a temperatura ambiente.
4. Coletar água ultrapura no dia do uso.
5. Preparar o Tampão 1X

NOTA:

1) **Preparo do Tampão 1X:** Diluir 2,5mL de Tampão com EDTA 10X em 22,5mL de água ultrapura.

6. Lavar todos os acessórios com água ultrapura morna (~40°C) e secar com bomba de vácuo ou lenços sem fiapos.

MONTAGEM DO EQUIPAMENTO

- a) Colocar os blocos de polímero (superior e inferior), as seringas com a quantidade de polímero POP6™ a ser utilizada.

NOTA:

A seringa pequena sempre deve estar com 250µL na montagem do sequenciador e os reservatórios (2 com água ultrapura e 2 com tampão EDTA 1X) nas suas posições conforme o manual do equipamento.

- b) Instale o set de capilar, pressionando a presilha e posicionando o pente nos locais adequados, e conecte a outra ponta do set de capilar com o bloco de polímero superior.
- c) Feche as portas do sequenciador e deixe a luz verde estabilizar.
- d) Abra o software Data Collection.
 - a. No menu TOOLS selecione a função **Perform Spacial Calibration**. Acione a opção **fill capillary** e pressione o ícone **start**. Após o término da calibração, desative o ícone **fill capillary** e pressione **start** novamente. Verifique se a calibração espacial ficou boa e pressione **OK**.

NOTA:

Calibração Espacial: Realizar o procedimento de calibração espacial de acordo com as instruções do fabricante. A calibração espacial deverá ser realizada sempre que se instalar um feixe de capilares no equipamento; depois de retirar temporariamente o feixe do bloco de detecção ou quando se mudar o equipamento de localização.

Calibração Espectral: Realizar o procedimento de calibração espectral de acordo com o conjunto de fluorocromos utilizada e as informações do fabricante. A calibração espectral deve ser realizada sempre que se utilizar um novo conjunto de fluorocromos no instrumento; depois que o laser ou a câmera CCD tenha sido realinhado por um engenheiro de serviço ou se você começar a ver uma diminuição na separação espectral (picos superior, inferior ou ambos)

PROCEDIMENTOS PARA A CORRIDA NO ABI PRISM® 3100

1. Atestar os reservatórios de água deionizada e de tampão 1X com EDTA para o analisador genético do equipamento.
2. Verificar se existem bolhas no bloco de polímero e nos respectivos canais e eliminá-las.
3. Verificar a cabeça de alinhamento para garantir que as pontas dos capilares não estão danificadas.
4. Verificar o nível do polímero na seringa de reserva de polímero para garantir que há polímero suficiente para todos os ensaios.
5. Verificar se o bloco de polímero encaixa bem no equipamento.
6. Limpar as superfícies do equipamento.

7. Verificar se existe polímero seco em redor do bloco de polímero e limpar se for o caso.
8. Verificar se há fugas em redor das seringas e da porca do parafuso.
9. Verificar se há espaço na base de dados. Apagar os registos de placas da base de dados do equipamento e arquivar as corridas anteriores.

PREPARAR A PLANILHA DE AMOSTRAS PARA A CORRIDA:

1. Com o *software Data Collection v 1.1* aberto ativar a página *Plate View*.
2. Acionar o botão *New*. Uma janela chamada *Plate Editor* será aberta.
3. Nomear a placa no campo *Plate Name*.
4. No item *aplicações*, escolher a opção *Sequencing*.
5. Em *Plate Type* seleccionar *96 Well*.
6. Acionar o botão *Finish*. A seguir, uma planilha para a discriminação das amostras será aberta.
7. Na coluna *Sample Name* digitar o nome das amostras, seguindo a nomenclatura específica e a coordenada específica do poço na placa:
Nome da Amostra_Primer

NOTA:

Iniciadores = SEQ1, SEQ2, SEQ3, SEQ4 e SEQ5. Para um mesmo paciente, no nome da amostra não pode variar. A única variável é o nome do iniciador.

8. Para cada uma das amostras listadas, seleccionar as seguintes opções:

| Parâmetro | Opção |
|------------------|--|
| Dye Set: | "Z" para v 3.1 do Big Dye |
| Mobility File: | "DT3100POP6{BDV3}.1.mob" para v 3.1 do Big Dye |
| BioLims Project: | "3100Project1" |
| Run Module: | "StdSeq50_POP6DefaultModule" |
| Analysis Module: | "BC-3100_SeqOffFtOff.saz" |

9. Acionar o botão “OK”, no canto direito inferior, ao terminar. As informações referentes a esta placa serão gravadas no banco de dados e o nome dado a esta placa aparecerá na lista *Pending Plate Records*.
10. Com as portas do instrumento fechadas, acionar o botão *Tray*.
11. Colocar a placa de amostras no autosampler. A placa pode ser colocada em qualquer das duas posições: A ou B.
12. A placa deve estar com as septas corretas, bem colocadas e planas.
13. Fechar as portas do instrumento. O autosampler retornará automaticamente à posição inicial, recolocando os capilares no tampão.
14. Executar o procedimento *Link Plate* na lista *Pending Plate Records*, marcar a placa recém criada com um clique sobre o nome. A janela *Plate View* possui um esquema representativo das posições “A” e “B” no autosampler. A posição que contém a placa de amostras estará marcada em amarelo. Para associar a placa, basta clicar na planilha programada e na posição A ou B em que estiverem as amostras, que mudará de amarelo para verde.
15. Fechar as portas do instrumento. O autosampler retornará automaticamente à posição inicial, recolocando os capilares no tampão.
16. Acionar *Run Instrument* na barra de ferramentas do *Data Collection*.

PROCEDIMENTOS PARA A DESMONTAGEM DO ABI PRISM 3100

1. Retire primeiro o set de capilar e depois os outros acessórios de suas posições.
2. Deixe a luz verde do sequenciador estabilizar e desligue-o.
3. Guarde o capilar com o último tampão utilizado na bandeja que fica sobre o sequenciador.
4. Lave todos os acessórios com água ultrapura morna (~40°C), seque com a bomba de vácuo ou lenços sem fiapos e guarde.
5. Desligue o computador.

NOTA:

Manutenção: Manter os equipamentos numa sala com uma temperatura ambiente de 15 a 30°C. As temperaturas fora deste intervalo, ou a umidade elevada, pode causar condensação, diminuição de desempenho e danos no equipamento. Periodicamente, realizar, de acordo com as instruções do fabricante, a manutenção necessária para o bom funcionamento do equipamento.

Limpeza: Limpar o líquido no ou em redor do autosampler com uma folha de papel absorvente que não deixe resíduos. Limpar os tabuleiros de recolhimento de pingos com água desionizada e uma folha de papel absorvente que não deixe resíduos. Limpar a acumulação de polímero (cristais) no equipamento e no autosampler com água desionizada e uma folha de papel absorvente que não deixe resíduos.

Edição das sequências

A visualização dos cromatogramas e a sequência final das amostras serão realizadas com a utilização do software Seqman (pacote de programas DNASTAR).

a) Ao final da corrida no sequenciador ABI PRISM 3100, são gerados arquivos editáveis com a extensão *.abi.

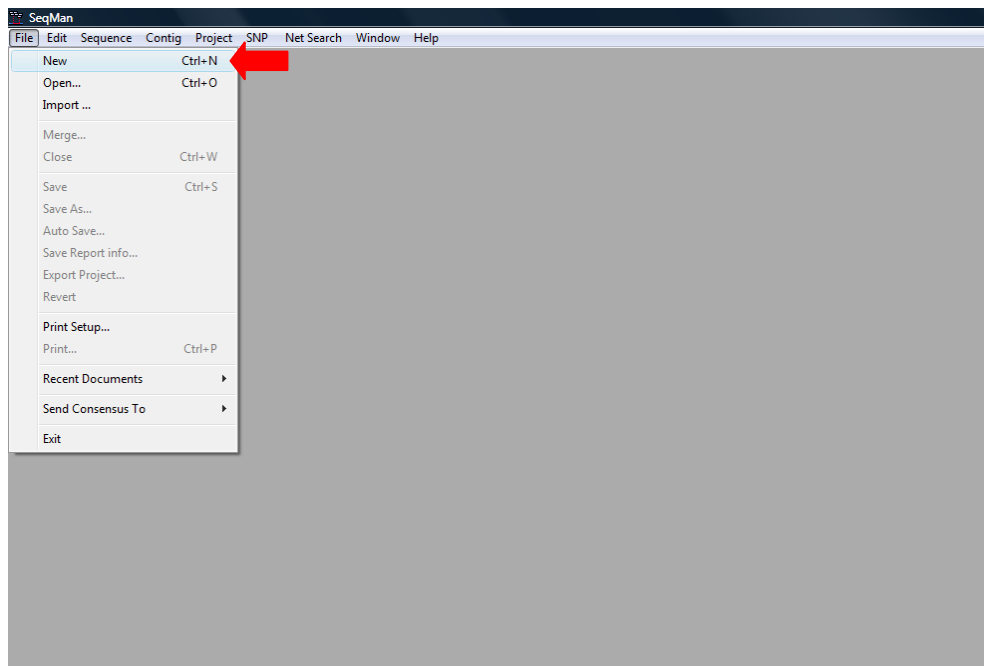
b) Esses arquivos deverão ser salvos em um CD de dados e posteriormente copiados para o computador que será utilizado na edição das sequências.

c) No computador que será utilizado para edição, criar uma pasta para cada amostra, onde serão salvos os arquivos *.abi, as sequências editadas e demais análises referentes àquela amostra.

d) Abrir o programa SeqMan.

e) Para editar novas sequências:

Clicar em **File >> New**

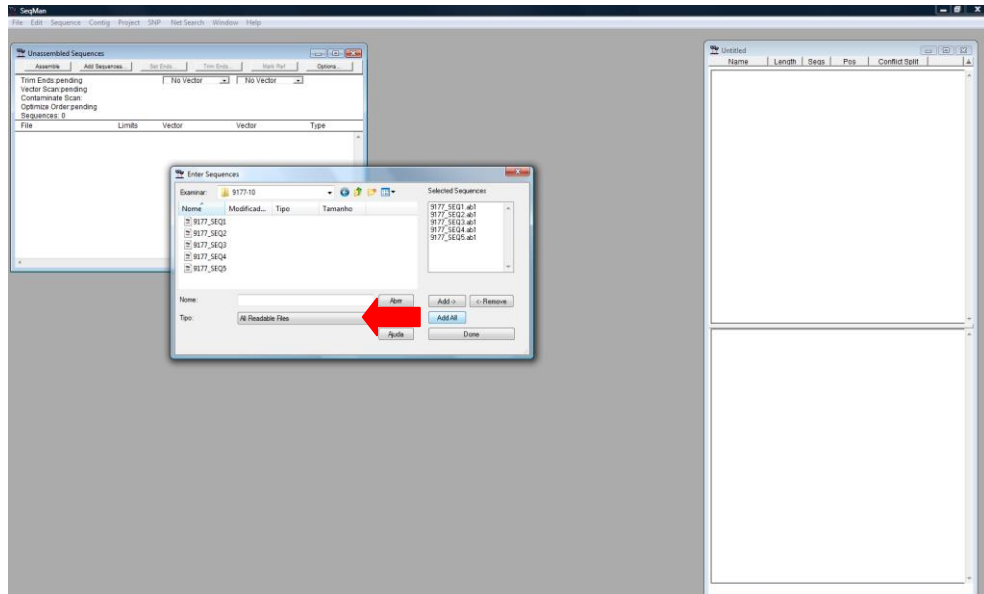


Na janela que é aberta, clicar em **Add sequences**

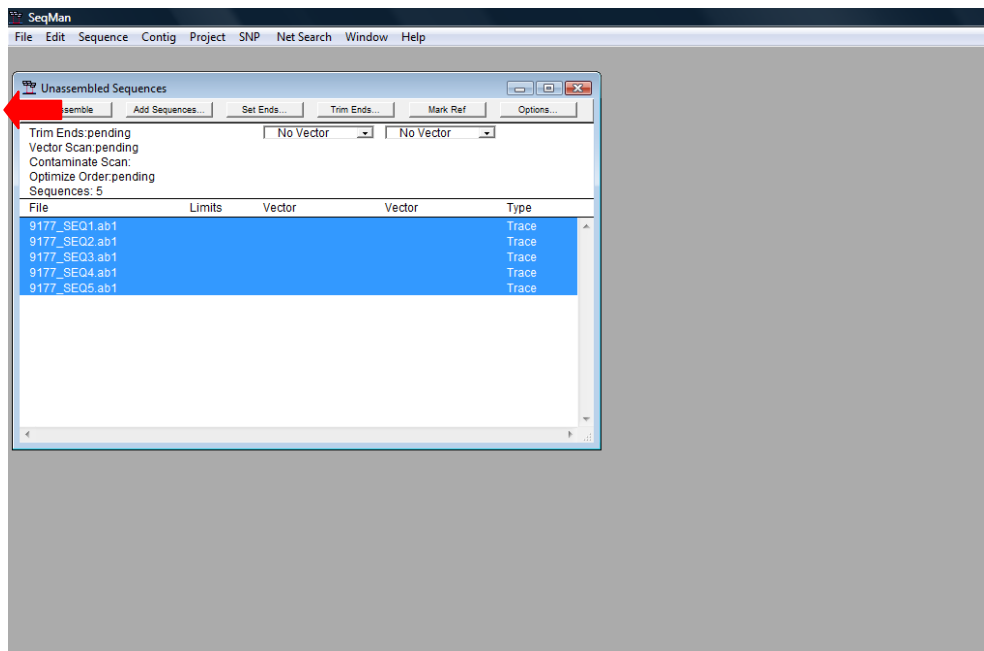
Selecionar a opção **ABI Trace Files (*.abi; *.ab1; *.abd)**

Add all

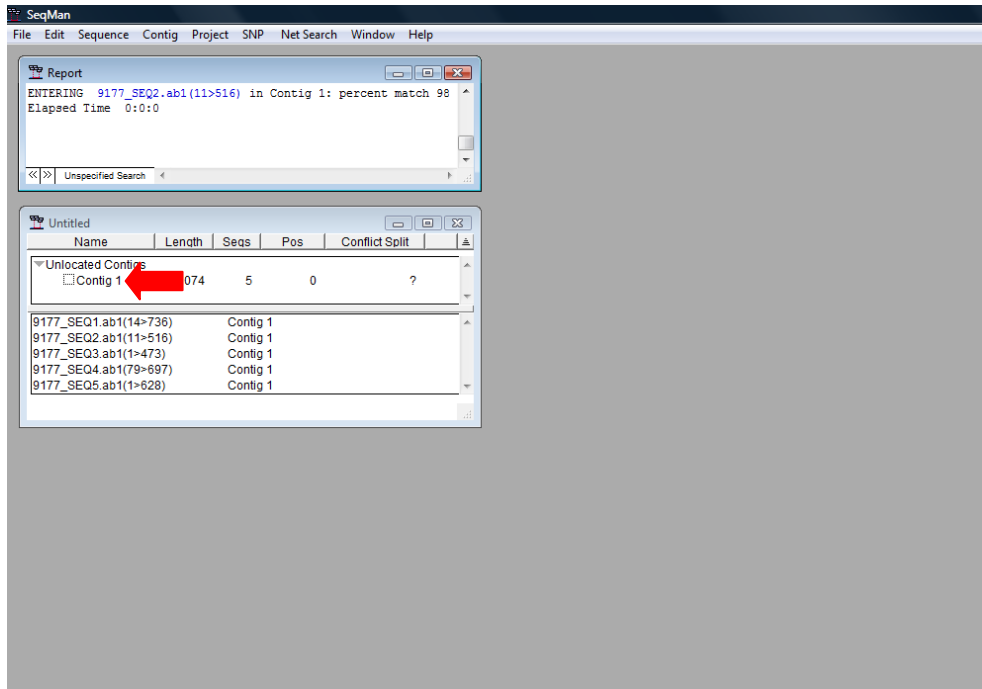
Done



Após adicionar as sequências, clicar em **Assemble**.



Dar um clique duplo em **Contig 1** e as sequências irão abrir



NOTA:

O sentido correto dos iniciadores é o seguinte:

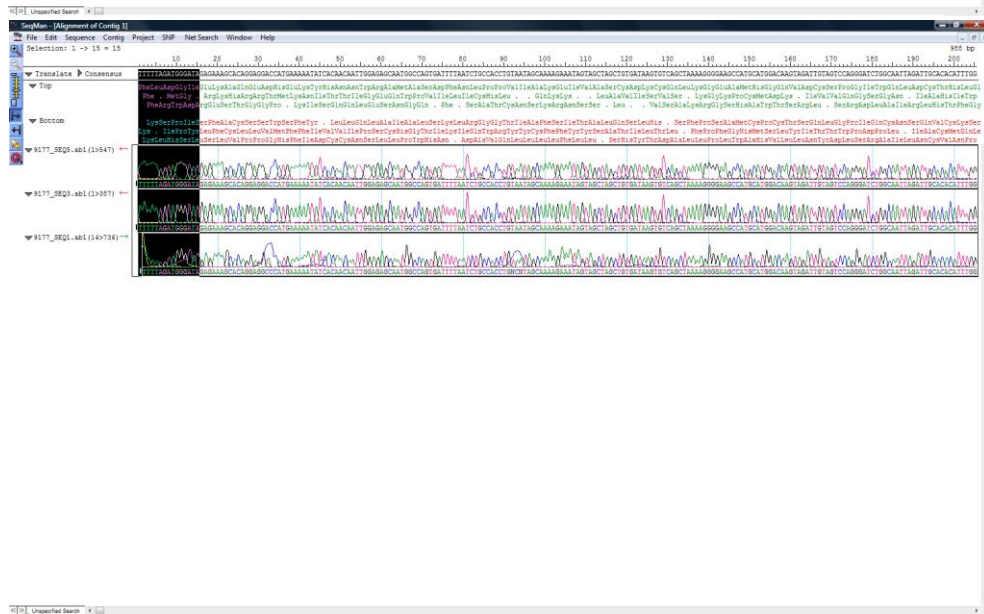


Se os iniciadores não estiverem no sentido correto, clicar em:

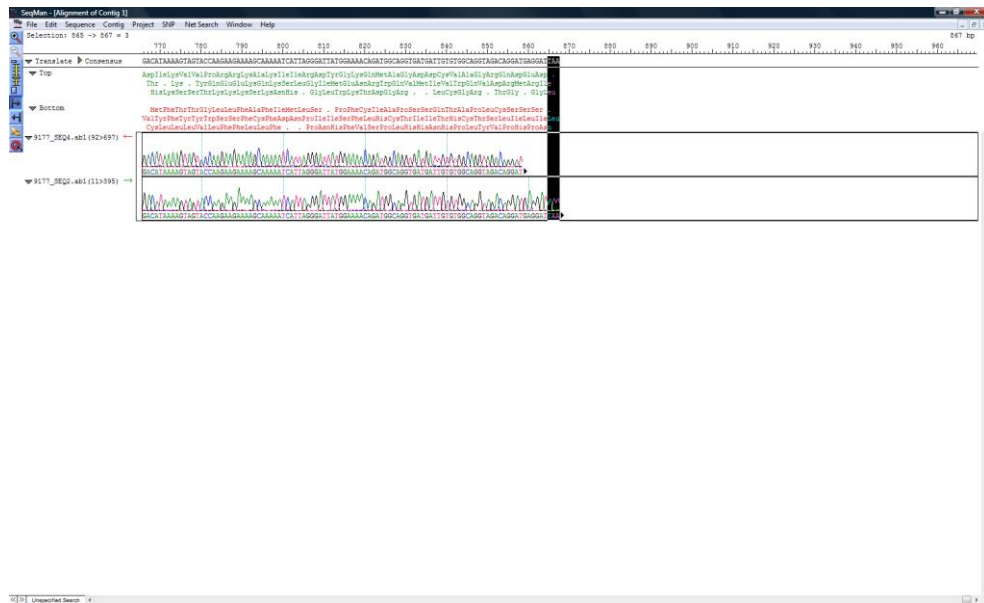
Contig >> Complement contig

Para que o sentido de leitura seja corrigido.

Para iniciar a edição da sequência, o primeiro passo é identificar o códon onde começa a integrarse. Clicar na seta ao lado da palavra *Translate*, na barra em que se encontra a sequência consenso. A sequência de aminoácidos irá aparecer para as 3 fases de leitura. Identificar a sequência de aminoácidos **Phe Leu Asp Gly Ile** e posicionar o início da sequência neste ponto.



O fim da sequência da integrase é marcado por um códon de parada (**TAA, TAG, TGA**) na posição 867.



Iniciar a edição manual observando atentamente cada nucleotídeo. Em caso de ambiguidade, ou seja, havendo mais de um nucleotídeo na mesma posição, utilizar os códigos IUPAC para representar as bases nitrogenadas.

| Código IUPAC | Base |
|--------------|-------------|
| R | A ou G |
| Y | C ou T |
| S | G ou C |
| W | A ou T |
| K | G ou T |
| M | A ou C |
| B | C ou G ou T |
| D | A ou G ou T |
| H | A ou C ou T |
| V | A ou C ou G |

NOTA:

Só considerar a utilização do código de ambiguidade caso o pico secundário corresponda a pelo menos 1/3 do pico majoritário. Cuidado para não confundir com o ruído.

Após completa edição das sequências, salva-las:

File >> Save

Na janela que abre:

Nomear o arquivo com a identificação da amostra analisada.

Salvar

Antes de fechar o arquivo, prosseguir para a etapa de interpretação do resultado.

Interpretação do resultado

No programa Seqman, selecionar toda a sequência

Edit >> Select All (Ctrl+A)

Analisar as mutações de resistência utilizando a ferramenta HIVdb Program (Genotypic Resistance Interpretation Algorithm, version 6.0.10), disponível no website <<http://hivdb.stanford.edu/>>

Clicar em **HIVdb Program – Genotype Resistance Interpretation**

Analysis sequences – Enter Complete Sequences

The screenshot displays the HIV Drug Resistance Database website. The main navigation bar includes: HOME, GENOTYPE-RX, GENOTYPE-PHENO, GENOTYPE-CLINICAL, and HIVdb PROGRAM. A red arrow points from the 'HIVdb PROGRAM' link in the navigation bar to the 'HIVdb PROGRAM' section on the page. This section contains a sub-menu with 'Genotype Resistance Interpretation' highlighted by a red box. A second red arrow points from this menu item to the 'ANALYSIS SEQUENCES' button in the 'Choose A Method' section, which also has a red box around it. The 'ANALYSIS SEQUENCES' button is labeled 'Enter Complete Sequences'.

Colar a sequência em **Text Input**, colocar o nome da amostra e clicar em **Analyze**.

STANFORD UNIVERSITY
HIV DRUG RESISTANCE DATABASE
A curated public database designed to represent, store, and analyze the divergent forms of data underlying HIV drug resistance.

HOME GENOTYPE-RX GENOTYPE-PHENO GENOTYPE-CLINICAL HIVdb PROGRAM

HIVdb Program: Sequence Analysis

Sequence information can be entered in FASTA, plain text, or GRF (Bayer Diagnostics) format. Sequences in FASTA format or plain text can be pasted in the text box (option A) or uploaded (option B). GRF files can only be uploaded (option C). Using options A or B, it is possible to analyze up to 100 sequences at a time (character limit: 600,000)

The output can be customized to display an analysis of sequence quality, mutation comments, mutation scores, and an optional identifier and date. For further explanations and sample datasets please see the [Release Notes](#).

Sequences

A Text Input
 Paste sequence text in the text box below:
 TTTTAGTGGATAGGAAACACAGGACCATGAAAATATCACACATTGGAGA
 GCATGGCCAGTGATTTAATCTGCCACCTGTAATAGCAAAAGAAATAGTACTAGCTG
 GATAAGTGTACAGTAAAAGGGGAAGCCATGCGATGGCAAGTAGATTGTAGTCCAGGGATC
 TGGCAATTAGATTGCACACATTTGGAGGGAAAGTTATCTTGGTAGCAGTCCATGTAGCT
 AGTGGTACTAGAAAGCAGAGATTATCCAGCAGAAACAGACAGAAACAGCCTACTTC
 ATACTAAATTAGCAGGAGATGGCASTAAAACATATACATACAGCAATGGCAGCAAT

B Text File Upload
 Choose a file to upload from your computer using the file selection box below.
 Procurar...

C GRF File Upload
 Choose a GRF (Bayer Diagnostics) file to upload from your computer using the file selection box below.
 Procurar...

Identifier (Optional) 9177/10
 Date (Optional) 08/12/2010

Output Analysis:
 QA Analysis Mutation Comments
 Mutation Scores

RESET ANALYZE

O laudo fornecido apresenta dados importantes com relação à qualidade da sequência analisada (inserções e deleções, presença de *stop codons* e *frame shifts*, inferência do subtipo viral).

Além disso, o laudo fornece informações sobre a resistência aos inibidores de integrase, indicando as mutações principais e acessórias, bem como a interpretação do nível de resistência a esses inibidores, de acordo com o algoritmo de análise.

STANFORD UNIVERSITY
HIV DRUG RESISTANCE DATABASE
A curated public database designed to represent, store, and analyze the divergent forms of data underlying HIV drug resistance.

HOME GENOTYPE-RX GENOTYPE-PHENO GENOTYPE-CLINICAL HIVdb PROGRAM

HIVdb: Genotypic Resistance Interpretation Algorithm
 Report: 9177/10 Date: 08/12/2010

Seq ID: 9177/10

Summary Data

Sequence includes IN: codons: 1 - 288
 There are no insertions or deletions
 Subtype and % similarity to closest reference isolate:
 1. IN: B (94.6%)

Sequence Quality Assessment

| Gene | QA Problem | Codons |
|------|----------------------------|--------|
| IN | Stop Codons, Frame Shifts: | None |
| IN | B,D,H,V,N: | None |
| IN | Unusual Residues: | 6, 286 |

Blue lines indicate differences from consensus B; tall blue lines indicate sites associated with drug resistance. Red lines indicate QA problems.

Drug Resistance Interpretation: IN

IN Major Resistance Mutations: G140S, Q148H
 IN Minor Resistance Mutations: None
 Other Mutations: D6T, K7E, S17N, L101I, S119T, T125A, I135V, T206S, I220V, D286E

Integrase Inhibitors
 elvitegravir (EVG) High-level resistance
 raltegravir (RAL) High-level resistance

Referências bibliográficas

Grinsztejn B, Nguyen BY, Katlama C, Gatell JM, Lazzarin A, Vittecoq D, Gonzalez CJ, Chen J, Harvey CM, Isaacs RD; Protocol 005 Team. Safety and efficacy of the HIV-1 integrase inhibitor raltegravir (MK-0518) in treatment-experienced patients with multidrug-resistant virus: a phase II randomised controlled trial. *Lancet*. 2007 Apr 14;369(9569):1261-9.

Steigbigel RT, Cooper DA, Kumar PN, Eron JE, Schechter M, Markowitz M, Loutfy MR, Lennox JL, Gatell JM, Rockstroh JK, Katlama C, Yeni P, Lazzarin A, Clotet B, Zhao J, Chen J, Ryan DM, Rhodes RR, Killar JA, Gilde LR, Strohmaier KM, Meibohm AR, Miller MD, Hazuda DJ, Nessly ML, DiNubile MJ, Isaacs RD, Nguyen BY, Teppler H; BENCHMRK Study Teams. Raltegravir with optimized background therapy for resistant HIV-1 infection. *N Engl J Med*. 2008 Jul 24;359(4):339-54.

Cooper DA, Steigbigel RT, Gatell JM, Rockstroh JK, Katlama C, Yeni P, Lazzarin A, Clotet B, Kumar PN, Eron JE, Schechter M, Markowitz M, Loutfy MR, Lennox JL, Zhao J, Chen J, Ryan DM, Rhodes RR, Killar JA, Gilde LR, Strohmaier KM, Meibohm AR, Miller MD, Hazuda DJ, Nessly ML, DiNubile MJ, Isaacs RD, Teppler H, Nguyen BY; BENCHMRK Study Teams. Subgroup and resistance analyses of raltegravir for resistant HIV-1 infection. *N Engl J Med*. 2008 Jul 24;359(4):355-65.

Passaes CB, Guimarães ML, Fernandez SL, Lorete R dos S, Teixeira SL, Fernandez JC, Morgado MG. Lack of primary mutations associated with integrase inhibitors among HIV-1 subtypes B, C, and F circulating in Brazil. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2009 May 1;51(1):7-12.

Caroline Pereira Bittencourt Passaes, Monick Lindenmeyer Guimarães, Sandra Wagner Cardoso, Veloso V, Grinsztejn B, Mariza Gonçalves Morgado. Monitoring the emergence of resistance mutations in patients under salvage therapy with Raltegravir in Rio de Janeiro, Brazil: a six month follow-up. *AIDS 2010*. Abstract WEAB0205.

QIAamp® Viral RNA Minikit Handbook. Third edition. Qiagen. 2010.

SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR. Bula. Invitrogen. 2004.

Platinum® Taq DNA Polimerase. Bula. Invitrogen. 2009.

illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit. Product booklet. GE Healthcare. 2008.

Low DNA Mass Ladder. Bula. Invitrogen. 2006.

BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit. Protocol. Applied Biosystems. 2002.

Manual Genetic Analyser ABI Prism 3100 – Applied Biosystems

Tommy F. Liu, Robert W. Shafer. Web Resources for HIV type 1 Genotypic-Resistance Test Interpretation. *Clin Infect Dis*. 2006 June 42(11):1608-1618.

[Equipe envolvida no projeto]



Dra Mariza Gonçalves Morgado – Coordenadora

Dra Monick Lindenmeyer Guimarães

MSc Caroline Pereira Bittencourt Passaes

MSc Edson Oliveira Delatorre

Contato com o Laboratório de AIDS e Imunologia Molecular

Telefones: (21) 3865-8106

(21) 3865-8130

Fax: (21) 3865-8173

Endereço:

Avenida Brasil, 4365

Pavilhão Leonidas Deane, sala 413 – Manguinhos

CEP: 21040-900, Rio de Janeiro – RJ – Brasil

3.5) Documento 5 - “*Integration in HIV controllers: lack of evidence of circular DNA accumulation*”

Autores: Caroline Pereira Bittencourt Passaes, Fernanda Heloise Cortes, Gonzalo Bello, Dunja Babic, Mark Sharkey, Carla Vorsatz, Beatriz Grinsztejn, Valdilea Veloso, Mario Stevenson, Mariza Gonçalves Morgado.

Manuscrito em preparação

A integração do genoma viral no cromossomo hospedeiro é uma etapa fundamental no ciclo de replicação dos retrovírus, no entanto existem poucos estudos investigando a associação do controle da replicação viral com os mecanismos de integração. Neste contexto, este trabalho tem por objetivo verificar a enzima integrase e avaliar se o processo de integração pode estar comprometido em uma coorte de pacientes controladores de elite e controladores virêmicos.

Neste trabalho foi estudado um grupo de pacientes controladores da infecção pelo HIV (controladores de elite - EC, n=11 e controladores virêmicos - VC, n=7), pacientes virgens de tratamento e com carga viral em níveis altos (n=21), e pacientes sob HAART com níveis indetectáveis de carga viral (n=17). Foram realizadas contagens de células T CD4+, TCD8+ e carga viral, além das análises moleculares da integrase e da quantificação de diferentes formas de DNA viral.

Não observamos mutações nos sítios relacionados à atividade catalítica da enzima. A quantificação de DNA episomal 2-LTR mostrou que não há um acúmulo de DNA circular nos pacientes controladores de elite, nos quais conseguimos detectar estas formas somente em dois dentre 11 pacientes (18%). A quantificação de DNA total e integrado foi significativamente menor nos pacientes EC quando comparada com os grupos de não controladores ($p < 0.001$) e pacientes em HAART ($p < 0.01$).

A integrase demonstrou-se altamente conservada entre os pacientes EC e VC analisados. Não detectamos acúmulo das formas circulares nos EC, o que sugere que não há um mecanismo intrínseco de restrição da integração nestes pacientes.

Integration in HIV controllers: lack of evidence of circular DNA accumulation

Running Title: Integration in HIV controllers

Caroline Pereira Bittencourt Passaes¹, Fernanda Heloise Cortes¹, Gonzalo Bello¹, Dunja Babic², Mark Sharkey², Carla Vorsatz³, Beatriz Grinsztejn³, Valdilea Veloso³, Mario Stevenson², Mariza Gonçalves Morgado¹.

¹ Laboratório de AIDS e Imunologia Molecular, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil.

² Department of Medicine, Miller School of Medicine, University of Miami, Miami, United States.

³ Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas - IPEC, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil.

*Corresponding author: Caroline Pereira Bittencourt Passaes

Address: Laboratório de AIDS e Imunologia Molecular, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ.

Av. Brasil 4365, Leonidas Deane Building, room 413.

Rio de Janeiro, Brazil. 21040-900

E-mail: cpassaes@ioc.fiocruz.br

Telephone number: 55-21-38658106 / Fax number: 55-21-38658173

Abstract

Background: Elite controllers (EC) are a rare group of infected patients that can naturally control HIV replication. Integration is an essential step in retroviruses replication cycle, however, few information is available correlating the integration mechanism and the control of HIV replication. The aim of this study was to investigate if HIV integrase is defective in a cohort of HIV controllers and evaluate if the integration process may be impaired in these patients.

Methods: HIV controllers (EC, n=11 and viremic controllers, n=7), treatment naïve viremic patients with high viral loads (n=21), and patients under suppressive HAART (n=17) were analyzed. Blood samples were drawn for CD4⁺ and CD8⁺ T cell counts, viral load (VL) measurements and PBMCs were purified for integrase analyses and viral DNA quantifications. The study was approved by the IRB.

Results: Integrase sequences were conserved among HIV controllers. The 2-LTR circles were detected in 2 out of 11 EC patients (18%). The proportion of patients with detectable 2-LTR circles in the EC group, however, was much lower than that of VC (7 out of 7 patients; 100%, p=0.006), treatment naïve (20 out of 21 patients; 92%, p=0.006) and HAART (17 out of 17 patients; 100%, p=0.007) groups. Total and integrated HIV DNA for the EC group was significantly lower in comparison to both the viremic (p < 0.001) and HAART (p < 0.01) groups.

Conclusions: Integrase is highly conserved among HIV controllers. Few mutations were observed, but the functional impact of such substitution must be further investigated. The lack of accumulation of 2-LTR circles does not support the existence of pre-integration restriction mechanisms in the cohort of EC here analyzed.

Key words: HIV-1 integrase, integration, HIV controllers, elite controllers, 2-LTR, HIV reservoir.

Introduction

Elite controllers (EC) or elite suppressors (ES) are a subgroup of HIV-infected patients characterized by the ability to maintain the viremia below detectable levels in the absence of antiretroviral therapy for prolonged periods of time. This group represents a rare percentage of HIV-infected patients, counting for less than 1% of infections worldwide, and has been considered an important and promising model for understanding the mechanisms behind the spontaneous control of HIV infection [Deeks and Walker, 2007].

The mechanisms involved in the control of HIV infection have been associated to both viral and host characteristics [Poropatich and Sullivan, 2011]. The study of the mechanisms involved in the control of HIV replication have long been described, however, there is few information available correlating the integration and the control of HIV replication. Integration is an essential step in retroviruses replication cycle and the integrase enzyme is responsible to catalyze the insertion of viral cDNA into the host chromatin [Chiu and Davies, 2004]. The key nature of this process suggests that the existence of mechanisms that block or diminish viral integration may influence HIV pathogenesis, thus affecting the formation of viral reservoirs and the control of HIV infection. The block of the integration process can be detected by the quantification of unintegrated DNA into the cell nucleus [Buzon et al., 2010; Schacker, 2010].

Little attention has been given to the detection of unintegrated DNA under conditions of naturally control of virus replication, as observed in EC patients. Recently, Graf et al have found that ES patients harbor low levels of integrated HIV DNA and high levels of 2-LTR circles suggesting an inefficient integration in ES cells [Graf et al., 2011]. Other studies recently published have been showing that cells from EC have

intrinsic mechanisms to restrict HIV infection, which seem to occur during the pre-integration steps [Bergamaschi et al., 2009; Chen et al., 2011; Saez-Cirion et al., 2011; Zhang et al., 2007]. Chen et al showed that T CD4⁺ cells of EC are less susceptible to HIV infection in comparison to HIV progressors and uninfected individuals, and associated the restriction mechanism, in part, to the upregulation of p21 (a cyclin-dependent kinase inhibitor recognized to restrict the early steps of HIV replication cycle) [Chen et al., 2011]. Other studies, however, observed the same phenomena of restriction, but it was not associated with any of p21, TRIM5 α or APOBEC3G mechanisms [Buzon et al., 2010; Saez-Cirion et al., 2011]. These studies, together, suggest that intrinsic inhibition of HIV integration process might play an important role for the ability of EC to control HIV replication.

The aim of the present study was to investigate if HIV integrase is defective in a cohort of HIV controllers and evaluate if the integration process may be impaired in these patients.

Patients and Methods

Patients

A well-established cohort of EC (n=11), and viremic controllers (VC) (n=7) patients has been followed-up at the Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (IPEC), Rio de Janeiro, Brazil. The criteria used to include patients in the cohort were as follows: EC are those patients with undetectable viral load in all measures during the follow-up period, or eventually presenting episodes of detectable viral load (blips) with sequentially control of HIV replication; and VC are those patients with detectable viral load in the low range (<2,000 copies/ml). A group of untreated non-controllers (NC) patients (n=21) with high viral load (>2,000 copies/mL) and a group of patients under

suppressive HAART (n=17) were also included as controls. Blood samples were drawn for T CD4⁺, T CD8⁺ cell counts and HIV-1 viral load (VL) measurement at the visit used for this study. PBMCs were separated by Ficoll density gradient and then used for the molecular analyses. The IPEC institutional review board approved this study and all patients have given written informed consent.

Methods

T CD4⁺, T CD8⁺ and viral load measures

T CD4⁺ and T CD8⁺ cells were measured by flow cytometry (FACS Calibur, BD) and HIV-1 viral load was determined using the bDNA method (Versant HIV-qRNA3.0 Assay, Bayer).

DNA extractions

For integrase analyses, DNA samples were extracted using a QIAamp DNA kit (Qiagen Inc., CA, U.S.A.), according to the manufacturer's protocol. For quantifications, total DNA was extracted from 20% of the PBMCs resuspended in 1 ml of DNazol (Invitrogen). DNA was precipitated by the addition of 500 µl of 100% ethanol. DNA was pelleted by centrifugation at 12000 rpm for 8 min, then washed in 1.4 ml of 70% ethanol and resuspended in 50 µl 8 mM NaOH. After resuspension, lysates were neutralized by the addition of 50 µl 10 mM Tris-HCl, pH 8.0.

Extracromosomal DNA was purified from 80% of the PBMCs using a modified plasmid isolation procedure (Qiagen). Chromosomal DNA was subsequently recovered from the SDS-precipitate by extraction with DNazol, as described above.

Amplification and sequencing of HIV integrase

Amplification of the integrase (*int*) genomic region was performed by a nested PCR using limiting dilutions replicates. Primers used are as follows: MMRT7 (CATGGGTACCAGCACAA)/ MMINT7 (CCTGTWTGCARMCCCCAATATGT) as

outer primers; and MMRT2 (ATTGGAGGAAATGAACAAGTAGA)/ MMINT6 (GGGATGTGTACTIONTCTGAACTT) as inner primers. The PCR products were purified using Illustra GFX PCR DNA purification kit (GE Healthcare) according to the manufacturer's protocol. Purified DNA was sequenced by using the ABI BigDye Terminator v.3.1 cycle sequencing ready reaction kit (Applied Biosystem, CA, U.S.A), and processed with an automated ABI 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystem).

Total and integrated HIV DNA quantification

HIV total DNA was measured by a single step real time PCR protocol in a 20 μ l reaction mix containing 2X TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems), 0.75 μ M primers M667 (5'-CTGGCTAACTAGGGAACCCACTG-3') and 4nr (5'-GTCTGAGGGATCTCTAGTTAC-3') and 0.3 μ M probe 2nr4nr (5'-AGCCTCAATAAAGCTTGCCTTGAGTGC-3'). Amplifications were performed in an Applied Biosystems 7500 Fast real-time PCR system. Standard curve was done with a plasmid containing two copies of HIV LTR and two copies of CCR5 gene. The values were normalized based on cell numbers estimated by CCR5 quantification. CCR5 was measured by a single step real time PCR protocol in a 20 μ l reaction mix containing 2X TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems), 0.75 μ M primers CCR5/f (5'-GCTGTCTTTGCGTCTCTCCAGGA-3') and CCR5/r (5'-CTCACAGCCCTGTGCCTTCTTTC-3') and 0.3 μ M probe 2nr4nr (5'-AGCAGCGGCAGGACCAGCCCAAG-3'). Integrated HIV DNA was estimated as described for total HIV quantification and the chromosomal fraction obtained during extrachromosomal extraction was used as a template.

HIV 2-LTR quantification

2-LTR was measured by a single step real time PCR protocol in a 30 μ l reaction mix containing 2X TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems), 0.5 μ M

primers C1 (5'-TAGACCAGATCTGAGCCTGGGA-3') and C4 (5'-GTAGTTCTGCCAATCAGGGAAG-3') and 0.2 μ M probe 2nr4nr (5'-AGCCTCAATAAAGCTTGCCTTGAGTGC-3'). Amplifications were performed in an Applied Biosystems 7500 Fast real-time PCR system. Standard curve was done with a plasmid containing two copies of HIV LTR. The values were normalized based on cell numbers estimated by CCR5 quantification.

Sequence alignments

Nucleotide sequences were aligned using Clustal X program and then were translated. Substitutions of amino acids at those positions important for integrase functions were carefully analyzed. Phylogenetic analysis was performed by the Neighbor-Joining (NJ) method under the Tamura-Nei nucleotide substitution model, in 1000 bootstrapped data sets, using Mega 5.04 program. Hypermutation analysis was performed by the Hypermut 2.0 tool (<http://www.hiv.lanl.gov/>).

Statistical analysis

The nonparametric Kruskal-Wallis test was used for group comparisons. Chi-square test was used to analyze whether the percentage of 2-LTR positive PCR was significantly different among groups. A *P* value less than 0.05 was considered significant. GraphPad Prism 5 was used to perform statistical analyzes.

Results

Study population

The present is a cross-sectional study. The analysis of lymphocyte counts reveals that all the EC display significantly high T CD4⁺ cells counts ($p < 0.0001$), low T CD8⁺ cell counts ($p < 0.05$) and the highest CD4/CD8 ratio ($p < 0.0001$) in comparison to the other groups of patients (Figure 1). VC have significantly high levels of T CD4⁺ cells and low levels of T CD8⁺ cell in comparison to NC patients ($p < 0.0001$) and also

display a CD4/CD8 ratio higher than 1 (Figure 1). Plasma HIV-1 RNA was assessed in order to better define the pattern of viral replication in these different groups of HIV-1 infected patients. At the analyzed point, all EC were aviremic (no blips detected) and VC displayed detectable viral load, as shown in Table 1.

HIV controllers have non-defective integrase

Phylogenetic analysis of the *int* genomic region of EC and VC showed the existence of some *int* sequences with a high divergence for some patients, as depicted in Figure 2. The dataset was analyzed for the occurrence of hypermutation, which was detected in significantly levels ($p < 0.05$) in some sequences of patients VC10, EC13, EC17 and EC19. These sequences were excluded from further analyses.

The analysis of quasispecies showed a low viral diversity (<1.3%) among HIV controllers, despite longstanding HIV infections (Table 1). There is no statistical difference between EC (0.6%) and VC (0.7%) genetic distances.

The possible occurrence of mutations in two important motifs for the integrase function, the HHCC motif in the N-terminal domain [Burke et al., 1992; Kulkosky et al., 1995; Lee et al., 1997; Zheng et al., 1996] and the DDE motif in the catalytic site [Kulkosky et al., 1995] was analyzed. Both motifs were highly conserved among EC and VC patients. The KRK motif (K186, R187, K188) involved in the integrase multimerization at the dimer-dimer interface [Berthoux et al., 2007; Wang et al., 2001] presented some substitutions, such as K186R, R187K and K188R, however, the positive charge was maintained. In addition, those mutations described to affect the interaction of integrase with LEDGF/p75, which may reduce or abolish the enzyme activity were analyzed (H12, E69, L102, A128, A129, C130, W131, W132, I161, R166, Q164, D167, Q168, E170, H171, L172, K173, T174, M178, Q214, Q116) [Busschots et al., 2007;

Cherepanov et al., 2005; Hombrouck et al., 2007; Maertens et al., 2003]. For all clones of patient EC17, the mutation H171Y was found. This mutation was described to interfere or abolish IN/LEDGFp75 interaction [Rahman et al., 2007]. The mutation K173R was observed in patient VC15, but the impact of this substitution is unknown. The residues V165 and R166 described to be involved in the nuclear localization of HIV integrase [Bouyac-Bertoia et al., 2001], E246K and G247W associated to an excessive splicing and Gag processing mechanisms [Mandal et al., 2008], V260 that is important for integrase multimerization [Kalpana et al., 1999], and K258, R262, R263 and K264 involved in DNA binding [Dirac and Kjems, 2001; Lutzke et al., 1994] were highly conserved among the sequences analyzed.

Lack of evidence of circular DNA accumulation in EC

In order to determine if the integration process is impaired in EC and VC patients, 2-LTR circles were measured. The 2-LTR circles were detected in 2 out of 11 EC patients (18%), 7 out of 7 VC patients (100%), 20 out of 21 NC patients (92%) and 17 out of 17 patients under HAART (100%) (Figure 3). The two EC patients that displayed detectable episomal DNA present episodes of occasional transient viremia (blips). Episomal DNA was not detected in the remaining EC patients that completely suppress viremia to levels below the limit of detection of current used assays.

The results of total and integrated DNA quantifications are shown in Figure 4. Total and integrated HIV DNA for the EC group was significantly lower in comparison to both the NC ($p < 0.001$) and HAART ($p < 0.01$) groups, which is consistent with a smaller reservoir in these patients.

Discussion

Integration is an essential step on HIV replication cycle, but so far, few studies investigating restriction mechanisms of HIV integration and the ability of some patients to control HIV infection were performed.

The control of HIV infection can be associated to both viral and host factors. To date, just one study identified potential defective integrase strains harboring mutations at the DDE motif in the catalytic site in LTNP patients [Huang et al., 1998]. The involvement of the integrase in the control of HIV replication is suggested by the lower replicative capacity in virus with RT+IN amplified and cloned from EC patients in comparison to typical progressors. These results indicate that the *pol* gene function, specifically RT and IN, may be impaired in non-progressors [Brumme et al., 2011].

The present study demonstrate the existence of conserved functional integrase sequences in the setting of undetectable viral replication in EC, indicating that infections with integrase-defective HIV-1 strains is not a major factor to explain the natural suppression of viral replication in the cohort of EC and VC here analyzed. Those aminoacid residues described to be involved in integrase function were carefully examined. The HHCC and DDE motifs, involved in the multimerization of integrase subunits and in the catalytic activity of the enzyme, respectively, were highly conserved, supporting the important role of these residues for integrase function.

Other residues were also investigated, such as those involved in the interaction with the cellular co-factor LEDGF/p75. The mutation H171Y was found for one EC patient. The study of Ceccherini-Silberstein (2009) that analyzed the conservation of HIV integrase described that the position 171 displayed a variability of 2.7%; however, the mutation H171Y was very rare (0.45%) [Ceccherini-Silberstein et al., 2009]. This mutation was described to impair or even abolish the IN-LEDGF/p75 binding, affecting HIV integration. The involvement of this mutation with the control of HIV replication

in this patient must be further investigated. The impact of the substitutions of positive amino acids at positions K186, R187, K188 and K173R need to be investigated as well.

The accumulation of circular viral cDNA in the cell nucleus is indicative of inhibition of the integration process. In order to determine if integration is blocked in EC and VC, 2-LTR circles were measured, as well as total and integrated DNA. For VC, 2-LTR circles were detected in 7 out of 7 patients, what is consistent with the current viral replication in these patients. Conversely, for EC episomes were detected only for 2 out of 11 patients. Graf et al described high levels of 2-LTR circles in EC patients compared to viremic non-treated and HAART patients. This data raised the possibility of a pre-integration restriction mechanism, but this hypothesis was not confirmed in ex-vivo analysis in that cohort [Graf et al., 2011]. The results here presented strongly correlate with the clinical data, these patients have long-term suppressed viremia and a strong marker of viral replication was not expect to be found in high levels. Other data that favor this hypothesis is that the two EC patients with detectable 2-LTR eventually present episodes of detectable viral load (blips) with subsequent control of HIV replication, what may be associated to the detection of 2-LTR circles in these patients. However, it is important to point out that 2-LTR was not detected for other EC patients that present occasional blips (EC09, EC11, EC13, EC18 and EC19). To our knowledge, this study is the first to demonstrate the lack of accumulation of 2-LTR circles in EC.

The quantification of total and integrated DNA showed a proportional amount of these markers for all groups of patients, indicating there is not an excess of total DNA for EC, as demonstrated in Graf's study [Graf et al., 2011]. Integrated DNA reflects the latent reservoir, which is observed in lower level in EC patients, compared to VC,

HAART and NC groups. A small HIV reservoir is in agreement with a long-term suppression of HIV replication in EC patients.

In conclusion, the data here presented shows that integrase is conserved among HIV controllers. Few mutations were observed, but the functional impact of such substitution must be further investigated. The lack of accumulation of 2-LTR circles does not support the existence of pre-integration restriction mechanisms in the cohort of EC here analyzed. Therefore, more studies are necessary to investigate the role of integrase and the involvement of cellular co-factors associated to the integration process in the control of HIV infection.

Acknowledgments

We wish to thank University of Miami – Department of International Students and Scholar Services for the support.

Funding

This study was supported by CNPq and FAPERJ grants.

Legends

Figure 1: Clinical parameters of HIV controllers in comparison to both non-controllers and HAART groups analyzed in the present study. **(a)** Viral load; **(b)** T CD4+ cell counts; **(c)** T CD8+ cell counts; **(d)** CD4+/CD8+ ratio. The horizontal lines denote median values.

Figure 2: Phylogenetic analysis of HIV integrase genomic region (864nt) of HIV controllers patients using the Neighbor-Joining method (Tamura-Nei model). Bootstrap values greater than 70% are indicated. Subtype B samples were highlighted in blue, subtype F in green, and subtype C in purple. Hypermutated sequences are indicated by red dots. The scale bar indicates 10% nucleotide sequence divergence.

Figure 3: Quantification of 2-LTR circles for HIV controllers, non-controllers and HAART groups. The 2-LTR circles were detected in 2 out of 11 EC patients (18%). The proportion of patients with detectable 2-LTR circles in the EC group, was much lower than that of VC (7 out of 7 patients; 100%, $p=0.006$), treatment naive (20 out of 21 patients; 92%, $p=0.006$) and HAART (17 out of 17 patients; 100%, $p=0.007$) groups. The horizontal lines denote median values.

Figure 4: Quantification of total **(a)** and integrated **(b)** viral DNA for HIV controllers, non-controllers and HAART groups. EC display significant lower levels of both total and integrated DNA in comparison to the other groups ($p<0.001$). The horizontal lines denote median values.

Bibliography

- Bergamaschi A, David A, Le Rouzic E, Nisole S, Barre-Sinoussi F, Pancino G. 2009. The CDK inhibitor p21Cip1/WAF1 is induced by FcγR activation and restricts the replication of human immunodeficiency virus type 1 and related primate lentiviruses in human macrophages. *J Virol* 83(23):12253-12265.
- Berthoux L, Sebastian S, Muesing MA, Luban J. 2007. The role of lysine 186 in HIV-1 integrase multimerization. *Virology* 364(1):227-236.
- Bouyac-Bertoia M, Dvorin JD, Fouchier RA, Jenkins Y, Meyer BE, Wu LI, Emerman M, Malim MH. 2001. HIV-1 infection requires a functional integrase NLS. *Mol Cell* 7(5):1025-1035.
- Brumme ZL, Li C, Miura T, Sela J, Rosato PC, Brumme CJ, Markle TJ, Martin E, Block BL, Trocha A, Kadie CM, Allen TM, Pereyra F, Heckerman D, Walker BD, Brockman MA. 2011. Reduced replication capacity of NL4-3 recombinant viruses encoding reverse transcriptase-integrase sequences from HIV-1 elite controllers. *J Acquir Immune Defic Syndr* 56(2):100-108.
- Burke CJ, Sanyal G, Bruner MW, Ryan JA, LaFemina RL, Robbins HL, Zeft AS, Middaugh CR, Cordingley MG. 1992. Structural implications of spectroscopic characterization of a putative zinc finger peptide from HIV-1 integrase. *J Biol Chem* 267(14):9639-9644.
- Busschots K, Voet A, De Maeyer M, Rain JC, Emiliani S, Benarous R, Desender L, Debyser Z, Christ F. 2007. Identification of the LEDGF/p75 binding site in HIV-1 integrase. *J Mol Biol* 365(5):1480-1492.
- Buzon MJ, Massanella M, Llibre JM, Esteve A, Dahl V, Puertas MC, Gatell JM, Domingo P, Paredes R, Sharkey M, Palmer S, Stevenson M, Clotet B, Blanco J, Martinez-Picado J. 2010. HIV-1 replication and immune dynamics are affected by raltegravir intensification of HAART-suppressed subjects. *Nat Med* 16(4):460-465.
- Ceccherini-Silberstein F, Malet I, D'Arrigo R, Antinori A, Marcelin AG, Perno CF. 2009. Characterization and structural analysis of HIV-1 integrase conservation. *AIDS Rev* 11(1):17-29.
- Chen H, Li C, Huang J, Cung T, Seiss K, Beamon J, Carrington MF, Porter LC, Burke PS, Yang Y, Ryan BJ, Liu R, Weiss RH, Pereyra F, Cress WD, Brass AL, Rosenberg ES, Walker BD, Yu XG, Lichtenfeld M. 2011. CD4+ T cells from elite controllers resist HIV-1 infection by selective upregulation of p21. *J Clin Invest* 121(4):1549-1560.
- Cherepanov P, Ambrosio AL, Rahman S, Ellenberger T, Engelman A. 2005. Structural basis for the recognition between HIV-1 integrase and transcriptional coactivator p75. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(48):17308-17313.
- Chiu TK, Davies DR. 2004. Structure and function of HIV-1 integrase. *Curr Top Med Chem* 4(9):965-977.
- Deeks SG, Walker BD. 2007. Human immunodeficiency virus controllers: mechanisms of durable virus control in the absence of antiretroviral therapy. *Immunity* 27(3):406-416.
- Dirac AM, Kjemis J. 2001. Mapping DNA-binding sites of HIV-1 integrase by protein footprinting. *Eur J Biochem* 268(3):743-751.
- Graf EH, Mexas AM, Yu JJ, Shaheen F, Liszewski MK, Di Mascio M, Migueles SA, Connors M, O'Doherty U. 2011. Elite suppressors harbor low levels of integrated HIV DNA and high levels of 2-LTR circular HIV DNA compared to HIV+ patients on and off HAART. *PLoS Pathog* 7(2):e1001300.
- Hombrouck A, De Rijck J, Hendrix J, Vandekerckhove L, Voet A, De Maeyer M, Witvrouw M, Engelborghs Y, Christ F, Gijssbers R, Debyser Z. 2007. Virus evolution reveals an exclusive role for LEDGF/p75 in chromosomal tethering of HIV. *PLoS Pathog* 3(3):e47.
- Huang Y, Zhang L, Ho DD. 1998. Characterization of gag and pol sequences from long-term survivors of human immunodeficiency virus type 1 infection. *Virology* 240(1):36-49.

- Kalpana GV, Reicin A, Cheng GS, Sorin M, Paik S, Goff SP. 1999. Isolation and characterization of an oligomerization-negative mutant of HIV-1 integrase. *Virology* 259(2):274-285.
- Kulkosky J, Katz RA, Merkel G, Skalka AM. 1995. Activities and substrate specificity of the evolutionarily conserved central domain of retroviral integrase. *Virology* 206(1):448-456.
- Lee SP, Xiao J, Knutson JR, Lewis MS, Han MK. 1997. Zn²⁺ promotes the self-association of human immunodeficiency virus type-1 integrase in vitro. *Biochemistry* 36(1):173-180.
- Lutzke RA, Vink C, Plasterk RH. 1994. Characterization of the minimal DNA-binding domain of the HIV integrase protein. *Nucleic Acids Res* 22(20):4125-4131.
- Maertens G, Cherepanov P, Pluymers W, Busschots K, De Clercq E, Debysers Z, Engelborghs Y. 2003. LEDGF/p75 is essential for nuclear and chromosomal targeting of HIV-1 integrase in human cells. *J Biol Chem* 278(35):33528-33539.
- Mandal D, Feng Z, Stoltzfus CM. 2008. Gag-processing defect of human immunodeficiency virus type 1 integrase E246 and G247 mutants is caused by activation of an overlapping 5' splice site. *J Virol* 82(3):1600-1604.
- Poropatich K, Sullivan DJ, Jr. 2011. Human immunodeficiency virus type 1 long-term non-progressors: the viral, genetic and immunological basis for disease non-progression. *J Gen Virol* 92(Pt 2):247-268.
- Rahman S, Lu R, Vandegraaff N, Cherepanov P, Engelman A. 2007. Structure-based mutagenesis of the integrase-LEDGF/p75 interface uncouples a strict correlation between in vitro protein binding and HIV-1 fitness. *Virology* 357(1):79-90.
- Saez-Cirion A, Hamimi C, Bergamaschi A, David A, Versmisse P, Melard A, Boufassa F, Barre-Sinoussi F, Lambotte O, Rouzioux C, Pancino G. 2011. Restriction of HIV-1 replication in macrophages and CD4⁺ T cells from HIV controllers. *Blood* 118(4):955-964.
- Schacker T. 2010. New tools to track HIV. *Nat Med* 16(4):373-374.
- Wang JY, Ling H, Yang W, Craigie R. 2001. Structure of a two-domain fragment of HIV-1 integrase: implications for domain organization in the intact protein. *EMBO J* 20(24):7333-7343.
- Zhang J, Scadden DT, Crumpacker CS. 2007. Primitive hematopoietic cells resist HIV-1 infection via p21. *J Clin Invest* 117(2):473-481.
- Zheng R, Jenkins TM, Craigie R. 1996. Zinc folds the N-terminal domain of HIV-1 integrase, promotes multimerization, and enhances catalytic activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(24):13659-13664.

Table 1. Clinical characteristics of HIV controllers patients at the analyzed point

| Patient | Year of first positive serology | T CD4 ⁺ | T CD8 ⁺ | T CD4 ⁺ /T CD8 ⁺ | Viral load | HIV subtype | Number of clones | Mean diversity of quasispecies (%) |
|---------|---------------------------------|--------------------|--------------------|--|------------|-------------|------------------|------------------------------------|
| EC02 | 1997 | 1077 | 1285 | 0.84 | <50 | B | 6 | 0.9 |
| EC07 | 2003 | 1817 | 851 | 2.14 | <50 | NA | NA | NA |
| EC08 | 1996 | 1435 | 455 | 3.15 | <50 | B | 14 | 0.0 |
| EC09 | 2001 | 1165 | 770 | 1.51 | <50 | B | 3 | 1.0 |
| EC11 | 1995 | 1610 | 1206 | 1.33 | <50 | B | 6 | 0.3 |
| EC13 | 1993 | 1271 | 816 | 1.56 | <50 | B | 5 | 0.8 |
| EC17 | 2001 | 1509 | 693 | 2.18 | <50 | B | 3 | 0.6 |
| EC18 | 2001 | 841 | 597 | 1.41 | <50 | B | 7 | 0.6 |
| EC19 | 2006 | 1019 | 715 | 1.43 | <50 | B | 7 | 1.0 |
| EC26 | 2008 | 1392 | 585 | 2.38 | <50 | NA | NA | NA |
| EC28 | 1996 | 1184 | 665 | 1.78 | <50 | B | 6 | 0.8 |
| VC04 | 1997 | 1065 | 1044 | 1.02 | 872 | C | 11 | 0.1 |
| VC10 | 1991 | 1446 | 1047 | 1.38 | 612 | B | 3 | 1.3 |
| VC12 | 2000 | 718 | 925 | 0.78 | 479 | NA | NA | NA |
| VC14 | 1999 | 701 | 598 | 1.17 | 106 | F | 5 | 0.8 |
| VC15 | 2001 | 699 | 846 | 0.83 | 758 | B | 6 | 1.1 |
| VC16 | 1997 | 624 | 759 | 0.82 | 248 | B | 6 | 1.1 |
| VC27 | 1998 | 626 | 663 | 0.94 | 460 | B | 4 | 0.2 |

NA - not analyzed

Figure 1

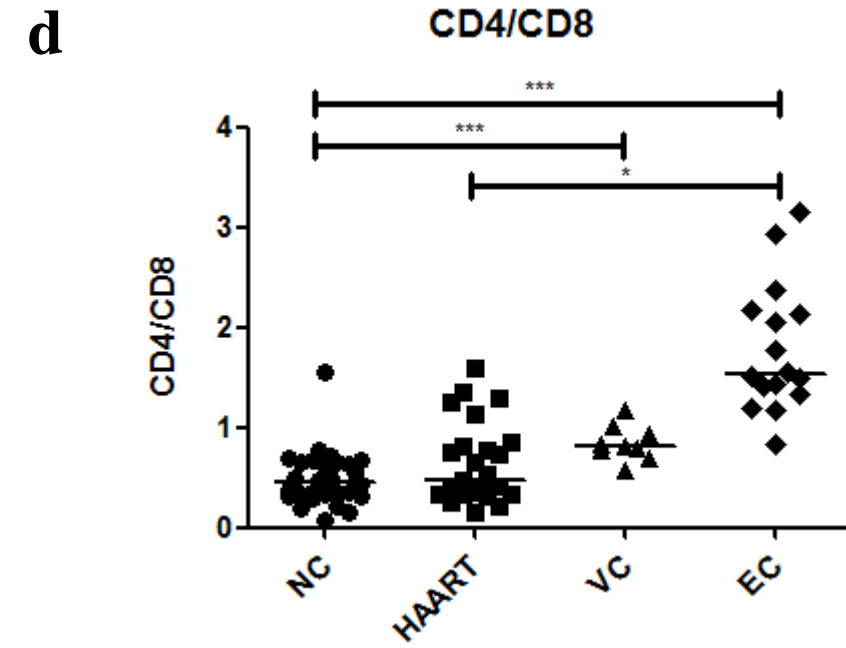
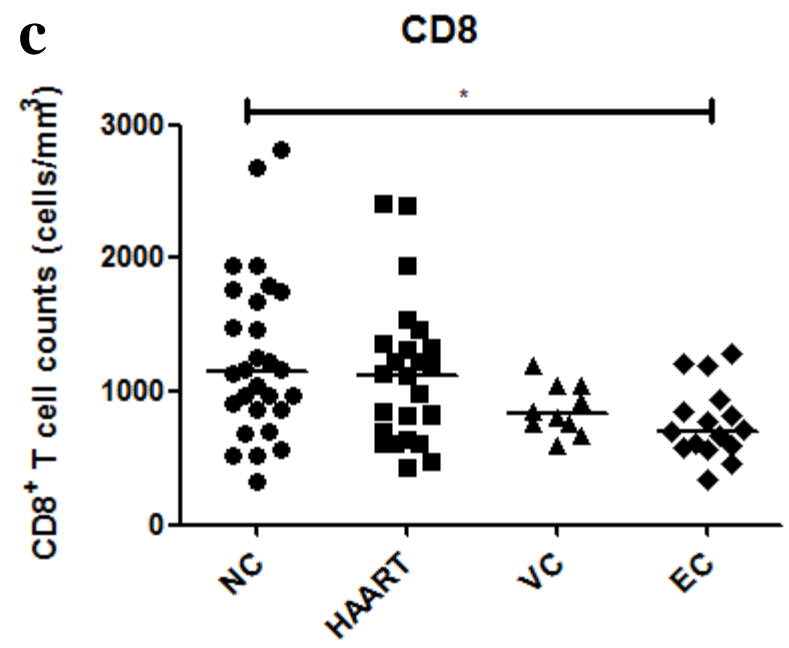
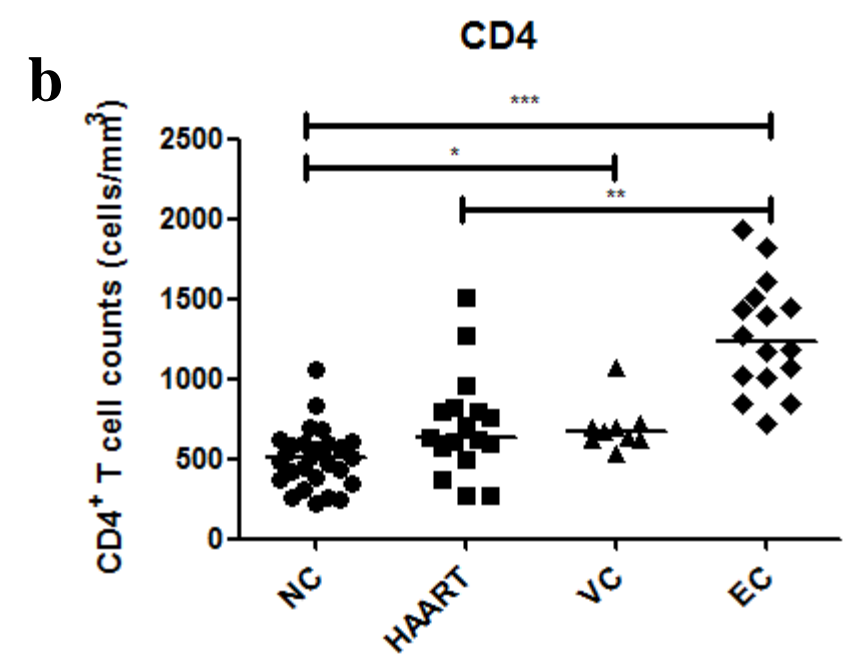
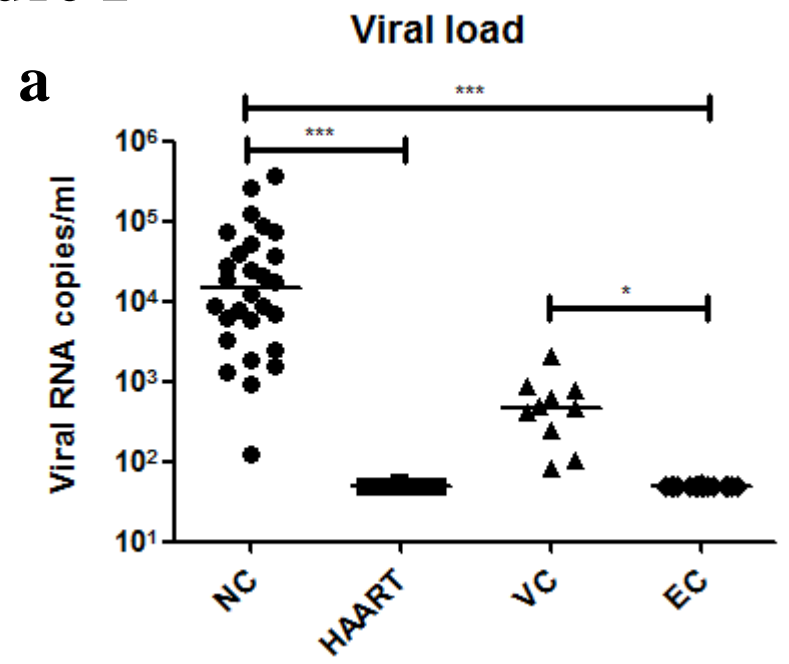


Figure 2

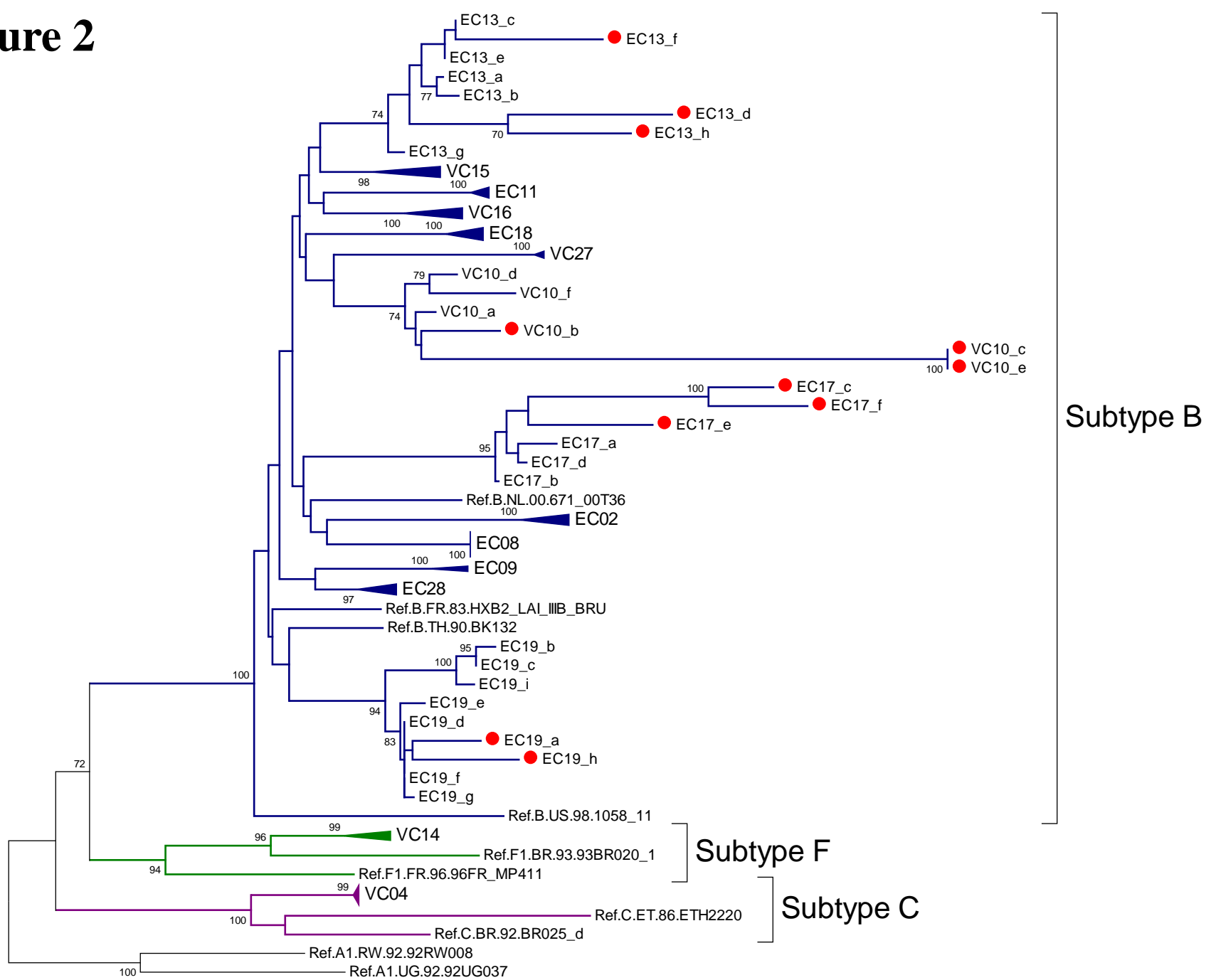


Figure 3

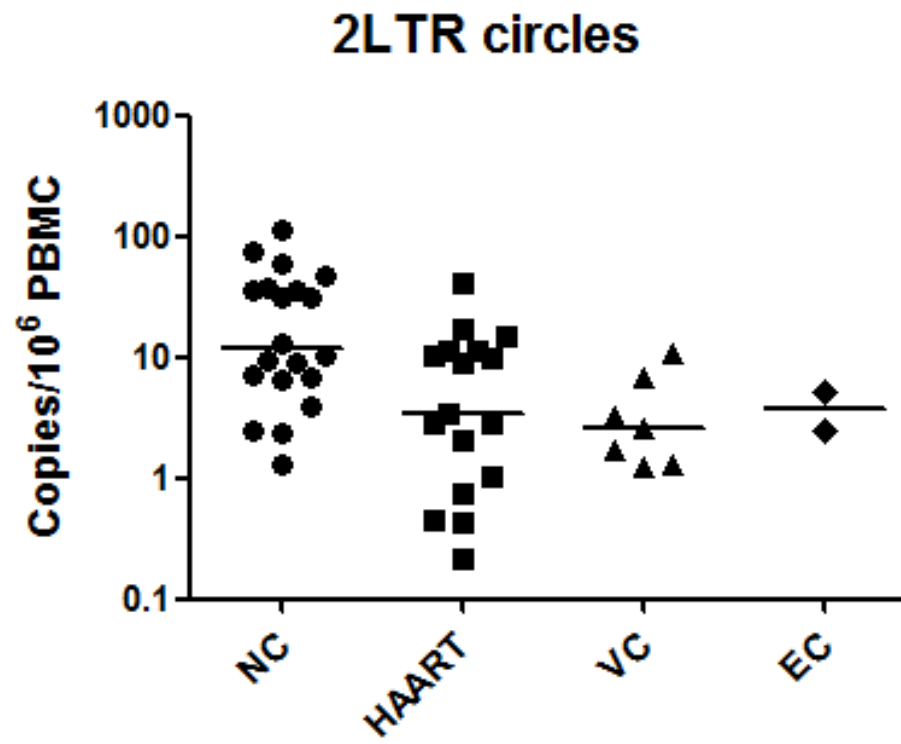
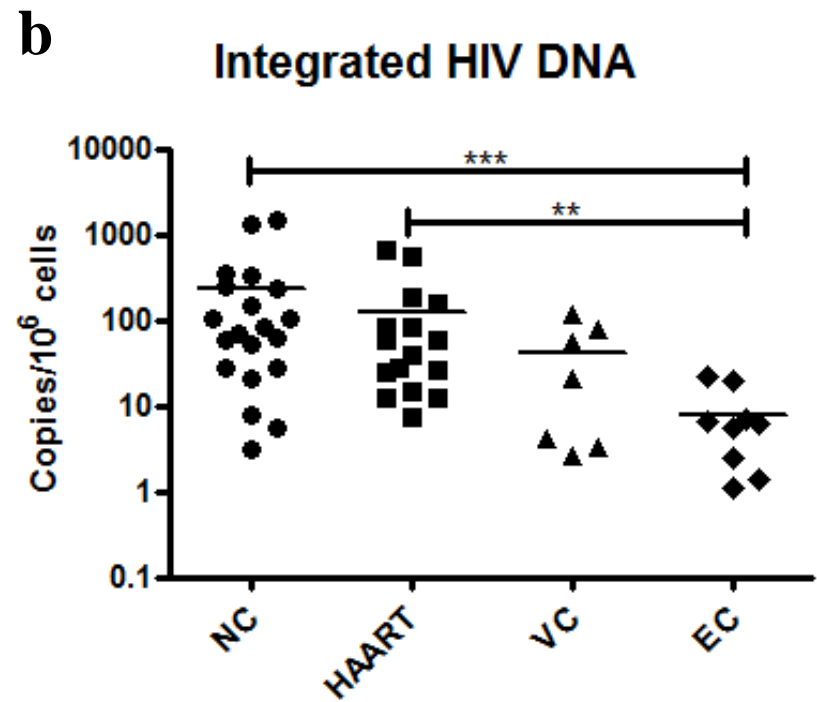
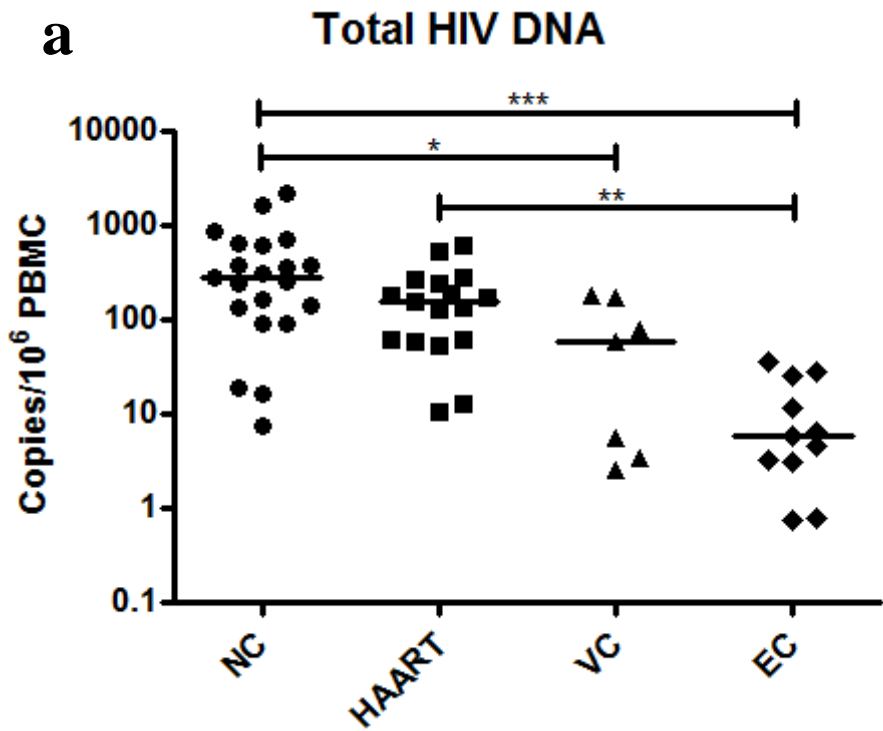


Figure 4



IV. Discussão

A integrase é uma enzima essencial para o ciclo de replicação do HIV, sendo responsável por catalisar a reação de integração do genoma viral ao genoma hospedeiro, etapa fundamental para a replicação dos retrovírus. A escassez de informação sobre a diversidade genética da integrase, a introdução de inibidores de integrase na prática clínica e a importância desta enzima na patogênese da infecção motivaram a realização deste estudo.

Iniciamos este trabalho analisando a diversidade genética da integrase nos subtipos prevalentes no Brasil e a resistência primária aos inibidores de integrase em amostras de indivíduos virgens de tratamento, conforme foi apresentado nos documentos 1 e 2 (PASSAES *et al.*, 2009; GRAF *et al.*, 2011).

O primeiro ponto importante a ser discutido é o alto grau de conservação da integrase. Em nosso estudo, observamos que a região da integrase do gene *pol* é altamente conservada, dado que tem sido demonstrado por outros grupos (CECCHERINI-SILBERSTEIN *et al.*, 2009; LOW *et al.*, 2009; GARRIDO *et al.*, 2010). Foi observado que dentre os 288 resíduos de aminoácidos que compõem a integrase, 180 deles apresentam-se conservados, ou seja, a variabilidade é <1% nessas posições em amostras do subtipo B (CECCHERINI-SILBERSTEIN *et al.*, 2009). Esses aminoácidos altamente conservados estão envolvidos principalmente na atividade catalítica, estabilidade e multimerização da enzima, além disso, compõem os sítios de ligação com DNA e com a proteína LEDGF/p75. Os domínios funcionais HHCC e DDE, assim como as posições relacionadas à interação com LEDGF apresentaram-se conservadas em todos os estudos. A caracterização de resíduos conservados é importante, uma vez que pode levar ao desenho racional de novas drogas inibidoras de integrase, como no caso das LEDGINs, drogas que inibem a interação da integrase com o co-fator LEDGF/p75 (revisto por PRADA, MARKOWITZ, 2010). Essas drogas estão atualmente sendo testadas *in vitro* e apresentam inibição específica do processo de integração, demonstrando serem ativas no bloqueio da integração de variantes resistentes tanto ao RAL quanto ao EVG. Estas podem significar mais uma classe de drogas a ser incluída no coquetel de antirretrovirais (CHRIST *et al.*, 2010).

Apesar de apresentar um alto grau de conservação em cerca de 63% de seus resíduos de aminoácidos, a acentuada variabilidade genética, característica marcante do HIV, também pode ser observada na integrase. Uma das implicações dos polimorfismos genéticos é que, dependendo da posição onde se encontram, podem causar redução da susceptibilidade ou resistência aos antirretrovirais.

No caso dos inibidores de integrase, a resistência ao raltegravir é causada por três vias, sendo N155H + L74M, E92Q, Q95K, T97A, G136R, e/ou V151L; Q148H/R/K + E138A/K ou G140A/S, e Y143R/C + L74A/I, E92Q, T97A, I203M e/ou S230R. Por sua vez, a resistência ao elvitegravir vem sendo associada às mutações principais T66I, E92Q, S147G, Q148H/R/K, N155H, e as mutações secundárias H51Y, T66K/A, L68I/V, S119R/G, E138K, G140S/C, E157Q, K160N, R166S, E170A, S230R, D232N, evidenciando-se coincidência de algumas posições.

Em nossos estudos observamos um nível de resistência primária aos inibidores de integrase muito baixo. Não identificamos nenhuma das mutações principais nos dois estudos realizados, com amostras coletadas entre 1998-2003 e 2008-2009 em diferentes cidades brasileiras. Quanto às mutações secundárias associadas à resistência aos inibidores de integrase *in vivo*, identificamos L74I (4,3% - subtipo C), T97A (2,2% - subtipo C), E157Q (3,2% - subtipo B). No estudo em que analisamos amostras do estado de Santa Catarina (GRAF *et al.*, 2011), uma amostra do subtipo C apresentou polimorfismos raros em posições associadas ao desenvolvimento de resistência, sendo S147R + E138A, conforme já foi descrito em outros trabalhos (LATAILLADE *et al.*, 2007; RHEE *et al.*, 2008; MYERS, PILLAY, 2008). As demais mutações observadas no primeiro estudo (PASSAES *et al.*, 2009) tinham sido previamente associadas aos inibidores de integrase em estudos *in vitro*, mas que não foram posteriormente detectadas *in vivo*. Dentre estas, as variações mais frequentes são V72I (41,9% - subtipo B, 91,4% - subtipo C, 25,9% - subtipo F), T112I (22,2% - subtipo F), V151I (16,1% - subtipo B), V165I (40,7% - subtipo F) e V201I (45,2% - subtipo B, 97,8% - subtipo C, 100% - subtipo F), significando importantes polimorfismos na região

da integrase. Resultados similares foram observados em amostras do estado de São Paulo (ARRUDA *et al.*, 2010).

No que diz respeito à resistência ao inibidor de integrase de segunda geração, dolutegravir, foi verificado o aparecimento das mutações L101I, T124A, S153F/Y *in vitro*. Um dado interessante é que as mutações L101I e T124A foram identificadas como polimorfismos nas amostras dos subtipos C e F analisadas em nosso estudo. Garrido e colaboradores (2011) também identificaram uma maior prevalência dessas mutações em amostras não-B. Esses dados sugerem que o uso do inibidor dolutegravir em pacientes infectados por subtipos não-B do HIV poderia estar comprometido, entretanto, dados clínicos em pacientes portando diferentes subtipos virais e com falha prévia ao raltegravir precisam ser realizados para que esta questão seja mais bem elucidada.

A associação de polimorfismos genéticos, subtipos e desenvolvimento de resistência aos inibidores de integrase não foi descrita no que diz respeito aos aminoácidos que variam nos sítios polimórficos, até o presente momento. Uma observação importante feita por Rhee e colaboradores é que a maioria dos polimorfismos na integrase é resultado de substituições conservadas, ou seja, de aminoácidos com as mesmas características físico-químicas, como por exemplo, Val↔Ile↔Leu, Lys↔Arg, Ala↔Ser↔Thr e Asp↔Glu. Em nosso estudo foi possível observar que o evento de hipermutação, muito comum nos retrovírus, está associado a maioria destas alterações.

Alguns trabalhos vêm demonstrando a importância de analisar não só as sequências traduzidas de aminoácidos, mas também os seus códons correspondentes, uma vez que avaliando as transições ou transversões necessárias para causar resistência têm sido identificadas diferenças entre os subtipos virais. O trabalho de Maiga e colaboradores (2009) avaliou a barreira genética aos inibidores de integrase em amostras do subtipo B e da CRF02_AG, analisando os nucleotídeos correspondentes às mutações de resistência. Como resultado, verificou-se que os códons correspondentes às mutações principais que causam resistência ao RAL e ao EVG são similares entre o subtipo B e da CRF02_AG. Entretanto, a CRF02_AG parece apresentar uma barreira genética maior para a aquisição de mutações G140S e V151I

quando comparada com o subtipo B, o que pode ter implicações no desenvolvimento de resistência aos inibidores de integrase. Brenner e colaboradores (2011) complementaram estes dados para amostras do subtipo C. Em conjunto, estes resultados sugerem que variações nucleotídicas não favorecem o desenvolvimento de resistência pela via Q148R/H/K + G140S nos subtipos A, C e na CRF02_AG (MAIGA *et al.*, 2009; BRENNER *et al.*, 2011).

Com a finalidade de verificar se a pressão seletiva causada pela terapia antirretroviral seria capaz de induzir o aparecimento de mutações de resistência em outras regiões do genoma viral, comparamos as frequências das mutações de resistência aos inibidores de integrase nos indivíduos virgens de tratamento e nos indivíduos apresentando falha terapêutica aos inibidores de PR e RT. Nesta análise não observamos diferença estatisticamente significativa nas frequências de mutações associadas com resistência aos inibidores de integrase entre os dois grupos analisados, sugerindo que a pressão seletiva causada pela terapia nas regiões da PR/RT do gene *pol* não favorece o aparecimento de mutações de resistência na região da integrase deste mesmo gene. Nossos achados divergem com o que vêm sendo observado por outros grupos. Van Hal e colaboradores identificaram uma maior divergência na região da integrase quando compararam indivíduos virgens de tratamento e em HAART ($3,8 \pm 0,18\%$ e $5,1 \pm 0,17\%$, respectivamente), além de terem detectado a mutação secundária G140S em dois pacientes previamente tratados. Contudo estes resultados são questionáveis, uma vez que, se assumirmos que o tempo de infecção entre os indivíduos virgens de tratamento e os tratados seja distinto (esta informação não é fornecida no trabalho), é razoável se esperar menor divergência entre as amostras de indivíduos virgens de tratamento. No estudo conduzido por Ceccherini-Silberstein e colaboradores, foi identificado o aumento da frequência de determinados polimorfismos na presença da terapia antirretroviral (M154I e V165I). Além disso, a mutação M154L mostrou-se positivamente associada às mutações F227L e T215Y na RT, enquanto que V165I e G163R foram associadas às mutações F227L e M230L, respectivamente. Em nosso estudo nós avaliamos apenas as posições associadas à resistência e não todas as assinaturas polimórficas, conforme o estudo de Ceccherini-Silberstein e

colaboradores. Apesar destas evidências, ainda não está claro se estas alterações na integrase são selecionadas pela terapia antirretroviral ou se a interação da integrase com a transcriptase reversa nas etapas iniciais do ciclo de replicação poderia justificar estas variações.

A associação entre os subtipos virais, os polimorfismos específicos e o desenvolvimento de resistência só poderá ser esclarecida através do estudo de longo termo de um grande número de pacientes sob terapia com o raltegravir.

O estudo de Rockstroh e colaboradores (2011) analisou a eficácia do tratamento com raltegravir em pacientes infectados por subtipos B e não-B do HIV-1, utilizando os dados dos ensaios clínicos STARTMRK e BENCHMRK-1 e 2. Não foi observada diferença nas contagens de células T CD4+ e a proporção de pacientes que atingiram carga viral <50 cópias/mL foi similar entre os dois grupos. A resistência fenotípica nos vírus não-B foi associada a mutações previamente observadas em vírus subtipo B. Contudo, o baixo número de mutações observadas nestes pacientes limita a conclusão e evidencia a necessidade de mais dados para o entendimento de como se desenvolve a resistência ao raltegravir em vírus não-B (ROCKSTROH *et al.*, 2011).

Diversos estudos analisando um número menor de pacientes vêm sendo conduzidos, no sentido de monitorar os primeiros casos de resistência ao raltegravir e descrever a dinâmica de acumulação de mutações de resistência (CHARPENTIER *et al.*, 2008; MALET *et al.*, 2009; SICHTIG *et al.*, 2009; FERNS *et al.*, 2009; CANDUCCI *et al.*, 2009; BALDANTI *et al.*, 2010).

A fim de compreender a dinâmica de aparecimento de mutações de resistência ao RAL, clones foram analisados em diversos pontos ao longo da terapia com esta droga, revelando que quasispécies virais portando vias mutacionais distintas co-existem. Além disso, pode haver troca de uma via mutacional prevalente por outra, por exemplo, clones portando a mutação N155H, antes prevalentes, são substituídos por clones portando Q148H. Uma vez que variantes com a mutação Q148H acompanhada da mutação secundária G140S apresentam uma capacidade replicativa semelhante aos vírus selvagens, parece haver uma seleção destas quasispécies durante o desenvolvimento de resistência ao raltegravir (CHARPENTIER *et al.*, 2008; MALET *et al.*, 2009).

Além disso, variantes resistentes ao RAL desaparecem quando a terapia com esta droga é interrompida e o vírus na sua forma selvagem emerge como variante majoritária novamente. Contudo, assim que a pressão seletiva da droga é imposta outra vez, as variantes resistentes reemergem rapidamente, sugerindo que reservatórios virais contendo essas variantes são formados, o que evidencia a necessidade de uma supressão completa da replicação viral (FERNS *et al.*, 2009).

Outro achado interessante sobre as vias de desenvolvimento de resistência ao RAL é que as mutações Q148R/H foram mais frequentemente detectadas após um período curto de exposição à droga, enquanto que Y143R foi mais observada após exposição em longo prazo ao raltegravir (SICHTIG *et al.*, 2009).

Apesar da literatura sobre a emergência de mutações de resistência ao raltegravir vir aumentando, a dinâmica do acúmulo de mutações não segue um padrão para todos os pacientes, e o perfil genético local das variantes circulantes pode ter uma importante influência. Neste contexto, desenvolvemos um estudo (PASSAES *et al.*, submetido à publicação - documento 3), a fim de descrever e compreender o comportamento das variantes virais presentes nos pacientes apresentando falha terapêutica ao esquema de resgate contendo RAL no Brasil.

No nosso trabalho, acompanhamos dois grupos de pacientes, sendo troca de T20 por raltegravir (Grupo 1, n=9) e uso de raltegravir na terapia de resgate (Grupo 2, n=10). As contagens de células T CD4+ aumentaram em ambos os grupos seis e doze meses após o início da terapia com raltegravir. Este dado é importante, pois mostra que o raltegravir é capaz de promover uma melhor reconstituição imune mesmo em pacientes que já apresentavam carga viral abaixo do limite de detecção, como no caso do Grupo 1. A carga viral se manteve abaixo do limite de detecção no Grupo 1 durante todo o período de acompanhamento e atingiu níveis indetectáveis após o início da terapia com RAL para o Grupo 2. Os benefícios clínicos promovidos pela terapia com o raltegravir são claros e fornecem subsídios para a utilização desta droga no nosso país. Entretanto, três pacientes do Grupo 2 apresentaram falha virológica. Em nosso estudo, a falha virológica ao

raltegravir foi associada à mutação principal Q148H acompanhada da mutação secundária G140S, eventualmente seguida da S230N, conferindo altos níveis de resistência a esta droga. A ocorrência de falha virológica ao regime contendo raltegravir pode ser resultado de diversos fatores, dentre eles regimes sub-ótimos, influência do fenômeno de resistência aos inibidores de PR/RT e/ou fraca adesão à terapia. No caso de um destes pacientes, o uso de darunavir no esquema contendo raltegravir seria o mais adequado, porém este IP teve que ser retirado da terapia devido à toxicidade, e provavelmente a falha virológica pode ser associada a este evento. No caso de outro paciente, a falha parece estar relacionada ao alto nível de resistência aos IP, devido à alta exposição prévia a essa classe de drogas. Para o paciente que não apresentou mutações de resistência ao raltegravir foi observada uma fraca adesão à terapia antirretroviral, podendo ser o motivo da falha terapêutica ao esquema de resgate. Uma vez que os pacientes que utilizam o raltegravir na terapia de resgate possuem opções terapêuticas limitadas, este antirretroviral é geralmente mantido no esquema mesmo quando há falha virológica, ainda que esta conduta possa comprometer ainda mais os níveis de resistência aos inibidores de integrase. Em 2009, Wirden e colaboradores mostraram que não há atividade residual do raltegravir em pacientes apresentando uma ou mais vias de resistência a esta droga, sugerindo que a presença da droga não traz nenhum benefício para os pacientes, nestes casos, desencorajando o uso do raltegravir como monoterapia funcional nos esquemas de resgate (WIRDEN *et al.*, 2009).

Uma limitação do nosso estudo é o tamanho da população que é ainda muito pequeno, o que reflete o número reduzido de pacientes em uso de raltegravir no estado do Rio de Janeiro, já que no Brasil, esta droga só está aprovada para compor esquemas de resgate. Apesar desta limitação, estes dados são relevantes, uma vez que serão os primeiros resultados do acompanhamento de uma coorte sob terapia com raltegravir no Brasil, no contexto da distribuição deste medicamento antirretroviral pelo Ministério da Saúde.

Devido ao aumento do número de pacientes fazendo uso do raltegravir na terapia de resgate e da não existência, até então, de métodos comerciais

disponíveis, métodos *in house* para genotipagem da integrase precisavam ser desenvolvidos com esta finalidade. Inúmeros trabalhos descrevendo mutações de resistência aos inibidores de integrase foram desenvolvidos utilizando metodologias próprias, conforme foi apresentado no item 1.2.4.4. Alguns grupos trabalharam no sentido de desenvolver métodos de genotipagem capazes de amplificar a integrase de vírus dos diferentes subtipos de HIV-1 (VAN LAETHEM *et al.*, 2008; ESHLEMAN *et al.*, 2009; HEARPS *et al.*, 2009), no entanto, estes trabalhos utilizavam como método de extração reagentes do kit comercial ViroSeq HIV-1 Genotyping System - Sample Preparation Module (Celera Diagnostics). Uma vez que a proposta de utilização de métodos *in house* visa ser uma alternativa menos custosa para a realização do teste de genotipagem, a utilização de um sistema de extração que compõe um kit comercial de genotipagem de outras regiões genômicas do HIV não parece ser uma estratégia adequada.

Com base nos dados de pesquisa que vinham sendo apresentados por nosso grupo, o Ministério da Saúde do Brasil incentivou o desenvolvimento de uma metodologia nacional de genotipagem da integrase para o monitoramento da resistência em pacientes em terapia com o raltegravir na rede pública de saúde e que pudesse ser implantada nos laboratórios brasileiros. Neste contexto, era importante que o método desenvolvido fosse robusto, sensível aos diversos subtipos de HIV presentes no Brasil e de fácil execução em um laboratório de rotina da Rede Nacional de Genotipagem. Para tal, os iniciadores para amplificação e sequenciamento foram desenhados em regiões conservadas, e eventualmente, posições contendo ambiguidades foram incluídas, considerando a diversidade genética viral nos subtipos prevalentes no Brasil. Além disso, consideramos o uso do mesmo sistema de extração que é atualmente utilizado na Rede Nacional de Genotipagem – QIAamp® Viral RNA Mini Kit, QIAGEN – para que futuramente os testes de genotipagem possam ser realizados para diferentes alvos a partir do mesmo material. Inicialmente, o protocolo desenvolvido em nosso laboratório consistia de uma *nested* PCR (PASSAES *et al.*, 2009a), que foi otimizada para um ensaio com uma única etapa de amplificação, o que é mais apropriado para a aplicação diagnóstica, minimizando as chances de contaminação, conforme apresentado

no Documento 4a. A eficiência do método foi maior do que 90%, demonstrando uma alta taxa de amplificação em amostras com carga viral acima de 1000 cópias/ml. O menor percentual de amplificação (~81%) foi observado nas amostras com carga viral entre 1000 e 3000 copias/ml. A fim de evitar a não amplificação de amostras clínicas, sugerimos que seja estabelecido um *cut off* de carga viral em torno de 1000 copias/ml, assim como é preconizado para alguns kits comerciais de genotipagem da PR/RT. Portanto, o método de genotipagem da integrase desenvolvido por nosso grupo representa uma alternativa eficiente e econômica para o monitoramento de mutações de resistência aos inibidores de integrase no sistema público de saúde no Brasil.

A Microrrede de genotipagem de novos alvos consiste no desenvolvimento e aplicação de metodologias para genotipagem tanto da integrase, quanto da gp41 e do segmento V3 do envelope viral. A fim de padronizar as técnicas desenvolvidas por três laboratórios distintos, determinou-se o uso do sistema *nested* PCR durante a primeira etapa da Microrrede de genotipagem de novos alvos, no entanto, faz-se necessária a otimização das demais técnicas para que possamos aplicar na prática clínica uma metodologia de excelência para a detecção de mutações de resistência aos novos alvos da terapia antirretroviral no Brasil.

O desenvolvimento deste projeto trouxe uma perspectiva muito positiva do ponto de vista do incentivo à inovação tecnológica no país. O produto advindo deste projeto traz uma contribuição importante para o SUS, uma vez que a aplicação destas metodologias na prática clínica trará economia para o Ministério da Saúde, já que as metodologias empregadas serão nacionais, além de permitir uma avaliação adequada do status de resistência dos pacientes em terapia de resgate com o raltegravir no país.

No conjunto, os documentos 1-4 trazem informações importantes sobre a enzima integrase do HIV-1 no contexto da resistência aos antirretrovirais no Brasil, sendo os primeiros dados a serem disponibilizados sobre o tema com amostras brasileiras.

No que diz respeito ao envolvimento da integrase na patogênese da infecção pelo HIV, não observamos uma aparente inibição da integração nos pacientes controladores de elite e controladores virêmicos. De forma geral, a

integrase apresentou-se bastante conservada em seus motivos funcionais nesses pacientes. A mutação H171Y foi observada em um dos pacientes controladores de elite. Este resíduo está envolvido com a interação com o cofator celular LEDGF/p75, e a mutação H171Y foi descrita por abolir esta interação. No entanto, a princípio não podemos associar a ocorrência desta substituição com o bloqueio da integração, uma vez que não observamos acúmulo de DNA circular 2-LTR na amostra deste paciente. Outras mutações foram observadas nas posições K173, K186, R187 e K188, contudo essas substituições foram entre aminoácidos com carga positiva, o que pode não ter alterado a atividade funcional destes resíduos. Ensaio funcional precisam ser realizados no sentido de elucidar o papel dessas substituições no comprometimento da atividade da enzima nos pacientes naturalmente controladores da replicação do HIV.

Um ponto importante a ser discutido é o possível envolvimento das proteínas APOBEC no controle da replicação do HIV na coorte analisada. A função de APOBEC em restringir a replicação em pacientes não progressores de longo termo e controladores de elite vem sendo demonstrada. Nesta coorte, quatro pacientes apresentaram altos níveis de hipermutação, sugerindo que APOBEC possa estar desenvolvendo um papel importante no controle da viremia. Os mecanismos de restrição via APOBEC e a atividade funcional de Vif nesses pacientes merecem ser futuramente investigados, a fim de melhor compreendermos os mecanismos envolvidos no controle da replicação viral nesses pacientes.

O estudo realizado por Graf e colaboradores, assim como o nosso estudo, quantificou DNA viral total, integrado e 2-LTR, no entanto resultados divergentes foram observados. Foi observado por Graf que os pacientes EC possuem níveis mais altos de DNA não integrado 2-LTR em comparação com pacientes virêmicos não tratados e pacientes em HAART, o que não foi confirmado em nosso estudo. Este acúmulo de DNA não integrado sugere que há algum mecanismo intrínseco bloqueando a integração do genoma viral no DNA desses pacientes. Um ponto questionável no trabalho de Graf é o fato de 100% dos pacientes EC apresentarem um provável mecanismo de inibição da integração com base no acúmulo de DNA circular, dados que não foram

confirmados nas análises *ex-vivo*. O controle da replicação viral vem sendo associado a diversos mecanismos, tanto virais quanto relacionados ao hospedeiro. Variantes virais atenuadas, como a variante apresentando uma deleção no gene *nef* descrita na coorte do Banco de Sangue de Sidney, estão associadas ao controle da infecção e a uma progressão mais lenta (ou não progressão) para a AIDS. Nesta coorte, seis dentre oito pacientes infectados a partir de uma mesma bolsa de sangue contaminada foram capazes de controlar a replicação viral (LEARMONT *et al.*, 1999). Além disso, outros fatores são fortemente associados com a progressão lenta para a AIDS, dentre eles a presença dos alelos CCR5 Δ 32, HLA-B*27 e B*57 (AN, WINKLER, 2010; POROPATICH, SULLIVAN, 2011). Esses marcadores estão presentes em alta frequência nas coortes de pacientes que controlam a replicação do HIV, no entanto, não são observados na totalidade dos indivíduos. O controle da replicação viral é um fenômeno multifatorial, estando relacionado a diversos mecanismos de acordo com as características virais, imunológicas e genéticas em cada indivíduo (THÈZE *et al.*, 2011). Nossas análises detectaram círculos 2-LTR em dois dentre 11 pacientes EC. Estes dados se correlacionam com a supressão da viremia nestes indivíduos. Além disso, os dois pacientes que apresentaram 2-LTR detectáveis apresentam *blips* eventuais de carga viral plasmática. A relação entre a detecção de DNA circular e os *blips* nestes pacientes necessita ser melhor investigada.

Os resultados apresentados no documento 5 trazem importantes evidências sobre o não acúmulo de DNA circular em pacientes controladores de elite e o envolvimento do processo de integração com a patogênese da infecção pelo HIV.

No conjunto, os resultados apresentados nesta tese agregam, de forma contemporânea, informações importantes sobre a diversidade genética da integrase do HIV-1, sobre a resistência aos inibidores de integrase e sobre o envolvimento da integrase na patogênese da infecção pelo HIV.

V. Conclusões

- 1) Dados obtidos neste estudo nos permitem verificar que a integrase é uma região conservada, quando comparada com outros genes do HIV-1, tanto em amostras do mesmo subtipo quanto entre os diferentes subtipos estudados.
- 2) Dentre as amostras analisadas, pudemos identificar não apenas assinaturas moleculares típicas aos subtipos B, C e F do HIV-1 na região da integrase, como assinaturas características das amostras brasileiras, principalmente às correspondentes aos subtipos C e F.
- 3) Não foi observada resistência transmitida aos inibidores de integrase nas amostras brasileiras. Não observamos mutações principais e poucas mutações secundárias foram detectadas, o que encoraja o uso de inibidores de integrase no Brasil.
- 4) A terapia com raltegravir promove uma significativa reconstituição imune, mesmo em pacientes já com carga viral em níveis indetectáveis, além de uma rápida redução da carga viral plasmática em pacientes sob terapia de resgate com esta droga.
- 5) A troca do antirretroviral enfuvirtida por raltegravir em pacientes com carga viral indetectável foi segura – estes pacientes mantiveram os níveis indetectáveis de viremia, além de terem apresentado um aumento na contagem de células T CD4+.
- 6) A falha virológica observada em pacientes sob terapia de resgate com raltegravir ocorreu por problemas de adesão ao tratamento e devido a emergência de variantes virais portando as mutações Q148H+G140S.
- 7) O método de genotipagem desenvolvido no âmbito deste trabalho permite a detecção de mutações de resistência aos inibidores de integrase e está pronto para ser empregado na prática clínica no Brasil.
- 8) Não foram observadas mutações nos motivos HHCC e DDE relacionados à atividade funcional da integrase, sugerindo que nos pacientes naturalmente controladores da replicação do HIV a função desta enzima não está comprometida.

Poucas mutações foram observadas em resíduos importantes para a interação com o co-fator celular LEDGF/p75 e com a multimerização da integrase. No entanto, ensaios funcionais precisam ser realizados no sentido de elucidar o papel dessas substituições no comprometimento da atividade da enzima nestes pacientes.

9) Não observamos um acúmulo de DNA circular 2-LTR nos pacientes controladores de elite, sugerindo que não exista um mecanismo bloqueando a integração nos pacientes desta coorte.

VI. Perspectivas

- 1) Ampliar o painel de validação do método de genotipagem da integrase *in-house*, a fim de definir o *cut-off* a ser preconizado para o uso clínico do teste.
- 2) Realizar ensaios funcionais da integrase com os clones que apresentaram mutações nos resíduos envolvidos com a atividade desta enzima, a fim de identificar se estas alterações poderiam influenciar na capacidade replicativa do HIV nos pacientes controladores de elite.
- 3) Investigar os mecanismos geradores de hipermutação nos pacientes controladores de elite e controladores virêmicos, estudando tanto as proteínas APOBEC quanto a funcionalidade de Vif.
- 4) Estudar o papel do co-fator celular LEDGF/p75 e seu papel no controle da replicação do HIV, avaliando seus níveis de expressão gênica e polimorfismos.

VII. Referência Bibliográfica

- ✓ 2007a. Approval recommended for raltegravir in experienced patients. **AIDS Patient Care STDS** 21(9):702.
- ✓ 2007b. FDA approves raltegravir tablets. **AIDS Patient Care STDS** 21(11):889.
- ✓ 2009. FDA notifications. FDA approves raltegravir for HIV-1 treatment-naive patients. **AIDS Alert** 24(9):106-107.
- ✓ Aguiar RS, Peterlin BM. APOBEC3 proteins and reverse transcription. **Virus Res.** 2008; 134(1-2):74-85.
- ✓ Agut H, Candotti D, Rabanel B, Huraux JM, Remy G, Ingrand D *et al.* Isolation of atypical HIV-1-related retrovirus from AIDS patient. **Lancet.** 1992; 340(8820):681-682.
- ✓ **AIDS EPIDEMIC UPDATE.** UNAIDS. Published jointly by UNAIDS and the World Health Organization. [on-line]. 2010. [capturado em 05 de dezembro de 2011]. Disponível em: <http://www.unaids.org>.
- ✓ Almeida, SEM, Medeiros RM, Maletich DJ, Gräf T, Passaes CPB, Bello G *et al.* Temporal Dynamics of HIV-1 Circulating Subtypes in Distinct Exposure Categories in Southern Brazil. Submetido à publicação.
- ✓ An P, Winkler CA. Host genes associated with HIV/AIDS: advances in gene discovery. **Trends Genet.** 2010; 26(3):119-131.
- ✓ Arhel N, Genovesio A, Kim KA, Miko S, Perret E, Olivo-Marin JC *et al.* Quantitative four-dimensional tracking of cytoplasmic and nuclear HIV-1 complexes. **Nat Methods.** 2006; 3(10):817-824.
- ✓ Arruda LB, Fonseca LA, Duarte AJ, Casseb J. Genetic diversity on the integrase region of the pol gene among HIV type 1-infected patients naive for integrase inhibitors in São Paulo City, Brazil. **AIDS Res Hum Retroviruses.** 2010; 26(1):105-107.
- ✓ Avi R, Huik K, Sadam M, Karki T, Krispin T, Ainsalu K *et al.* Characterization of integrase region polymorphisms in HIV type 1 CRF06_cpx viruses in treatment-naive patients in Estonia. **AIDS Res Hum Retroviruses.** 2010; 26(10):1109-1113.
- ✓ Baldanti F, Paolucci S, Gulminetti R, Brandolini M, Barbarini G, Maserati R. Early emergence of raltegravir resistance mutations in patients receiving HAART salvage regimens. **J Med Virol.** 2010 Jan;82(1):116-122.
- ✓ Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J *et al.* Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). **Science** 1983; 220(4599): 868-871.

- ✓ Bello G, Guimaraes ML, Morgado MG. Evolutionary history of HIV-1 subtype B and F infections in Brazil. **AIDS** 2006; 20(5):763-768.
- ✓ Bello G, Passaes CP, Guimarães ML, Lorete RS, Matos Almeida SE, Medeiros RM, *et al.* Origin and evolutionary history of HIV-1 subtype C in Brazil. **AIDS**. 2008; 22(15):1993-2000.
- ✓ Bello G, Guimarães ML, Passaes CP, Matos Almeida SE, Veloso VG, Morgado MG. Evidences of recent decline in the expansion rate of the HIV type 1 subtype C and CRF31_BC epidemics in southern Brazil. **AIDS Res Hum Retroviruses**. 2009; 25(11):1065-1069.
- ✓ Bergamaschi A, David A, Le Rouzic E, Nisole S, Barré-Sinoussi F, Pancino G. The CDK inhibitor p21Cip1/WAF1 is induced by FcγR activation and restricts the replication of human immunodeficiency virus type 1 and related primate lentiviruses in human macrophages. **J Virol**. 2009; 83(23):12253-12265.
- ✓ Berger G, Durand S, Fargier G, Nguyen XN, Cordeil S, Bouaziz S *et al.* APOBEC3A is a specific inhibitor of the early phases of HIV-1 infection in myeloid cells. **PLoS Pathog**. 2011; 7(9):e1002221.
- ✓ Bieniasz PD. Restriction factors: a defense against retroviral infection. **Trends Microbiol**. 2003; 11(6):286-291.
- ✓ Blanco JL, Varghese V, Rhee SY, Gatell JM, Shafer RW. HIV-1 integrase inhibitor resistance and its clinical implications. **J Infect Dis**. 2011; 203(9):1204-1214.
- ✓ **Boletim Epidemiológico**. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. Ministério da Saúde. [on-line]. Brasil; 2006. [capturado em 05 de dezembro de 2011]. Disponível em: <http://www.aids.gov.br>.
- ✓ **Boletim Epidemiológico**. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. Ministério da Saúde. [on-line]. Brasil; 2007. [capturado em 05 de dezembro de 2011]. Disponível em: <http://www.aids.gov.br>.
- ✓ **Boletim Epidemiológico**. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. Ministério da Saúde. [on-line]. Brasil; 2008. [capturado em 05 de dezembro de 2011]. Disponível em: <http://www.aids.gov.br>.
- ✓ **Boletim Epidemiológico**. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. Ministério da Saúde. [on-line]. Brasil; 2009. [capturado em 05 de dezembro de 2011]. Disponível em: <http://www.aids.gov.br>.
- ✓ **Boletim Epidemiológico**. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. Ministério da Saúde. [on-line]. Brasil; 2010. [capturado em 05 de dezembro de 2011]. Disponível em: <http://www.aids.gov.br>.
- ✓ Bongertz V, Bou-Habib DC, Brigido LF, Caseiro M, Chequer PJ, Couto-Fernandez J *et al.* HIV-1 diversity in Brazil: genetic, biologic, and

- immunologic characterization of HIV-1 strains in three potential HIV vaccine evaluation sites. Brazilian Network for HIV Isolation and Characterization. **J Acquir Immune Defic Syndr.** 2000; 23(2):184-193.
- ✓ Bowerman B, Brown PO, Bishop JM, Varmus HE. A nucleoprotein complex mediates the integration of retroviral DNA. **Genes Dev.** 1989; 3(4):469-478.
 - ✓ Boyd SD, Maldarelli F, Sereti I, Ouedraogo GL, Rehm CA, Boltz V, Shoemaker D, Pau AK. Transmitted raltegravir resistance in an HIV-1 CRF_AG-infected patient. **Antivir Ther.** 2011; 16(2):257-261.
 - ✓ Brenner BG, Lowe M, Moisi D, Hardy I, Gagnon S, Charest H *et al.* Subtype diversity associated with the development of HIV-1 resistance to integrase inhibitors. **J Med Virol.** 2011; 83(5):751-759.
 - ✓ Brígido LF, Nunes CC, Oliveira CM, Knoll RK, Ferreira JL, Freitas CA *et al.* HIV type 1 subtype C and CB Pol recombinants prevail at the cities with the highest AIDS prevalence rate in Brazil. **AIDS Res Hum Retroviruses.** 2007; 23(12):1579-1586.
 - ✓ Brígido LF, Ferreira JL, Almeida VC, Rocha SQ, Ragazzo TG, Estevam DL *et al.* Southern Brazil HIV type 1 C expansion into the state of São Paulo, Brazil. **AIDS Res Hum Retroviruses.** 2011; 27(3):339-344.
 - ✓ Brumme ZL, Li C, Miura T, Sela J, Rosato PC, Brumme CJ *et al.* Reduced replication capacity of NL4-3 recombinant viruses encoding reverse transcriptase-integrase sequences from HIV-1 elite controllers. **J Acquir Immune Defic Syndr.** 2011; 56(2):100-108.
 - ✓ Bukovsky A, Gottlinger H. Lack of integrase can markedly affect human immunodeficiency virus type 1 particle production in the presence of an active viral protease. **J Virol.** 1996; 70:6820–6825.
 - ✓ Bukrinskaya A, Brichacek B, Mann A, Stevenson M. Establishment of a functional human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) reverse transcription complex involves the cytoskeleton. **J. Exp. Med.** 1998; 188, 2113–2125.
 - ✓ Bukrinsky MI, Sharova N, McDonald TL, Pushkarskaya T, Tarpley WG, Stevenson M. Association of integrase, matrix, and reverse transcriptase antigens of human immunodeficiency virus type 1 with viral nucleic acids following acute infection. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 1993; 90(13):6125-6129.
 - ✓ Bushman FD, Engelman A, Palmer I, Wingfield P, Craigie R. Domains of the integrase protein of human immunodeficiency virus type 1 responsible for polynucleotidyl transfer and zinc binding. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1993; 90(8):3428-3432.
 - ✓ Buzón MJ, Massanella M, Llibre JM, Esteve A, Dahl V, Puertas MC *et al.* HIV-1 replication and immune dynamics are affected by raltegravir intensification of HAART-suppressed subjects. **Nat Med.** 2010; 16(4):460-465.

- ✓ Buzón MJ, Seiss K, Weiss R, Brass AL, Rosenberg ES, Pereyra F *et al.* Inhibition of HIV-1 integration in ex vivo-infected CD4 T cells from elite controllers. **J Virol.** 2011; 85(18):9646-9650.
- ✓ Cahn P, Sued O. Raltegravir: a new antiretroviral class for salvage therapy. **Lancet.** 2007; 369(9569):1235-1236.
- ✓ Calugi G, Montella F, Favalli C, Benedetto A. Entire genome of a strain of human immunodeficiency virus type 1 with a deletion of nef that was recovered 20 years after primary infection: large pool of proviruses with deletions of env. **J Virol.** 2006; 80(23):11892-11896.
- ✓ Canducci F, Sampaolo M, Marinozzi MC, Boeri E, Spagnuolo V, Galli A *et al.* Dynamic patterns of human immunodeficiency virus type 1 integrase gene evolution in patients failing raltegravir-based salvage therapies. **AIDS.** 2009; 23(4):455-460.
- ✓ Canducci F, Ceresola ER, Boeri E, Spagnuolo V, Cossarini F, Castagna A *et al.* Cross-resistance profile of the novel integrase inhibitor Dolutegravir (S/GSK1349572) using clonal viral variants selected in patients failing raltegravir. **J Infect Dis.** 2011; 204(11):1811-1815.
- ✓ Cardoso LP, Pereira GA, Viegas AA, Schmaltz LE, Stefani MM. HIV-1 primary and secondary antiretroviral drug resistance and genetic diversity among pregnant women from central Brazil. **J Med Virol.** 2010; 82(3):351-357.
- ✓ Caride E, Brindeiro R, Hertogs K, Larder B, Dehertogh P, Machado E *et al.* Drug-resistant reverse transcriptase genotyping and phenotyping of B and non-B subtypes (F and A) of human immunodeficiency virus type I found in Brazilian patients failing HAART. **Virology.** 2000; 275(1): 107-115.
- ✓ Ceccherini-Silberstein F, Malet I, D'Arrigo R, Antinori A, Marcelin AG, Perno CF. Characterization and structural analysis of HIV-1 integrase conservation. **AIDS Rev.** 2009; 11(1):17-29.
- ✓ Ceccherini-Silberstein F, Malet I, Fabeni L, Dimonte S, Svicher V, D'Arrigo R *et al.* Specific HIV-1 integrase polymorphisms change their prevalence in untreated versus antiretroviral-treated HIV-1-infected patients, all naive to integrase inhibitors. **J Antimicrob Chemother.** 2010; 65(11):2305-2318.
- ✓ Charpentier C, Karmochkine M, Laureillard D, Tisserand P, Bélec L, Weiss L *et al.* Drug resistance profiles for the HIV integrase gene in patients failing raltegravir salvage therapy. **HIV Med.** 2008; 9(9):765-770.
- ✓ Chen H, Li C, Huang J, Cung T, Seiss K, Beamon J *et al.* CD4+ T cells from elite controllers resist HIV-1 infection by selective upregulation of p21. **J Clin Invest.** 2011; 121(4):1549-1560.
- ✓ Cherepanov P, Maertens G, Proost P, Devreese B, Van Beeumen J, Engelborghs Y *et al.* HIV-1 integrase forms stable tetramers and associates with LEDGF/p75 protein in human cells. **J Biol Chem.** 2003; 278(1):372-381.

- ✓ Chiu TK, Davies DR. Structure and function of HIV-1 integrase. **Curr Top Med Chem.** 2004; 4(9):965-977.
- ✓ Christ F, Voet A, Marchand A, Nicolet S, Desimmie BA, Marchand D *et al.* Rational design of small-molecule inhibitors of the LEDGF/p75-integrase interaction and HIV replication. **Nat Chem Biol.** 2010; 6(6):442-448.
- ✓ Ciuffi A, Bushman FD. Retroviral DNA integration: HIV and the role of LEDGF/p75. **Trends Genet.** 2006; 22(7):388-395.
- ✓ Clapham PR, Weiss RA. Immunodeficiency viruses. Spoilt for choice of co-receptors. **Nature.** 1997; 388(6639): 230-231.
- ✓ Coffin J, Haase A, Levy JA, Montagnier L, Oroszlan S, Teich N *et al.* What to call the AIDS virus? **Nature.** 1986a; 321(6065):10.
- ✓ Coffin J, Haase A, Levy JA, Montagnier L, Oroszlan S, Teich N *et al.* Human immunodeficiency viruses. **Science.** 1986b; 232(4751):697.
- ✓ Cooper DA, Steigbigel RT, Gatell JM, Rockstroh JK, Katlama C, Yeni P *et al.* Subgroup and resistance analyses of raltegravir for resistant HIV-1 infection. **N Engl J Med.** 2008; 359(4):355-365.
- ✓ Costin JM. Cytopathic mechanisms of HIV-1. **Virology J.** 2007; 4:100.
- ✓ Couto-Fernandez JC, Silva-de-Jesus C, Veloso VG, Rachid M, Gracie RS, Chequer-Fernandez SL *et al.* Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) genotyping in Rio de Janeiro, Brazil: assessing subtype and drug-resistance associated mutations in HIV-1 infected individuals failing highly active antiretroviral therapy. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 2005; 100(1):73-78.
- ✓ Dalgleish AG, Beverley PC, Clapham PR, Crawford DH, Greaves MF, Weiss RA. The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. **Nature.** 1984; 312(5996): 763-767.
- ✓ Dang Y, Wang X, Esselman WJ, Zheng YH. Identification of APOBEC3DE as another antiretroviral factor from the human APOBEC family. **J Virol.** 2006; 80(21):10522-10533.
- ✓ De Castro N, Braun J, Charreau I, Pialoux G, Cotte L, Katlama C *et al.* Switch from enfuvirtide to raltegravir in virologically suppressed multidrug-resistant HIV-1-infected patients: a randomized open-label trial. **Clin Infect Dis.** 2009; 49(8):1259-1267.
- ✓ De Sa Filho DJ, Sucupira MC, Caseiro MM, Sabino EC, Diaz RS, Janini LM. Identification of two HIV type 1 circulating recombinant forms in Brazil. **AIDS Res Hum Retroviruses.** 2006; 22(1):1-13.
- ✓ Deacon NJ, Tsykin A, Solomon A, Smith K, Ludford-Menting M, Hooker DJ *et al.* Genomic structure of an attenuated quasi species of HIV-1 from a blood transfusion donor and recipients. **Science.** 1995; 270(5238):988-991.

- ✓ Deeks SG, Walker BD. Human immunodeficiency virus controllers: mechanisms of durable virus control in the absence of antiretroviral therapy. **Immunity**. 2007; 27(3):406-416.
- ✓ Delaugerre C. Barrière génétique à la résistance des antirétroviraux: Le point sur le raltégravir, premier inhibiteur d'intégrase. **Med Mal Infect**. 2010; 40 Suppl 1:S1-10.
- ✓ Delaugerre C, De Oliveira F, Lascoux-Combe C, Plantier JC, Simon F. HIV-1 group N: travelling beyond Cameroon. **Lancet**. 2011; 378(9806):1894.
- ✓ Delelis O, Malet I, Na L, Tchertanov L, Calvez V, Marcelin AG *et al*. The G140S mutation in HIV integrases from raltegravir-resistant patients rescues catalytic defect due to the resistance Q148H mutation. **Nucleic Acids Res**. 2009; 37(4):1193-1201.
- ✓ Delelis O, Thierry S, Subra F, Simon F, Malet I, Alloui C *et al*. Impact of Y143 HIV-1 integrase mutations on resistance to raltegravir *in vitro* and *in vivo*. **Antimicrob Agents Chemother**. 2010; 54(1):491-501.
- ✓ Depatureaux A, Leoz M, De Oliveira F, Gueudin M, Damond F, Descamps D *et al*. Specific diagnosis and follow-up of HIV-1 group O infection: RES-O data. **Med Mal Infect**. 2010; 40(12):669-676.
- ✓ Depienne C, Mousnier A, Leh H, Le Rouzic E, Dormont D, Benichou S *et al*. Characterization of the nuclear import pathway for HIV-1 integrase. **J Biol Chem**. 2001; 276(21):18102-18107.
- ✓ Devroe E, Engelman A, Silver PA. Intracellular transport of human immunodeficiency virus type 1 integrase. **J. Cell Sci**. 2003; 116, 4401–4408.
- ✓ Doehle BP, Schafer A, Cullen BR. Human APOBEC3B is a potent inhibitor of HIV-1 infectivity and is resistant to HIV-1 Vif. **Virology**. 2005; 339(2):281-288.
- ✓ Dougan S, Patel B, Tosswill JH, Sinka K: Diagnoses of HIV-1 and HIV-2 in England, Wales, and Northern Ireland associated with West Africa 1. **Sex Transm Infect**. 2005, 81:338-341.
- ✓ Drelich M, Wilhelm R, Mous J. Identification of amino acid residues critical for endonuclease and integration activities of HIV-1 IN protein *in vitro*. **Virology**. 1992; 188(2):459-468.
- ✓ Dubé M, Bego MG, Paquay C, Cohen ÉA. Modulation of HIV-1-host interaction: role of the Vpu accessory protein. **Retrovirology**. 2010; 7:114.
- ✓ Engelman A, Bushman FD, Craigie R. Identification of discrete functional domains of HIV-1 integrase and their organization within an active multimeric complex. **EMBO J**. 1993; 12(8):3269-3275.
- ✓ Engelman A, Craigie R. Identification of conserved amino acid residues critical for human immunodeficiency virus type 1 integrase function *in vitro*. **J Virol**.

1992; 66(11):6361-6369.

- ✓ Engelman A, Mizuuchi K, Craigie R. HIV-1 DNA integration: mechanism of viral DNA cleavage and DNA strand transfer. **Cell**. 1991; 67(6):1211-1221.
- ✓ Eron JJ, Young B, Cooper DA, Youle M, Dejesus E, Andrade-Villanueva J *et al*. Switch to a raltegravir-based regimen versus continuation of a lopinavir-ritonavir-based regimen in stable HIV-infected patients with suppressed viraemia (SWITCHMRK 1 and 2): two multicentre, double-blind, randomised controlled trials. **Lancet**. 2010; 375(9712):396-407.
- ✓ Eshleman SH, Hudelson SE, Smith P, Hackett J, Holzmayer V, Swanson P *et al*. Analysis of pol integrase sequences in diverse HIV type 1 strains using a prototype genotyping assay. **AIDS Res Hum Retroviruses**. 2009; 25(3):343-345.
- ✓ Farnet CM, Haseltine WA. Integration of human immunodeficiency virus type 1 DNA *in vitro*. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 1990; 87(11):4164-4168.
- ✓ Farnet CM, Haseltine WA. Determination of viral proteins present in the human immunodeficiency virus type 1 preintegration complex. **J Virol**. 1991; 65(4):1910-1915.
- ✓ Farnet CM, Bushman FD. HIV-1 cDNA integration: requirement of HMG I (Y) protein for function of preintegration complexes *in vitro*. **Cell**. 1997; 88(4):483-492.
- ✓ Faure A, Calmels C, Desjobert C, Castroviejo M, Caumont-Sarcos A, Tarrago-Litvak L *et al*. HIV-1 integrase crosslinked oligomers are active *in vitro*. **Nucleic Acids Res**. 2005; 33(3):977-986.
- ✓ Ferns RB, Kirk S, Bennett J, Cook PM, Williams I, Edwards S *et al*. The dynamics of appearance and disappearance of HIV-1 integrase mutations during and after withdrawal of raltegravir therapy. **AIDS**. 2009; 23(16):2159-2164.
- ✓ Ferreira AS, Cardoso LP, Stefani MM. Moderate prevalence of transmitted drug resistance and high HIV-1 genetic diversity in patients from Mato Grosso State, Central Western Brazil. **J Med Virol**. 2011; 83(8):1301-1307.
- ✓ Fontella R, Soares MA, Schrago CG. On the origin of HIV-1 subtype C in South America. **AIDS**. 2008; 22(15):2001-2011.
- ✓ Frankel AD, Young JA. HIV-1: fifteen proteins and an RNA. **Annu Rev Biochem**. 1998; 67:1-25.
- ✓ Fransen S, Gupta S, Danovich R, Hazuda D, Miller M, Witmer M *et al*. Loss of raltegravir susceptibility by human immunodeficiency virus type 1 is conferred via multiple nonoverlapping genetic pathways. **J Virol**. 2009; 83(22):11440-11446.

- ✓ Freed EO. HIV-1 replication. **Somat Cell Mol Genet.** 2001; 26(1-6):13-33.
- ✓ Fun A, Van Baelen K, van Lelyveld SF, Schipper PJ, Stuyver LJ, Wensing AM *et al.* Mutation Q95K enhances N155H-mediated integrase inhibitor resistance and improves viral replication capacity. **J Antimicrob Chemother.** 2010; 65(11):2300-2304.
- ✓ Gallay P, Swingler S, Song J, Bushman F, Trono D. HIV nuclear import is governed by the phosphotyrosine-mediated binding of matrix to the core domain of integrase. **Cell.** 1995; 83(4):569-576.
- ✓ Gallien S, Braun J, Delaugerre C, Charreau I, Reynes J, Jeanblanc F *et al.* Efficacy and safety of raltegravir in treatment-experienced HIV-1-infected patients switching from enfuvirtide-based regimens: 48 week results of the randomized EASIER ANRS 138 trial. **J Antimicrob Chemother.** 2011; 66(9):2099-2106.
- ✓ Gallo RC, Sarin PS, Gelmann EP, Robert-Guroff M, Richardson E, Kalyanaraman VS *et al.* Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). **Science.** 1983; 220(4599):865-867.
- ✓ Gao F, Yue L, White AT, Pappas PG, Barchue J, Hanson AP *et al.* Human infection by genetically diverse SIVSM-related HIV-2 in west Africa. **Nature.** 1992; 358(6386):495-499.
- ✓ Gao F, Bailes E, Robertson DL, Chen Y, Rodenburg CM, Michael SF *et al.* Origin of HIV-1 in the chimpanzee Pan troglodytes troglodytes. **Nature.** 1999; 397(6718):436-441.
- ✓ Gao F, Vidal N, Li Y, Trask SA, Chen Y, Kostrikis LG *et al.* Evidence of two distinct subsubtypes within the HIV-1 subtype A radiation. **AIDS Res Hum Retroviruses** 2001; 17(8):675-688.
- ✓ Garrido C, Geretti AM, Zahonero N, Booth C, Strang A, Soriano V *et al.* Integrase variability and susceptibility to HIV integrase inhibitors: impact of subtypes, antiretroviral experience and duration of HIV infection. **J Antimicrob Chemother.** 2010; 65(2):320-326.
- ✓ Garrido C, Soriano V, Geretti AM, Zahonero N, Garcia S, Booth C *et al.* Resistance associated mutations to dolutegravir (S/GSK1349572) in HIV-infected patients--impact of HIV subtypes and prior raltegravir experience. **Antiviral Res.** 2011; 90(3):164-167.
- ✓ Geretti AM, Smith C, Haberl A, Garcia-Diaz A, Nebbia G, Johnson M *et al.* Determinants of virological failure after successful viral load suppression in first-line highly active antiretroviral therapy. **Antivir Ther.** 2008; 13(7):927-936.
- ✓ Graf EH, Mexas AM, Yu JJ, Shaheen F, Liszewski MK, Di Mascio M *et al.* Elite suppressors harbor low levels of integrated HIV DNA and high levels of 2-LTR circular HIV DNA compared to HIV+ patients on and off HAART. **PLoS**

Pathog. 2011; 7(2):e1001300.

- ✓ Gräf T, Passaes CP, Ferreira LG, Grisard EC, Morgado MG, Bello G *et al.* HIV-1 genetic diversity and drug resistance among treatment naïve patients from Southern Brazil: an association of HIV-1 subtypes with exposure categories. **J Clin Virol.** 2011; 51(3):186-191.
- ✓ Grinsztejn B, Nguyen BY, Katlama C, Gatell JM, Lazzarin A, Vittecoq D *et al.* Safety and efficacy of the HIV-1 integrase inhibitor raltegravir (MK-0518) in treatment-experienced patients with multidrug-resistant virus: a phase II randomised controlled trial. **Lancet.** 2007; 369(9569):1261-1269.
- ✓ Guimarães ML, Eyer-Silva WA, Couto-Fernandez JC, Morgado MG. Identification of two new CRF_BF in Rio de Janeiro State, Brazil. **AIDS.** 2008; 22(3):433-435.
- ✓ Haffar OK, Popov S, Dubrovsky L, Agostini I, Tang H, Pushkarsky T *et al.* Two nuclear localization signals in the HIV-1 matrix protein regulate nuclear import of the HIV-1 pre-integration complex. **J Mol Biol.** 2000; 299(2):359-368.
- ✓ Hampl H, Sawitzky D, Stöffler-Meilicke M, Groh A, Schmitt M, Eberle J *et al.* First case of HIV-1 subtype O infection in Germany. **Infection.** 1995; 23(6):369-370.
- ✓ Harari A, Ooms M, Mulder LC, Simon V. Polymorphisms and splice variants influence the antiretroviral activity of human APOBEC3H. **J Virol.** 2009; 83(1):295-303.
- ✓ Hare S, Di Nunzio F, Labeja A, Wang J, Engelman A, Cherepanov P. Structural basis for functional tetramerization of lentiviral integrase. **PLoS Pathog.** 2009; 5(7):e1000515.
- ✓ Hatano H, Lampiris H, Fransen S, Gupta S, Huang W, Hoh R *et al.* Evolution of integrase resistance during failure of integrase inhibitor-based antiretroviral therapy. **J Acquir Immune Defic Syndr.** 2010; 54(4):389-393.
- ✓ Hazuda D, Iwamoto M, Wenning L. Emerging pharmacology: inhibitors of human immunodeficiency virus integration. **Annu Rev Pharmacol Toxicol.** 2009; 49:377-394.
- ✓ Hearps AC, Greengrass V, Hoy J, Crowe SM. An HIV-1 integrase genotype assay for the detection of drug resistance mutations. **Sex Health.** 2009; 6(4):305-309.
- ✓ Hehl EA, Joshi P, Kalpana GV, Prasad VR. Interaction between human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase and integrase proteins. **J Virol.** 2004; 78:5056–5067.
- ✓ Hemelaar J, Gouws E, Ghys PD, Osmanov S. Global and regional distribution of HIV-1 genetic subtypes and recombinants in 2004. **AIDS.** 2006; 20(16):W13-23.

- ✓ Hemelaar J, Gouws E, Ghys PD, Osmanov S; WHO-UNAIDS Network for HIV Isolation and Characterisation. Global trends in molecular epidemiology of HIV-1 during 2000-2007. **AIDS**. 2011; 25(5):679-689.
- ✓ Herring BL, Cunningham AL, Dwyer DE. Potential drug resistance polymorphisms in the Integrase gene of HIV type 1 subtype A. **AIDS Res Hum Retroviruses**. 2004; 20(9): 1010-1014.
- ✓ Hrecka K, Hao C, Gierszewska M, Swanson SK, Kesik-Brodacka M, Srivastava S *et al*. Vpx relieves inhibition of HIV-1 infection of macrophages mediated by the SAMHD1 protein. **Nature**. 2011; 474(7353):658-661.
- ✓ Huang Y, Zhang L, Ho DD. Characterization of gag and pol sequences from long-term survivors of human immunodeficiency virus type 1 infection. **Virology**. 1998; 240(1):36-49.
- ✓ Hunt, P. W. Natural control of HIV-1 replication and long-term nonprogression: overlapping but distinct phenotypes. **J Infect Dis**. 2009; 1636–1638.
- ✓ Iordanskiy S, Berro R, Altieri M, Kashanchi F, Bukrinsky, M. Intracytoplasmic maturation of the human immunodeficiency virus type 1 reverse transcription complexes determines their capacity to integrate into chromatin. **Retrovirology**. 2006; 3, 4.
- ✓ Janini LM, Pieniazek D, Peralta JM, Schechter M, Tanuri A, Vicente AC *et al*. Identification of single and dual infections with distinct subtypes of human immunodeficiency virus type 1 by using restriction fragment length polymorphism analysis. **Virus Genes**. 1996; 13(1): 69-81.
- ✓ Janssens W, Heyndrickx L, Franssen K, Motte J, Peeters M, Nkengasong JN *et al*. Genetic and phylogenetic analysis of env subtypes G and H in central Africa. **AIDS Res Hum Retroviruses**. 1994; 10(7):877-879.
- ✓ Jaskolski M, Alexandratos JN, Bujacz G, Wlodawer A. Piecing together the structure of retroviral integrase, an important target in AIDS therapy. **FEBS J**. 2009; 276(11):2926-2946.
- ✓ Kannangai R, Nair SC, Sridharan G, Prasannakumar S, Daniel D. Frequency of HIV type 2 infections among blood donor population from India: A 10-year experience. **Indian J Med Microbiol**. 2010, 28(2):111-113.
- ✓ Karageorgos L, Li P, Burrell CJ. Stepwise analysis of reverse transcription in a cell-to-cell human immunodeficiency virus infection model: kinetics and implications. **J Gen Virol**. 1995; 76 (Pt 7):1675-1686.
- ✓ LaFemina RL, Schneider CL, Robbins HL, Callahan PL, LeGrow K, Roth E *et al*. Requirement of active human immunodeficiency virus type 1 integrase enzyme for productive infection of human T-lymphoid cells. **J Virol**. 1992; 66(12):7414-7419.
- ✓ Laguette N, Sobhian B, Casartelli N, Ringeard M, Chable-Bessia C, Ségéral E *et*

- al.* SAMHD1 is the dendritic- and myeloid-cell-specific HIV-1 restriction factor counteracted by Vpx. **Nature**. 2011; 474(7353):654-657.
- ✓ Lataillade M, Chiarella J, Kozal MJ. Natural polymorphism of the HIV-1 integrase gene and mutations associated with integrase inhibitor resistance. **Antivir Ther**. 2007; 12(4):563-570.
 - ✓ Learnmont JC, Geczy AF, Mills J, Ashton LJ, Raynes-Greenow CH, Garsia RJ *et al.* Immunologic and virologic status after 14 to 18 years of infection with an attenuated strain of HIV-1. A report from the Sydney Blood Bank Cohort. **N Engl J Med**. 1999; 340(22):1715-1722.
 - ✓ Lee MS, Craigie R. A previously unidentified host protein protects retroviral DNA from autointegration. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 1998; 95(4):1528-1533.
 - ✓ Lee SP, Xiao J, Knutson JR, Lewis MS, Han MK. Zn²⁺ promotes the self-association of human immunodeficiency virus type-1 integrase *in vitro*. **Biochemistry**. 1997; 36(1):173-180.
 - ✓ Leitner T, Escanilla D, Marquina S, Wahlberg J, Brostrom C, Hansson HB *et al.* Biological and molecular characterization of subtype D, G, and A/D recombinant HIV-1 transmissions in Sweden. **Virology**. 1995; 209(1):136-146.
 - ✓ Lennox JL, DeJesus E, Lazzarin A, Pollard RB, Madruga JV, Berger DS *et al.* Safety and efficacy of raltegravir-based versus efavirenz-based combination therapy in treatment-naive patients with HIV-1 infection: a multicentre, double-blind randomised controlled trial. **Lancet**. 2009; 374(9692):796-806.
 - ✓ Leoz M, Depatureaux A, Vessière A, Roquebert B, Damond F, Rousset D *et al.* Integrase polymorphism and HIV-1 group O diversity. **AIDS**. 2008; 22(10):1239-1243.
 - ✓ Levy JA. HIV pathogenesis: 25 years of progress and persistent challenges. **AIDS**. 2009; 23(2):147-160.
 - ✓ Li L, Yoder K, Hansen MS, Olvera J, Miller MD, Bushman FD. Retroviral cDNA integration: stimulation by HMG I family proteins. **J Virol**. 2000; 74(23):10965-10974.
 - ✓ Li L, Olvera JM, Yoder KE, Mitchell RS, Butler SL, Lieber M *et al.* Role of the non-homologous DNA end joining pathway in the early steps of retroviral infection. **EMBO J**. 2001; 20(12):3272-3281.
 - ✓ Li M, Mizuuchi M, Burke TR Jr, Craigie R. Retroviral DNA integration: reaction pathway and critical intermediates. **EMBO J**. 2006; 25(6):1295-1304.
 - ✓ Lin CW, Engelman A. The barrier-to-autointegration factor is a component of functional human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes. **J Virol**. 2003; 77, 5030–5036.
 - ✓ Liu B, Dai R, Tian CJ, Dawson L, Gorelick R, Yu XF. Interaction of the human

- immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid with actin. **J Virol.** 1999; 73(4):2901-2908.
- ✓ Llano M, Delgado S, Vanegas M, Poeschla EM. Lens epithelium-derived growth factor/p75 prevents proteasomal degradation of HIV-1 integrase. **J Biol Chem.** 2004; 279(53):55570-55577.
 - ✓ Louwagie J, Janssens W, Mascola J, Heyndrickx L, Hegerich P, van der Groen G *et al.* Genetic diversity of the envelope glycoprotein from human immunodeficiency virus type 1 isolates of African origin. **J Virol.** 1995; 69(1):263-271.
 - ✓ Louwagie J, McCutchan FE, Peeters M, Brennan TP, Sanders-Buell E, Eddy GA *et al.* Phylogenetic analysis of gag genes from 70 international HIV-1 isolates provides evidence for multiple genotypes. **AIDS.** 1993; 7(6):769-780.
 - ✓ Low A, Prada N, Topper M, Vaida F, Castor D, Mohri H *et al.* Natural polymorphisms of human immunodeficiency virus type 1 integrase and inherent susceptibilities to a panel of integrase inhibitors. **Antimicrob Agents Chemother.** 2009; 53(10):4275-4282.
 - ✓ Machado LF, Ishak MO, Vallinoto AC, Lemos JA, Azevedo VN, Moreira MR *et al.* Molecular epidemiology of HIV type 1 in northern Brazil: identification of subtypes C and D and the introduction of CRF02_AG in the Amazon region of Brazil. **AIDS Res Hum Retroviruses.** 2009; 25(10):961-966.
 - ✓ Madlala P, Gijsbers R, Christ F, Hombrouck A, Werner L, Misana K *et al.* Association of polymorphisms in the LEDGF/p75 gene (PSIP1) with susceptibility to HIV-1 infection and disease progression. **AIDS.** 2011; 25(14):1711-1719.
 - ✓ Maertens G, Cherepanov P, Pluymers W, Busschots K, De Clercq E, Debyser Z *et al.* LEDGF/p75 is essential for nuclear and chromosomal targeting of HIV-1 integrase in human cells. **J Biol Chem.** 2003; 278(35):33528-39.
 - ✓ Maertens G, Cherepanov P, Debyser Z, Engelborghs Y, Engelman A. Identification and characterization of a functional nuclear localization signal in the HIV-1 integrase interactor LEDGF/p75. **J Biol Chem.** 2004; 279(32):33421-33429.
 - ✓ Maïga AI, Malet I, Soulie C, Derache A, Koita V, Amellal B *et al.* Genetic barriers for integrase inhibitor drug resistance in HIV type-1 B and CRF02_AG subtypes. **Antivir Ther.** 2009; 14(1):123-129.
 - ✓ Malet I, Delelis O, Valantin MA, Montes B, Soulie C, Wirden M *et al.* Mutations associated with failure of raltegravir treatment affect integrase sensitivity to the inhibitor *in vitro*. **Antimicrob Agents Chemother.** 2008; 52(4):1351-1358.
 - ✓ Malet I, Delelis O, Soulie C, Wirden M, Tchertanov L, Mottaz P *et al.* Quasispecies variant dynamics during emergence of resistance to raltegravir

- in HIV-1-infected patients. **J Antimicrob Chemother.** 2009; 63(4):795-804.
- ✓ Markowitz M, Nguyen BY, Gotuzzo E, Mendo F, Ratanasuwan W, Kovacs C *et al.* Rapid and durable antiretroviral effect of the HIV-1 Integrase inhibitor raltegravir as part of combination therapy in treatment-naive patients with HIV-1 infection: results of a 48-week controlled study. **J Acquir Immune Defic Syndr.** 2007; 46(2):125-133.
 - ✓ Markowitz M, Nguyen BY, Gotuzzo E, Mendo F, Ratanasuwan W, Kovacs C *et al.* Sustained antiretroviral effect of raltegravir after 96 weeks of combination therapy in treatment-naive patients with HIV-1 infection. **J Acquir Immune Defic Syndr.** 2009; 52(3):350-356.
 - ✓ Meloni ST, Kim B, Sankale JL, Hamel DJ, Tovanabutra S, Mboup S *et al.* Distinct human immunodeficiency virus type 1 subtype A virus circulating in West Africa: sub-subtype A3. **J Virol.** 2004; 78(22):12438-12445.
 - ✓ Mikhail M, Wang B, Saksena, NK. Mechanisms involved in non-progressive HIV disease. **AIDS Rev.** 2003; 5, 230–244.
 - ✓ Miller MD, Farnet CM, Bushman FD. Human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes: studies of organization and composition. **J Virol.** 1997; 71(7):5382-5390.
 - ✓ Min S, Sloan L, DeJesus E, Hawkins T, McCurdy L, Song I *et al.* Antiviral activity, safety, and pharmacokinetics/pharmacodynamics of dolutegravir as 10-day monotherapy in HIV-1-infected adults. **AIDS.** 2011; 25(14):1737-1745.
 - ✓ Mohammed KD, Topper MB, Muesing MA. Sequential deletion of the integrase (Gag-Pol) carboxyl terminus reveals distinct phenotypic classes of defective HIV-1. **J Virol.** 2011; 85(10):4654-4666.
 - ✓ Moir S, Chun TW, Fauci AS. Pathogenic mechanisms of HIV disease. **Annu Rev Pathol.** 2011; 6:223-248.
 - ✓ Molina JM, Lamarca A, Andrade-Villanueva J, Clotet B, Clumeck N, Liu YP *et al.* Efficacy and safety of once daily elvitegravir versus twice daily raltegravir in treatment-experienced patients with HIV-1 receiving a ritonavir-boosted protease inhibitor: randomised, double-blind, phase 3, non-inferiority study. **Lancet Infect Dis.** 2012; 12(1):27-35.
 - ✓ Morgado MG, Guimaraes ML, Galvao-Castro B. HIV-1 polymorphism: a challenge for vaccine development - a review. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 2002; 97(2):143-150.
 - ✓ Morgado MG, Guimaraes ML, Gripp CB, Costa CI, Neves I Jr, Veloso VG *et al.* Molecular epidemiology of HIV-1 in Brazil: high prevalence of HIV-1 subtype B and identification of an HIV-1 subtype D infection in the city of Rio de Janeiro, Brazil. **J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol.** 1998; 18(5): 488-494.

- ✓ Myers G, Maclnnes K, Korber B. The emergence of simian/human immunodeficiency viruses. **AIDS Res Hum Retroviruses**. 1992; 8(3):373-386.
- ✓ Myers RE, Pillay D. Analysis of natural sequence variation and covariation in human immunodeficiency virus type 1 integrase. **J Virol**. 2008; 82(18):9228-9235.
- ✓ Nisole S, Saïb A. Early steps of retrovirus replicative cycle. **Retrovirology**. 2004; 1:9.
- ✓ Nouhin J, Donchai T, Hoang KT, Ken S, Kamkorn J, Tran T *et al*. Natural polymorphisms of HIV-1 CRF01_AE integrase coding region in ARV-naïve individuals in Cambodia, Thailand and Vietnam: an ANRS AC12 working group study. **Infect Genet Evol**. 2011; 11(1):38-43.
- ✓ Palella FJ Jr, Delaney KM, Moorman AC, Loveless MO, Fuhrer J, Satten GA *et al*. Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigators. **N Engl J Med**. 1998; 338(13):853-860.
- ✓ Palmer S, Maldarelli F, Wiegand A, Bernstein B, Hanna GJ, Brun SC *et al*. Low-level viremia persists for at least 7 years in patients on suppressive antiretroviral therapy. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2008; 105(10):3879-3884.
- ✓ Pantaleo G, Fauci AS. Immunopathogenesis of HIV infection. **Annu Rev Microbiol**. 1996; 50:825-54.
- ✓ Passaes CP, Bello G, Lorete RS, Matos Almeida SE, Junqueira DM, Veloso VG *et al*. Genetic characterization of HIV-1 BC recombinants and evolutionary history of the CRF31_BC in Southern Brazil. **Infect Genet Evol**. 2009a; 9(4):474-482.
- ✓ Passaes CP, Guimarães ML, Bello G, Morgado MG. Near full-length genome characterization of HIV type 1 unique BC recombinant forms from Southern Brazil. **AIDS Res Hum Retroviruses**. 2009b; 25(12):1339-1344.
- ✓ Passaes CB, Guimarães ML, Fernandez SL, Lorete Rdos S, Teixeira SL, Fernandez JC *et al*. Lack of primary mutations associated with integrase inhibitors among HIV-1 subtypes B, C, and F circulating in Brazil. **J Acquir Immune Defic Syndr**. 2009c; 51(1):7-12.
- ✓ Peeters M, Lobe V, Nkengasong J, Willems B, Delforge ML, Van Renterghem L *et al*. HIV-1 group O infection in Belgium. **Acta Clin Belg**. 1995; 50(3):171-173.
- ✓ Peng G, Greenwell-Wild T, Nares S, Jin W, Lei KJ, Rangel ZG *et al*. Myeloid differentiation and susceptibility to HIV-1 are linked to APOBEC3 expression. **Blood**. 2007; 110(1):393-400.
- ✓ Petit C, Giron ML, Tobaly-Tapiero J, Bittoun P, Real E, Jacob Y *et al*. Targeting

of incoming retroviral Gag to the centrosome involves a direct interaction with the dynein light chain 8. **J Cell Sci.** 2003; 116(Pt 16):3433-3442.

- ✓ Piacentini L, Biasin M, Fenizia C, Clerici M. Genetic correlates of protection against HIV infection: the ally within. **J Intern Med.** 2009; 265, 110–124.
- ✓ Plantier JC, Leoz M, Dickerson JE, De Oliveira F, Cordonnier F, Lemée V *et al.* A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. **Nat Med.** 2009; 15(8):871-872.
- ✓ Pommier Y, Johnson AA, Marchand C. Integrase inhibitors to treat HIV/AIDS. **Nat Rev Drug Discov.** 2005; 4(3):236-248.
- ✓ Popov S, Rexach M, Ratner L, Blobel G, Bukrinsky M. Viral protein R regulates docking of the HIV-1 preintegration complex to the nuclear pore complex. **J Biol. Chem.** 1998; 273, 13347–13352.
- ✓ Poropatch K, Sullivan DJ Jr. Human immunodeficiency virus type 1 long-term non-progressors: the viral, genetic and immunological basis for disease non-progression. **J Gen Virol.** 2011; 92(Pt 2):247-268.
- ✓ Prada N, Markowitz M. Novel integrase inhibitors for HIV. **Expert Opin Investig Drugs.** 2010; 19(9):1087-1098.
- ✓ Quercia R, Dam E, Perez-Bercoff D, Clavel F. Selective-advantage profile of human immunodeficiency virus type 1 integrase mutants explains *in vivo* evolution of raltegravir resistance genotypes. **J Virol.** 2009; 83(19):10245-10249.
- ✓ Quillent C, Borman AM, Paulous S, Dauguet C, Clavel F. Extensive regions of pol are required for efficient human immunodeficiency virus polyprotein processing and particle maturation. **Virology.** 1996; 219:29–36.
- ✓ Rayfield MA, Sullivan P, Bandea CI, Britvan L, Otten RA, Pau CP *et al.* HIV-1 group O virus identified for the first time in the United States. **Emerg Infect Dis.** 1996; 2(3):209-212.
- ✓ Reigadas S, Anies G, Masquelier B, Calmels C, Stuyver LJ, Parissi V *et al.* The HIV-1 integrase mutations Y143C/R are an alternative pathway for resistance to Raltegravir and impact the enzyme functions. **PLoS One.** 2010; 5(4):e10311.
- ✓ Rhee SY, Liu TF, Kiuchi M, Zioni R, Gifford RJ, Holmes SP *et al.* Natural variation of HIV-1 group M integrase: implications for a new class of antiretroviral inhibitors. **Retrovirology.** 2008; 5:74.
- ✓ Robertson DL, Anderson JP, Bradac JA, Carr JK, Foley B, Funkhouser RK *et al.* HIV-1 nomenclature proposal. **Science.** 2000; 288(5463):55-56.
- ✓ Rockstroh JK, Teppler H, Zhao J, Sklar P, Miller MD, Harvey CM *et al.* Clinical efficacy of raltegravir against B and non-B subtype HIV-1 in phase III clinical

studies. **AIDS**. 2011; 25(11):1365-1369.

- ✓ Rodrigues R, Manenti S, Romao PR, de Paula Ferreira JL, Batista JP, Siqueira AF, *et al*. Young pregnant women living with HIV/AIDS in Criciúma, Southern Brazil, are infected almost exclusively with HIV type 1 clade C. **AIDS Res Hum Retroviruses**. 2010; 26(3):351-357.
- ✓ Roquebert B, Damond F, Brun-Vézinet F, Descamps D. Diversité génétique des VIH et ses conséquences. **Pathol Biol**. 2009; 57(2):142-148.
- ✓ Sáez-Cirión A, Hamimi C, Bergamaschi A, David A, Versmisse P, Mélard A *et al*. Restriction of HIV-1 replication in macrophages and CD4+ T cells from HIV controllers. **Blood**. 2011; 118(4):955-964.
- ✓ Sahu GK, Sarria JC, Cloyd MW. Recovery of replication-competent residual HIV-1 from plasma of a patient receiving prolonged, suppressive highly active antiretroviral therapy. **J Virol**. 2010; 84(16):8348-8352.
- ✓ Sakai H, Kawamura M, Sakuragi J, Sakuragi S, Shibata R, Ishimoto A *et al*. Integration is essential for efficient gene expression of human immunodeficiency virus type 1. **J Virol**. 1993; 67(3):1169-1174.
- ✓ Saksena NK, Rodes B, Wang B, Soriano V. Elite HIV controllers: myth or reality? **AIDS Rev**. 2007; 9, 195–207.
- ✓ Sanabani SS, Pastena ER, Neto WK, Martinez VP, Sabino EC. Characterization and frequency of a newly identified HIV-1 BF1 intersubtype circulating recombinant form in São Paulo, Brazil. **Virol J**. 2010; 7:74.
- ✓ Santos AF, Sousa TM, Soares EA, Sanabani S, Martinez AM, Sprinz E *et al*. Characterization of a new circulating recombinant form comprising HIV-1 subtypes C and B in southern Brazil. **AIDS**. 2006; 20(16):2011-2019
- ✓ Santos AF, Schrago CG, Martinez AM, Mendoza-Sassi R, Silveira J, Sousa TM *et al*. Epidemiologic and evolutionary trends of HIV-1 CRF31_BC-related strains in southern Brazil. **J Acquir Immune Defic Syndr**. 2007; 45(3):328-333.
- ✓ Sattentau QJ, Moore JP, Vignaux F, Traincard F, Poignard P. Conformational changes induced in the envelope glycoproteins of the human and simian immunodeficiency viruses by soluble receptor binding. **J Virol**. 1993; 67(12): 7383-7393.
- ✓ Schacker T. New tools to track HIV. **Nat Med**. 2010; 16(4):373-374.
- ✓ Schroder AR, Shinn P, Chen H, Berry C, Ecker JR, Bushman F. HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots. **Cell**. 2002; 110(4):521-529.
- ✓ Sharkey ME, Teo I, Greenough T, Sharova N, Luzuriaga K, Sullivan JL *et al*. Persistence of episomal HIV-1 infection intermediates in patients on highly

active anti-retroviral therapy. **Nat Med.** 2000; 6(1):76-81.

- ✓ Sharkey ME, Stevenson M. Two long terminal repeat circles and persistent HIV-1 replication. **Curr Opin Infect Dis.** 2001; 14(1):5-11.
- ✓ Sharkey M, Triques K, Kuritzkes DR, Stevenson M. *In vivo* evidence for instability of episomal human immunodeficiency virus type 1 cDNA. **J Virol.** 2005; 79(8):5203-5210.
- ✓ Shin CG, Taddeo B, Haseltine WA, Farnet CM. Genetic analysis of the human immunodeficiency virus type 1 integrase protein. **J Virol.** 1994; 68:1633–1642.
- ✓ Sichtig N, Sierra S, Kaiser R, Däumer M, Reuter S, Schülter E *et al.* Evolution of raltegravir resistance during therapy. **J Antimicrob Chemother.** 2009; 64(1):25-32.
- ✓ Silva MM, Telles FQ, da Cunha CA, Rhame FS. HIV subtype, epidemiological and mutational correlations in patients from Paraná, Brazil. **Braz J Infect Dis.** 2010; 14(5):495-501.
- ✓ Sirven A, Pflumio F, Zennou V, Titeux M, Vainchenker W, Coulombel L *et al.* The human immunodeficiency virus type-1 central DNA flap is a crucial determinant for lentiviral vector nuclear import and gene transduction of human hematopoietic stem cells. **Blood.** 2000; 96(13):4103-10.
- ✓ Sloan RD, Wainberg MA. The role of unintegrated DNA in HIV infection. **Retrovirology.** 2011; 8:52.
- ✓ Soares EA, Santos RP, Pellegrini JA, Sprinz E, Tanuri A, Soares MA. Epidemiologic and molecular characterization of human immunodeficiency virus type 1 in southern Brazil. **J Acquir Immune Defic Syndr.** 2003; 34(5):520-526
- ✓ Soares EA, Martinez AM, Souza TM, Santos AF, Da Hora V, Silveira J *et al.* HIV-1 subtype C dissemination in southern Brazil. **AIDS.** 2005; 19 Suppl 4:S81-86.
- ✓ Soriano V, Gomes P, Heneine W, Holguín A, Doruana M, Antunes R *et al.* Human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) in Portugal: clinical spectrum, circulating subtypes, virus isolation, and plasma viral load. **J Med Virol.** 2000; 61:111-116.
- ✓ St Gelais C, Wu L. SAMHD1: a new insight into HIV-1 restriction in myeloid cells. **Retrovirology.** 2011; 8:55.
- ✓ Steigbigel RT, Cooper DA, Kumar PN, Eron JE, Schechter M, Markowitz M *et al.* Raltegravir with optimized background therapy for resistant HIV-1 infection. **N Engl J Med.** 2008; 359(4):339-354.
- ✓ Stevenson M. Dissecting HIV-1 through RNA interference. **Nat Rev Immunol.**

2003; 3(11):851-858.

- ✓ Suzuki Y, Craigie R. The road to chromatin - nuclear entry of retroviruses. **Nat Rev Microbiol.** 2007; 5(3):187-196.
- ✓ Swanson P, Devare SG, Hackett J Jr. Molecular characterization of 39 HIV isolates representing group M (subtypes A-G) and group O: sequence analysis of gag p24, pol integrase, and env gp41. **AIDS Res Hum Retroviruses.** 2003; 19(7):625-629.
- ✓ Thèze J, Chakrabarti LA, Vingert B, Porichis F, Kaufmann DE. HIV controllers: a multifactorial phenotype of spontaneous viral suppression. **Clin Immunol.** 2011; 141(1):15-30.
- ✓ Towner W, Klein D, Kerrigan HL, Follansbee S, Yu K, Horberg M. Virologic outcomes of changing enfuvirtide to raltegravir in HIV-1 patients well controlled on an enfuvirtide based regimen: 24-week results of the CHEER study. **J Acquir Immune Defic Syndr.** 2009; 51(4):367-373.
- ✓ Triques K, Bourgeois A, Saragosti S, Vidal N, Mpoudi-Ngole E, Nzilambi N *et al.* High diversity of HIV-1 subtype F strains in Central Africa. **Virology.** 1999; 259(1):99-109.
- ✓ Triques K, Bourgeois A, Vidal N, Mpoudi-Ngole E, Mulanga-Kabeya C, Nzilambi N *et al.* Near-full-length genome sequencing of divergent African HIV type 1 subtype F viruses leads to the identification of a new HIV type 1 subtype designated K. **AIDS Res Hum Retroviruses.** 2000; 16(2):139-151.
- ✓ Tsurutani N, Kubo M, Maeda Y, Ohashi T, Yamamoto N, Kannagi M *et al.* Identification of critical amino acid residues in human immunodeficiency virus type 1 IN required for efficient proviral DNA formation at steps prior to integration in dividing and nondividing cells. **J Virol.** 2000; 74(10):4795-4806.
- ✓ Valadas E, França L, Sousa S, Antunes F: 20 Years of HIV-2 Infection in Portugal: Trends and Changes in Epidemiology. **Clin Infect Dis.** 2009, 48:1166-1167.
- ✓ van Gent DC, Vink C, Groeneger AA, Plasterk RH. Complementation between HIV integrase proteins mutated in different domains. **EMBO J.** 1993; 12(8):3261-3267.
- ✓ van Hal SJ, Herring B, Deris Z, Wang B, Saksena NK, Dwyer DE. HIV-1 integrase polymorphisms are associated with prior antiretroviral drug exposure. **Retrovirology.** 2009; 6:12.
- ✓ Van Heuverswyn F, Li Y, Neel C, Bailes E, Keele BF, Liu W *et al.* Human immunodeficiency viruses: SIV infection in wild gorillas. **Nature.** 2006; 444(7116):164.
- ✓ Van Laethem K, Schrooten Y, Covens K, Dekeersmaeker N, De Munter P, Van Wijngaerden E *et al.* A genotypic assay for the amplification and sequencing of integrase from diverse HIV-1 group M subtypes. **J Virol Methods.** 2008;

153(2):176-181.

- ✓ van Lunzen J, Maggiolo F, Arribas JR, Rakhmanova A, Yeni P, Young B *et al.* Once daily dolutegravir (S/GSK1349572) in combination therapy in antiretroviral-naïve adults with HIV: planned interim 48 week results from SPRING-1, a dose-ranging, randomised, phase 2b trial. **Lancet Infect Dis.** 2011 [Epub ahead of print].
- ✓ Vandegraaff N, Devroe E, Turlure F, Silver PA, Engelman A. Biochemical and genetic analyses of integrase-interacting proteins lens epithelium-derived growth factor (LEDGF)/p75 and hepatoma-derived growth factor related protein 2 (HRP2) in preintegration complex function and HIV-1 replication. **Virology.** 2006; 346(2):415-426.
- ✓ Varghese V, Liu TF, Rhee SY, Libiran P, Trevino C, Fessel WJ *et al.* HIV-1 integrase sequence variability in antiretroviral naïve patients and in triple-class experienced patients subsequently treated with raltegravir. **AIDS Res Hum Retroviruses.** 2010; 26(12):1323-1326.
- ✓ Vicente AC, Otsuki K, Silva NB, Castilho MC, Barros FS, Pieniazek D *et al.* The HIV epidemic in the Amazon Basin is driven by prototypic and recombinant HIV-1 subtypes B and F. **J Acquir Immune Defic Syndr.** 2000; 23(4):327-331.
- ✓ Vidal N, Mulanga C, Bazepeo SE, Lepira F, Delaporte E, Peeters M. Identification and molecular characterization of subsubtype A4 in central Africa. **AIDS Res Hum Retroviruses.** 2006; 22(2):182-187.
- ✓ Vincent KA, York-Higgins D, Quiroga M, Brown PO. Host sequences flanking the HIV provirus. **Nucleic Acids Res.** 1990; 18(20): 6045-6047.
- ✓ Vink C, Groenink M, Elgersma Y, Fouchier RA, Tersmette M, Plasterk RH. Analysis of the junctions between human immunodeficiency virus type 1 proviral DNA and human DNA. **J Virol.** 1990; 64(11): 5626-5627.
- ✓ Vink C, Oude Groeneger AM, Plasterk RH. Identification of the catalytic and DNA-binding region of the human immunodeficiency virus type I integrase protein. **Nucleic Acids Res.** 1993; 21(6):1419-1425.
- ✓ Wang JY, Ling H, Yang W, Craigie R. Structure of a two-domain fragment of HIV-1 integrase: implications for domain organization in the intact protein. **EMBO J.** 2001; 20(24):7333-7343.
- ✓ Wilk T, Gowen B, Fuller SD. Actin associates with the nucleocapsid domain of the human immunodeficiency virus Gag polyprotein. **J. Virol.** 1999; 73, 1931–1940.
- ✓ Wirden M, Simon A, Schneider L, Tubiana R, Malet I, Ait-Mohand H *et al.* Raltegravir has no residual antiviral activity *in vivo* against HIV-1 with resistance-associated mutations to this drug. **J Antimicrob Chemother.** 2009; 64(5):1087-1090.

- ✓ Wu X, Liu H, Xiao H, Conway JA, Hehl E, Kalpana GV *et al.* Human immunodeficiency virus type 1 integrase protein promotes reverse transcription through specific interactions with the nucleoprotein reverse transcription complex. **J Virol.** 1999; 73(3):2126-2135.
- ✓ Yoder KE, Bushman FD. Repair of gaps in retroviral DNA integration intermediates. **J Virol.** 2000; 74(23):11191-11200.
- ✓ Young B, Fransen S, Greenberg KS, Thomas A, Martens S, St Clair M *et al.* Transmission of integrase strand-transfer inhibitor multidrug-resistant HIV-1: case report and response to raltegravir-containing antiretroviral therapy. **Antivir Ther.** 2011; 16(2):253-256.
- ✓ Zhang J, Scadden DT, Crumpacker CS. Primitive hematopoietic cells resist HIV-1 infection via p21. **J Clin Invest.** 2007; 117(2):473-481.
- ✓ Zheng R, Jenkins TM, Craigie R. Zinc folds the N-terminal domain of HIV-1 integrase, promotes multimerization, and enhances catalytic activity. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 1996; 93(24):13659-13664.
- ✓ Zheng Y, Ao Z, Wang B, Jayappa KD, Yao X. Host protein Ku70 binds and protects HIV-1 integrase from proteasomal degradation and is required for HIV replication. **J Biol Chem.** 2011; 286(20):17722-17735.
- ✓ Zheng YH, Irwin D, Kurosu T, Tokunaga K, Sata T, Peterlin BM. Human APOBEC3F is another host factor that blocks human immunodeficiency virus type 1 replication. **J Virol.** 2004; 78(11):6073-6076.
- ✓ Zhu K, Dobard C, Chow SA. Requirement for integrase during reverse transcription of human immunodeficiency virus type 1 and the effect of cysteine mutations of integrase on its interactions with reverse transcriptase. **J Virol.** 2004; 78(10):5045-5055.
- ✓ Zolopa AR, Berger DS, Lampiris H, Zhong L, Chuck SL, Enejosa JV *et al.* Activity of elvitegravir, a once-daily integrase inhibitor, against resistant HIV Type 1: results of a phase 2, randomized, controlled, dose-ranging clinical trial. **J Infect Dis.** 2010; 201(6):814-822.