

JACQUELINE DE SOUZA CAVALCANTI

Resistência genotípica para inibidores da integrase  
do HIV-1

Tese apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, para a obtenção do Título de Doutor em Ciências.

**Área de Concentração: Pesquisas  
Laboratoriais em Saúde Pública**

**Orientador:** Prof. Dr. Luís Fernando  
de Macedo Brígido

**São Paulo  
2016**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pelo Centro de Documentação – Coordenadoria de Controle de Doenças/SES-SP

©reprodução autorizada pelo autor, desde que citada a fonte

Cavalcanti, Jaqueline de Souza.

Resistência genotípica para inibidores da integrase do HIV-1 / Jaqueline de Souza Cavalcanti. – 2015.

Tese (Doutorado em Ciências) - Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças, São Paulo, 2015.

Área de concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública.

Orientação: Prof. Dr. Luís Fernando de Macedo Brígido.

1. HIV-1/patogenicidade. 2. Integrase de HIV/efeitos de drogas.

3. Mutação/ efeitos de drogas. 4. Inibidores de Integrase de HIV/uso terapêutico. 5. Resistência a Fármacos/genética. 6. Terapia Antirretroviral de Alta Atividade/tendências.

SES/CCD/CD-316/2015

# DEDICATÓRIA

*A Deus, pelas obras e maravilhas  
que tem feito em minha vida  
as quais não cesso de agradecer.*

*Aos meus pais,  
Creuza e Manoel Messias (in memoriam), pelo  
afeto, dedicação, conselhos e esforços que  
sempre tiveram em me mostrar o caminho da  
educação, trabalho e amor a Deus. Obrigada pela  
oportunidade que vocês deram a mim e aos meus  
irmãos.*

*Aos meus irmãos,*

*Wagner, Sheila e Jonathas pela  
amizade, risadas e por estarem sempre  
por perto em todos os momentos.  
Obrigada por nunca desistirem de mim.*

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Dr. Luis Fernando de Macedo Brígido, não só pela orientação deste trabalho, mas também pelo apoio e palavras de estímulos que me fizeram acreditar em meu potencial profissional.

A equipe dos Laboratório do Núcleo de Doenças Sanguíneas e Sexuais, pela amizade e colaboração neste trabalho, em especial ao Laboratório de Retrovírus.

As pessoas maravilhosas que encontrei pelo caminho no IAL e que ao longo desses anos mesmo sem perceberem me ajudaram a todo o momento, especialmente a Gabriela Cabral, Paula Morena G, Mariana Cavalheira Magri, Denise Helena Moreira, Mayra Simioni Zaparoli, João Paulo Gervásio e João Leandro de Paula Ferreira, o meu muito obrigado pela amizade e carinho.

A todos os amigos que participaram direta ou indiretamente não só na elaboração deste trabalho, mas também pelos votos de incentivo.

"Um pouco de ciência nos afasta de Deus. Muito, nos aproxima."  
(Louis Pasteur)

## RESUMO

A Integrase participa de uma das etapas fundamentais para a replicação do HIV, a inserção do DNA retrotranscrito no genoma humano. Atualmente já foram licenciados três inibidores da integrase (INIs) para o uso de pacientes naíve à terapia antirretroviral ou multi-experimentados, raltegravir (RAL), elvitegravir (EVG) e dolutegravir (DTG). Embora esses medicamentos sejam eficientes e bem tolerados, a falha terapêutica pode estar associada a seleção de mutações em pelo menos quatro vias distintas (E92Q, Q148H/R/K, N155H e menos frequente a Y143R/H/C) associadas ou não à mutações secundárias. Este estudo teve por objetivo avaliar o gene da integrase em pacientes vivendo com HIV/AIDS. Foram incluídas 265 amostras de pacientes com perfis diferentes de exposições à terapia antirretroviral (TARV): naíve de TARV (n=34), naíve para INIs (n=59), em terapia com TARV+RAL com carga viral suprimida (n=35) e em terapia com TARV+RAL com falha virológica (n=137). As amostras dos pacientes com exposição a INIs foram coletadas no período entre julho de 2009 e maio de 2015. Sequências genéticas foram submetidas à websites e ferramentas de bioinformática para a análise de resistência aos antirretrovirais e determinação de subtipos virais. Nenhuma mutação principal foi observada em amostras de pacientes naíve para INIs, porém alguns polimorfismos observados parecem estar associados a certos subtipos do HIV-1. Entre os pacientes expostos as TARV+RAL, a maioria tinham poucos antirretrovirais ativos compondo a terapia. A adesão e a viremia nas semanas 12-24 após a TARV+RAL ( $p < 0,01$ ) apresentaram associação à supressão viral. Mutações principais para o INIs foram observadas em 62% dos pacientes em uso de TARV+RAL. Em um paciente houve a seleção da mutação F121Y, com evolução subsequente para Y143R. Entre os pacientes com falha virológica ao TARV+RAL, 35% apresentaram resistência intermediária ou alta ao DTG, com associação das mutações G140S/A e E138A/K ( $p < 0,001$ ). Quando comparados os anos do estudo houve: (i) aumento do tempo de exposição ao TARV+RAL ( $p = 0,001$ ); (ii) declínio da resistência para DTG ( $p = 0,05$ ); e



(iii) declínio do tempo em falha virológica a TARV+RAL ( $p=0,039$ ). Neste estudo foi observado uma alta proporção de resistência aos INIs em pacientes falhando a TARV+RAL, inclusive para os de segunda geração. Os resultados reforçam a importância do monitoramento da TARV+RAL para minimizar o tempo em falha virológica e o acúmulo de mutações associadas à resistência aos INIs.

**Palavras chave:** HIV, terapia antirretroviral, resistência, Integrase.

## ABSTRACT

The integrase part of one of the key steps for HIV replication, insertion of DNA retrotranscribed in the human genome. Currently they were already licensed three integrase inhibitors (INIs) for the use of antiretroviral therapy naïve patients or multi-experienced, raltegravir, elvitegravir and dolutegravir. Although these drugs are effective and well tolerated, therapy failure may be associated with selection of mutations in at least four distinct pathways (E92Q, Q148H/R/K N155H and less frequent Y143R/ F/C) or not associated with secondary mutations. This study aims to evaluate the integrase gene in patients living with HIV/Aids. We included 265 samples from patients with different profiles of exposure to antiretroviral therapy (ART): naïve to antiretroviral therapy (n=34), naïve to INIS (n=59), in therapy with TARV+RAL with suppressed viral load (n=35) and therapy with TARV+RAL with virologic failure (n=137). Samples from patients exposed to INIs were collected between July 2009 and May 2015. Also in order to evaluate transmitted resistance and natural polymorphisms in the integrase gene, 93 samples from patients without exposure to INIs were included. Gene sequences were submitted to websites and bioinformatics tools for the analysis of resistance to antiretroviral drugs and determination of viral subtypes. No major mutation was observed in samples from INIs naïve patients, however, some polymorphisms were observed to be associated with specific subtypes of HIV. Most patients had few active antiretroviral composing TARV+RAL. Adherence and detectable viremia at 12-24 weeks after TARV+RAL ( $p<0.01$ ) was associated with viral suppression. Major mutations to the INIs were observed in 62% of patients after TARV+RAL. In one case the selection of the F121Y mutation was observed, with subsequent evolution to Y143R. Among patients with virologic failure to TARV+RAL, 35% had intermediate or high resistance to dolutegravir with association of the presence of mutations G140S/A and E138A/K ( $p<0.001$ ). When the years of the study were compared we found: (i) an increasing time

of exposure to TARV+RAL ( $p=0.001$ ); (ii) decline in resistance to dolutegravir ( $p=0.05$ ); and (iii) decline in time to virological failure TARV+RAL ( $p=0.039$ ). In this study, we observed a high proportion of resistance to INIs in patients failing TARV+RAL, including the second generation. The results describes the resistance to this new antiretroviral class in Brazil, documents new mutational patterns and predictors of resistance emergence and reinforces the importance Raltegravir salvage therapy monitoring to minimize the time in virological failure and subsequente accumulation of mutations associated with resistance to INIs.

**Keywords:** HIV, antiretroviral therapy, resistance, Integrase.

## LISTA DE ABREVIATURAS

µg	Micrograma (10 <sup>-6</sup> Grama)
µL	Microlitro (10 <sup>-6</sup> Litro)
3TC	Lamivudina
ABC	Abacavir
aids	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
ARV	Antirretroviral
ATV	Atazanavir
AZT	Zidovudina
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
cel/mm <sup>3</sup>	Células por milímetro cúbico
CRF	Forma Circulante Recombinante
D4T	Estavudina
DDI	Didanosina
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNAse	Desoxirribonuclease
dNTP	Deoxirribonucleosídeo trifosfatado
ddNTP	Dideoxirribonucleosídeo trifosfatados
DRV	Darunavir
DTG	Dolutegravir
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ácido etilenediaminetetracético
EFV	Efavirenz

ENV	Envelope viral
ETV	Etravirina
EVG	Elvitegravir
FPV	Fosemprenavir
FTC	Emtricitabina
GAG	Grupo Específico de Antígenos
gp	Glicoproteína
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IDV	Indinavir
INI	Inibidor de integrase
IN	Integrase
IP	Inibidor de Protease
LAV	Vírus Associado à Linfadenopatia
LPV	Lopinavir
LPV/r	Lopinavir associado a ritonavir
LTR	Seqüências Terminais Longas Repetidas
MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de Magnésio
mL	Mililitro (10 <sup>-3</sup> Litro)
NCBI	Centro Nacional para Informação Biotecnológica
NEF	Fator de regulação negativa
NFV	Nelfinavir
ng	Nanograma (10 <sup>-9</sup> Grama)
nm	Nanômetro
NNRTI	Inibidor de transcriptase reversa não-análogo de nucleosídeo

NRTI	Inibidor de transcriptase reversa análogo de nucleosídeo
NVP	Nevirapina
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico
PCR	Reação em cadeia da polimerase
POL	Polimerase
PT	Protease
REV	Regulador da expressão de proteínas virais
RNA	Ácido ribonucléico
RNAse	Ribonuclease
RT	Transcriptase Reversa
RT-PCR	Retrotranscrição e Reação em Cadeia da Polimerase
SIV	Vírus da Imunodeficiência Símia
SIVcpz	Vírus da Imunodeficiência Símia em chimpanzés
SIVsm	Vírus da Imunodeficiência Símia em sooty mangabeys
SQV	Saquinavir
TARV+RAL	Terapia antirretroviral contendo raltegravir
TAT	Trans-ativador transcricional
TCD4	Linfócito T auxiliar
T-20	Enfuvirtide
TBE	Tris, Ácido Bórico, EDTA
TCD8	Linfócito T citotóxico
TDF	Tenofovir
TPV	Tipranavir
U	Unidade

UNAIDS	Joint United Nations Programme on HIV/aids
V	Volts
VIF	Fator de infectividade viral
VPR	Proteína viral R
VPU	Proteína viral U
Vírus R5	Vírus com tropismo pelo co-receptor CCR5
Vírus X4	Vírus com tropismo pelo co-receptor CXCR4

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b>	Estrutura esquemática do HIV em corte transversal	19
<b>Figura 2:</b>	Organização genômica do HIV-1, com os seus três quadros de leitura	20
<b>Figura 3:</b>	Etapas da replicação do HIV.	22
<b>Figura 4:</b>	Mutações associadas à resistência aos inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeos	25
<b>Figura 5:</b>	Mutações associadas à resistência aos inibidores da transcriptase reversa não análogos de nucleosídeos.	26
<b>Figura 6:</b>	Mutações associadas à resistência aos inibidores de protease.	27
<b>Figura 7:</b>	Representação dos três domínios da integrase.	29
<b>Figura 8:</b>	Etapas do processo de integração.	30
<b>Figura 9:</b>	Estrutura química dos INIs licenciados e do composto em estudo cabotegravir.	38
<b>Figura 10:</b>	Resistência intermediária a alta aos INIs de acordo com o Stanford HIVdb em amostras de pacientes em falha virológica a TARV+RAL, durante os 6 anos.	63
<b>Figura 11:</b>	Frequência das mutações maiores associadas a resistência aos inibidores de integrase em amostras de pacientes em falha virológica a TARV+RAL, durante os 6 anos.	63
<b>Figura 12:</b>	Evolução da carga viral e células TCD4+ do paciente anterior a introdução de raltegravir e na seleção da mutação F121Y e da Y143R.	68
<b>Figura 13:</b>	Alinhamento das sequências (triplicatas) anterior a exposição ao raltegravir (RAL-naïve) e nas semanas 32, 40 e 88 após a introdução de TARV+RAL.	69



**Figura 14:** Árvore filogenética com sequencias do paciente que apresentou a F121Y

70

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Iniciadores utilizados para a amplificação do gene completo da integrase 48
- Tabela 2:** Iniciadores utilizados para a amplificação do gene da protease e transcriptase reversa. 50
- Tabela 3:** Prevalência de polimorfismos associados à resistência aos INIs, de acordo com o algoritmo de Stanford HIVdb, em amostras sem exposição TARV+RAL e as sequências depositadas no LANL. 57
- Tabela 4:** Características de baseline dos pacientes em falha a TARV+RAL de acordo com a susceptibilidade ao RAL 59
- Tabela 5:** Dados clínicos e laboratoriais dos pacientes após a introdução da TARV+RAL de acordo com a susceptibilidade ao RAL 60
- Tabela 6:** Dados clínicos e laboratoriais dos pacientes em falha virológica a TARV+RAL entre os anos de 2009 á 2015. 64
- Tabela 7:** Perfil de mutações associadas a resistência e tratamento dos 16 pacientes em seguimento pós genotipagem para integrase 66
- Tabela 8:** Dados clínicos e laboratoriais dos pacientes expostos a TARV+RAL categorizados de acordo com o sucesso virológico. 73
- Tabela 9:** Dados clínicos e laboratoriais dos pacientes resistentes e susceptíveis ao dolutegravir (DTG). 75

# ÍNDICE

<b>1. Introdução</b>	16
1.1 Vírus da Imunodeficiência Humana – HIV	18
1.2 Terapia Antirretroviral	23
1.3 Integrase	28
1.4 Inibidores da Integrase	31
1.4.1 Raltegravir	31
1.4.2 Elvitegravir	32
1.4.3 Dolutegravir	34
1.5 Inibidores da integrase em desenvolvimento	37
1.5.1 Bloqueadores de interação da integrase com a LEDGF/p75	37
1.5.2 GSK1265744 ou cabotegravir	38
1.6 Mutações associadas a resistência aos INIs	39
<b>2. Objetivo</b>	43
2.1 Objetivo geral	43
2.2 Objetivo específico	43
<b>3. Pacientes e Métodos</b>	44
3.1 População do estudo	44
3.1.1 Pacientes naïve de TARV+RAL	44
3.1.2 Pacientes expostos à TARV+RAL	44
3.2 Comitê de Ética	45
3.3 Técnicas laboratoriais	45
3.3.1 Coleta e processamento das amostras	45

3.3.2	Quantificação da carga viral e células TCD4 <sup>+</sup>	46
3.3.3	Extração do RNA e DNA viral	46
3.3.4	Retrotranscrição e amplificação do gene da integrase	47
3.3.5	Retrotranscrição e amplificação dos genes da protease e transcriptase reversa	49
3.3.6	Reação de sequenciamento dos genes dos genes da integrase, protease e transcriptase reversa	51
<b>4.</b>	<b>Análise molecular</b>	<b>52</b>
4.1	Suscetibilidade aos antirretrovirais	52
4.2	Medicamentos ativos da TARV+RAL	52
4.3	Mutações associadas a resistência aos INIs e polimorfismos naturais da integrase	52
4.4	Subtipos	53
4.5	Fatores associados com sucesso terapêutico a TARV+RAL	53
<b>5.</b>	<b>Análise estatística</b>	<b>54</b>
<b>6.</b>	<b>Resultados</b>	<b>55</b>
6.1	População do estudo	55
6.2	Resistência transmitida e polimorfismos naturais no gene da integrase	55
6.3	Evolução do perfil clínico, laboratorial e aspectos moleculares do HIV em pacientes em uso de TARV+RAL	57
6.3.1	Pacientes com sucesso virológico	57
6.3.2	Pacientes com falha virológica a TARV+RAL	58
6.3.3	Pacientes em falha virológica a TARV+RAL nos últimos 6 anos	62

6.3.4	Seguimento pós genotipagem da integrase de pacientes com falha terapêutica a TARV+RAL	65
6.3.5	Padrões atípicos de mutações associadas a resistência aos INIs	67
<b>6.4</b>	<b>Fatores associados com sucesso terapêutico a TARV+RAL</b>	<b>71</b>
<b>6.5</b>	<b>Impacto do uso prévio da TARV+RAL na atividade do dolutegravir</b>	<b>74</b>
<b>7.</b>	<b>Discussão</b>	<b>76</b>
<b>8.</b>	<b>Conclusões</b>	<b>87</b>
<b>9.</b>	<b>Referências bibliográficas</b>	<b>88</b>
<b>10.</b>	<b>Anexos</b>	<b>108</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV do inglês *Human Immunodeficiency Virus*), desde a confirmação dos primeiros casos de aids em 1981, se expandiu de maneira importante, sendo responsável pela pandemia observada atualmente.

A infecção pelo HIV pode ocorrer por transmissão sexual, via parental (transfusão sanguínea e usuário de drogas injetáveis) e transmissão vertical.

O curso da infecção pode ser dividido em três fases: fase aguda, fase assintomática ou latência clínica e fase sintomática, onde há o desenvolvimento da aids. A evolução da doença é marcada pela diminuição de células TCD4<sup>+</sup> e o aumento da carga viral plasmática.

Com a introdução da terapia antirretroviral altamente ativa (HAART do inglês *Highly Active Anti-Retroviral Therapy*) em 1996, caracterizada pela combinação de antirretrovirais, e uma melhor estruturação dos serviços de saúde, houve uma queda acentuada na taxa de morbidade e um aumento na sobrevivência de indivíduos infectados.

Infelizmente o sucesso da terapia antirretroviral (TARV) não é alcançado por todos os pacientes devido, entre outros fatores, à baixa aderência e efeitos colaterais. Além disso, a combinação de múltiplos antirretrovirais, a necessidade de uso contínuo e a alta diversidade do HIV pode levar a uma seleção de cepas virais resistentes, o que diminui ou anula a ação desses medicamentos. Entretanto, para o sucesso da terapia de resgate, o ideal é a combinação de dois ou três antirretrovirais ativos. Assim, a busca de fármacos com uma maior barreira genética para alvos já conhecidos, como também a de novos alvos terapêuticos é de extrema importância para o resgate de pacientes resistentes a múltiplos antirretrovirais.

Neste contexto, um alvo que tem se mostrado bastante promissor é a integrase. A integrase participa de uma etapa fundamental na replicação viral do HIV, inserindo o DNA viral (cDNA) na célula hospedeira.

Medicamentos que atuam na integrase têm sido extensivamente estudados nos últimos anos, e na última década vêm demonstrando resultados importantes. Atualmente, três inibidores de integrase foram aprovados para o uso em pacientes naïve e experimentados a múltiplos antirretrovirais: raltegravir, elvitegravir (uma combinação em dose única) e dolutegravir. Estudos sobre o perfil de mutações associados aos inibidores de integrase podem ser de grande utilidade para subsidiar a conduta clínica nos casos de falha terapêutica.

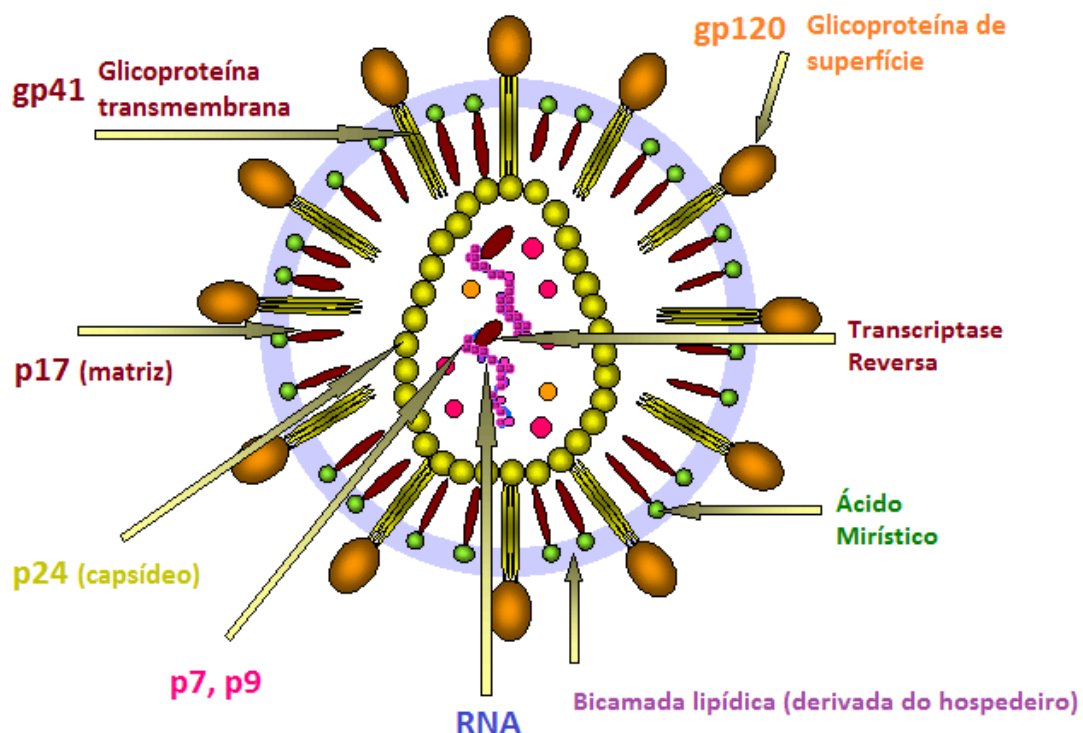
## 1.1 Vírus da Imunodeficiência Humana - HIV

O HIV é classificado como um vírus pertencente à família *Retroviridae* e à subfamília *Lentiviridae*. Retrovírus são vírus com envoltório constituído por uma bicamada fosfolipídica que circunda um capsídeo viral que contém em seu interior duas fitas simples de RNA (Ácido Ribonucléico) de orientação positiva, e que necessitam da enzima DNA-polimerase RNA-dependente (ou transcriptase reversa) para sua replicação. Os lentivírus produzem infecções lentas, progressivas e fatais, causando distúrbios neurológicos e imunossupressão (Levinson & Jawetz, 2005).

Este vírus apresenta forma esférica, com diâmetro aproximado de 110 nanômetros. Em sua superfície, encontra-se o envoltório viral constituído por uma membrana fosfolipídica dupla, derivada da membrana celular do hospedeiro, e por 72 espículas. Cada espícula é formada por duas glicoproteínas conhecidas como glicoproteína de superfície (SU ou gp120) e glicoproteína transmembrana (TM ou gp 41) (McCune et al., 1988), produtos da clivagem de uma glicoproteína precursora de 160kDa (kilodaltons). (Figura 1)

A matriz proteica (p17) está localizada logo abaixo do envoltório viral, protegendo o capsídeo viral, e é considerada vital para a integridade do vírus. A proteína p24 forma o nucleocapsídeo viral, que está organizado de forma cônica e contém em seu interior duas cópias idênticas de RNA genômico (ácido ribonucleico) de fita simples e as enzimas que irão atuar na replicação viral denominadas transcriptase reversa (RT), RNase-H, protease e integrase (Gelderblom et al., 1989).



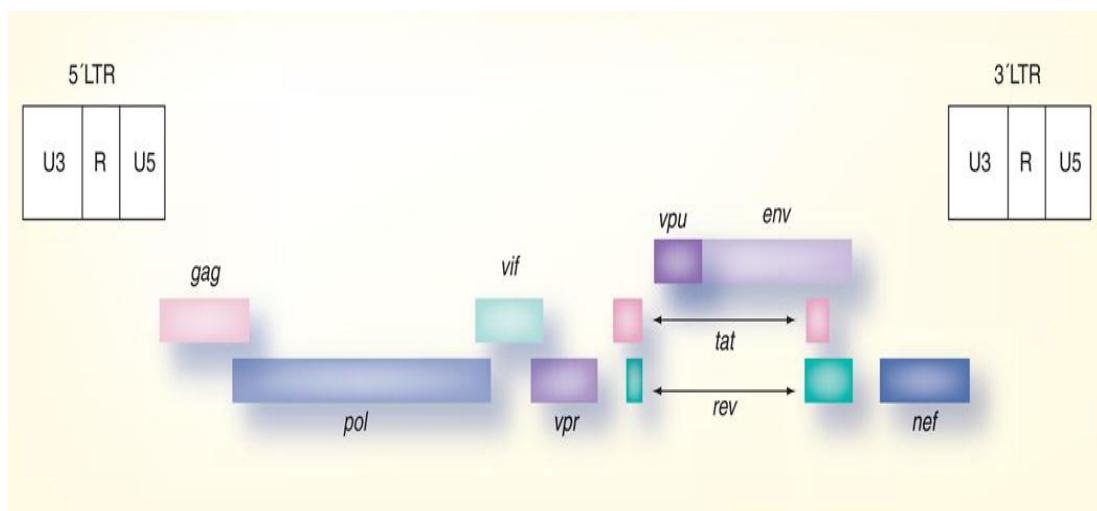


**Figura 1:** Estrutura esquemática do HIV em corte transversal. O HIV é esférico medindo cerca de 110nm, circundado por uma bicamada lipídica. As espículas do envoltório são as glicoproteínas de superfície (SU) e transmembrana (TM). A matriz proteica (p 17) está localizada abaixo do envoltório viral, protegendo o capsídeo viral (CA). O nucleocapsídeo viral está organizado de forma cônica e contém duas cópias de RNA de fita simples, além das enzimas que vão atuar na replicação viral. **Fonte:** Adaptado de: Microbiology and Immunology on line – University of South Carolina – School of Medicine. Virology – Chapter 7 – Part 9 – Human Immunodeficiency Vírus and AIDS.

O genoma do HIV compartilha uma estrutura básica encontrada em todos os Retrovírus conhecidos; mede cerca de 9,8Kb (kilobases) e contém nove genes que ficam entre duas sequências denominadas *Long Terminal Repeat (LTR)* que regulam a integração do HIV-1 com o hospedeiro, a transcrição e a poliadenilação da extremidade 3' dos RNA mensageiros (RNAm), atuando como iniciadoras da replicação viral (Levinson & Jawetz, 2005). (Figura 2)

Os genes podem ser classificados em estruturais, regulatórios e acessórios. O *gag*, o *pol* e o *env* são genes estruturais que codificam proteínas da estrutura viral e as enzimas ligadas à replicação viral. O gene *Gag* codifica proteínas para formar a matriz proteica (MA ou p17), o

capsídeo viral (CA ou p24) e proteínas nucleares (NC ou p7 e p9). O gene *pol* codifica as enzimas virais que atuam diretamente na replicação viral denominadas protease, transcriptase reversa, RNase-H e integrase. Finalmente, o *env* é responsável pela codificação das glicoproteínas de superfície (SU ou gp120) e a transmembrana (TM ou gp 41) (Muesing et al., 1985; Di Marzo et al., 1985), envolvidas no reconhecimento da célula alvo. Entre os genes regulatórios estão o *tat* e o *rev* que regulam a expressão dos genes estruturais, interferindo diretamente no ciclo de vida do HIV-1. Os genes *nef*, *vif*, *vpr* e *vpu* (HIV-1) / *vpx* (HIV-2) são acessórios e participam da montagem e liberação do vírus do interior da célula do hospedeiro e interferem diretamente no grau de infectividade do vírus durante a sua replicação (Ou et al., 1995; Peterlin et al., 1995).



**Figura 2:** Organização genômica do HIV-1, com os seus três quadros de leitura. O genoma do HIV tem cerca de 9,8KB contendo nove genes que estão entre duas sequências *Long Terminal Repeat (LTR)* (McBurney & Ross, 2008).

No homem foram isolados dois tipos do HIV, o HIV-1 e o HIV-2 (Clavel et al., 1986). O HIV-2 tem, basicamente, a mesma organização genômica do HIV-1, porém no genoma do HIV-2, encontramos o *vpx* que substitui o *vpu*, do HIV-1 e que produz a proteína p15 que auxilia na infecção de novas células (Levinson & Jawetz, 2005).

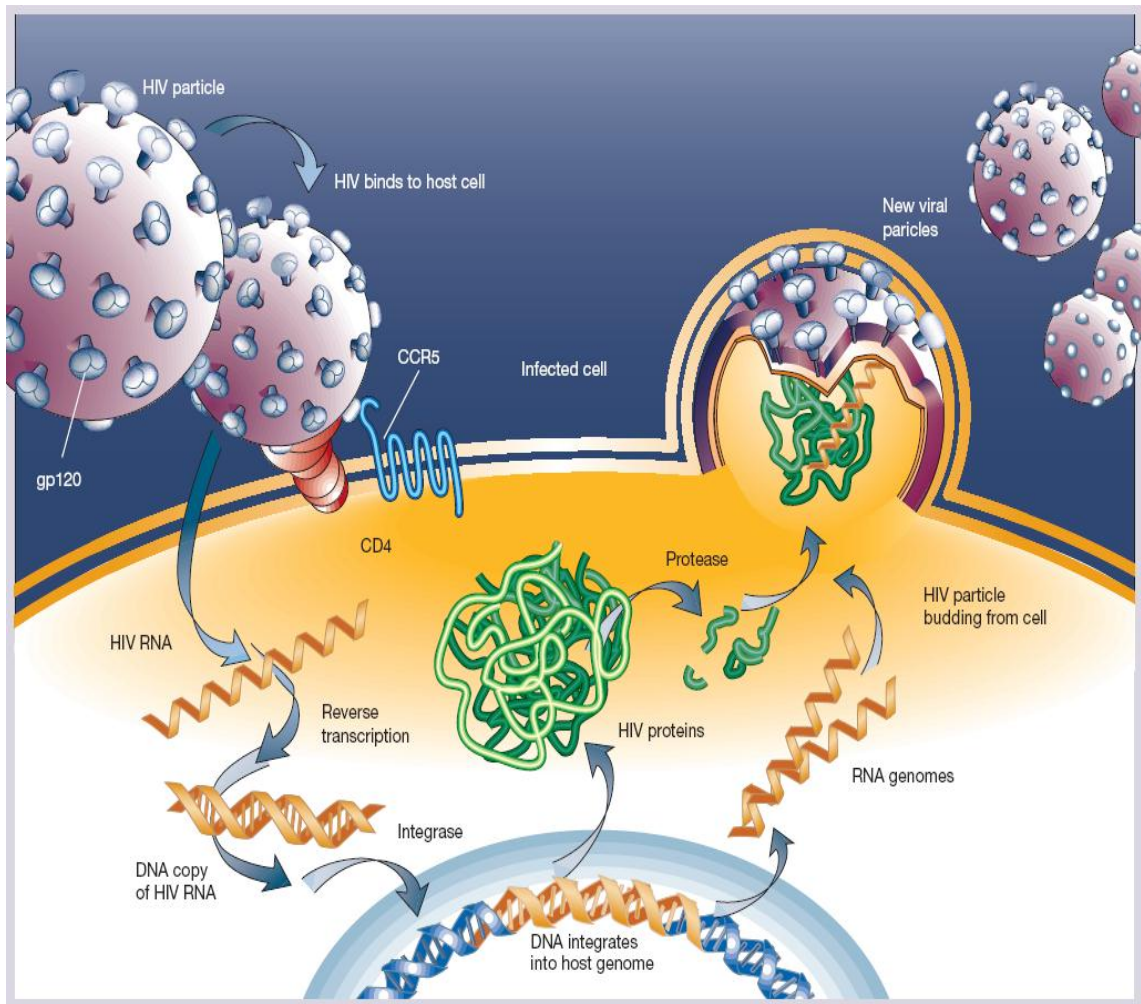
O HIV-1 apresenta maior variabilidade genética, estando disseminado por todo o mundo, sendo considerado mais virulento do que o HIV-2. O HIV-1 está distribuído em três grupos distintos “M” (Major), “N” (New ou Non M - Non O) e “O” (Outlier) e mais recentemente o “P” (Plantier et. al., 2009). O “M” é o grupo principal, responsável pela epidemia da aids, e está dividido em subtipos (variando de A - K) e formas recombinantes circulantes (Myers et al., 1992; Janssens et al., 1994; Louwagie et al., 1995; Triques et al., 1999).

Durante a infecção, o HIV tem como alvo principal os linfócitos T auxiliares, positivos para os receptores de membrana conhecidos como TCD4<sup>+</sup>, causando a destruição desses linfócitos e resultando em perda da imunidade mediada por células, além de favorecer o desenvolvimento de infecções oportunistas (Levinson & Jawetz, 2005).

O ciclo replicativo do HIV se inicia com a ligação da partícula viral através da gp120 a receptores TCD4<sup>+</sup> específicos, encontrados na superfície da célula alvo (Klatzmann et al., 1984; McDougal et al., 1985). A gp 120 interage com uma outra proteína receptora de  $\beta$ -quimiocina CCR5 ou com o receptor de  $\alpha$ -quimiocina CXCR4 da superfície celular para promover a entrada do vírus na célula hospedeira (Stein et al., 1987). A gp 41 promove a fusão do envoltório viral à membrana da célula hospedeira. Os vírus que possuem tropismo por receptores CCR5 são denominados vírus R5 e não são indutores de sincícios, já aqueles que têm tropismos por receptores CXCR4 são chamados vírus X4 e estes são geralmente indutores de sincícios (Poveda et al., 2006). O sincício é um aglomerado de células que se fundem umas às outras, compartilhando o mesmo citoplasma.

O material genético do vírus é introduzido no citoplasma da célula, iniciando o processo de transcrição reversa mediado pela enzima transcriptase reversa (RT) que a partir da fita molde de RNA viral, transcreve o DNA complementar (cDNA) para posterior formação de uma fita dupla de DNA. Após a transcrição, a fita molde de RNA é degradada pela RNase-H (Varmus & Swanstrom, 1985; Panganiban & Fiore, 1988). A integrase é

responsável pela integração do cDNA ao genoma da célula hospedeira. Esta integração é essencial para que o vírus continue seu processo replicativo. As proteínas virais e o RNA genômico são produzidos a partir deste DNA integrado ao genoma da célula hospedeira, entre essas são formadas poliproteínas que sofrem a ação da protease. A clivagem resultante da ação da protease ocorre quando o vírion imaturo brota da membrana celular e é envolvido pela bicamada fosfolipídica. Esse processo resulta em um vírion maduro e infeccioso (Figura 3).



**Figura 3:** Etapas da replicação do HIV mostrando as enzimas envolvidas durante este processo (Weiss, 2001).

## 1.2 Terapia Antirretroviral

O primeiro antirretroviral aprovado para o tratamento de pacientes infectados pelo HIV foi a Zidovudina (AZT) no final da década de 80. O AZT já havia sido sintetizado para ser usado contra o câncer. A princípio, o AZT era administrado em monoterapia em doses elevadas (1500mg/dia), o que frequentemente acarretava efeitos colaterais, porém o uso desta droga diminuía a mortalidade e a frequência de infecções oportunistas em indivíduos com HIV (Fischl et al., 1987).

O Brasil se tornou, desde 1996 quando foi publicada a Lei 9.313, o primeiro país em desenvolvimento a oferecer gratuitamente a terapia antirretroviral. O Ministério da Saúde trabalha para garantir o acesso ao tratamento antirretroviral a todas as pessoas infectadas com o HIV e que tenham indicações de recebê-lo, conforme as recomendações vigentes no país (Ministério da Saúde, 2008). Com esta iniciativa, o país tem diminuído significativamente a ocorrência de infecções oportunistas e óbitos decorrentes da aids.

O momento certo para se iniciar a terapia antirretroviral ainda é alvo de inúmeras discussões. A contagem de células TCD4<sup>+</sup> tem sido um importante parâmetro laboratorial em pacientes assintomáticos, pois é um marcador do risco de progressão para aids e morte (Santos et al., 2008). De acordo com a recomendação publicada pela Organização Mundial de Saúde (World Health Organization – WHO) a indicação é se iniciar a terapia antirretroviral quando o indivíduo assintomático apresentar contagem de células TCD4<sup>+</sup> ≤ 350 células/mm<sup>3</sup> (WHO, 2010). Recomendação publicada pela Internacional Aids Society (IAS-USA) indica o início da terapia antirretroviral para pacientes assintomáticos que apresentam contagem de TCD4<sup>+</sup> ≤ 500 células/mm<sup>3</sup> (Thompson et al., 2012).

No Brasil o início do tratamento antirretroviral é recomendado em indivíduos sintomáticos independente da contagem de células TCD4<sup>+</sup>. Para os indivíduos assintomáticos com contagem de células TCD4<sup>+</sup> menor ou

igual a 500 células/mm<sup>3</sup>, e acima desse nível para casos especiais, como gestantes e coinfectados com o vírus da hepatite C ou B. ([www.aids.gov.br](http://www.aids.gov.br)).

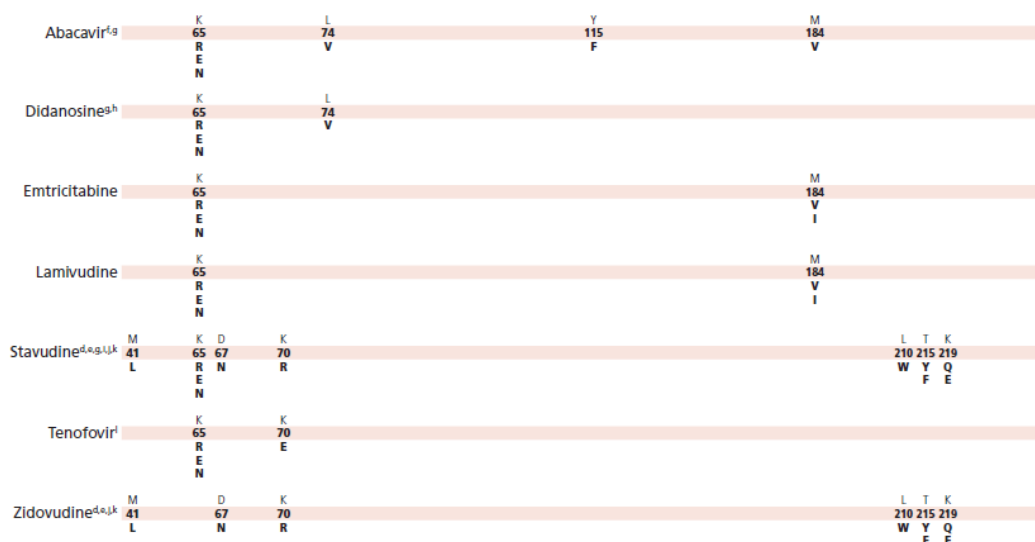
Atualmente, vários compostos estão disponíveis para o tratamento de indivíduos infectados pelo HIV, distribuídos em classes que interferem em diferentes fases do ciclo do vírus. As classes de antirretrovirais estão divididas em inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídicos e nucleotídeos, inibidores da transcriptase reversa não análogos de nucleosídicos, inibidores da protease, inibidores de fusão, antagonistas de CCR5 e inibidores da integrase.

- **Inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídicos ou nucleotídeos – ITRN (*Nucleosidic Reverse Transcriptase Inhibitors – NRTI*)**

Atuam no sítio de ligação da enzima ao substrato como moléculas análogas aos nucleosídeos naturais, agindo por competição impedindo a continuidade da transcrição. A “Food and Drug Administration” (FDA) tem aprovado até o momento sete análogos de nucleosídeo: zidovudina, didanosina, zalcitabina, estavudina, lamivudina, abacavir e emtricitabina; e um análogo de nucleotídeo o tenofovir. A zalcitabina foi retirada do mercado em junho de 2006.

Existem dois mecanismos de resistência aos ITRN: (i) interferência na incorporação do medicamento; (ii) remoção do análogo da cadeia de DNA terminada (Clavel & Hance, 2004).

Na figura 4 é interessante notar como o perfil de resistência é similar entre os compostos desta classe.

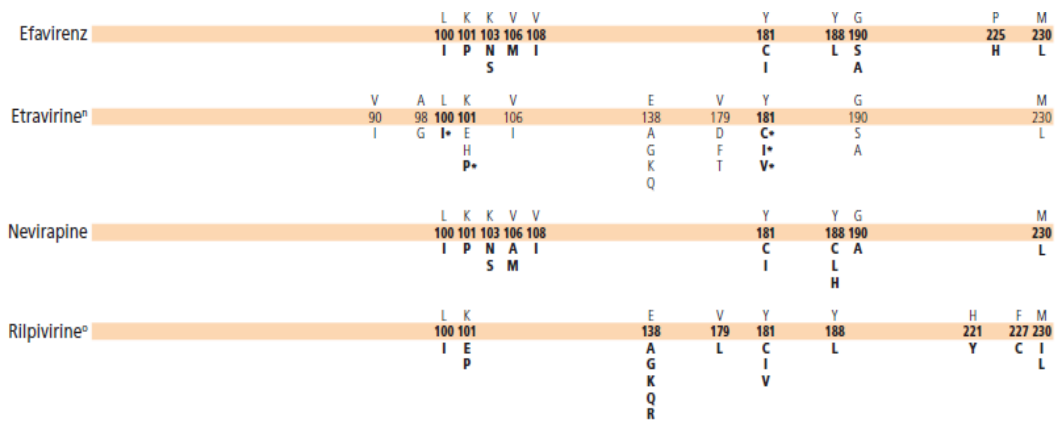


**Figura 4:** Mutações associadas a resistência aos inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeos e nucleoditeos (Wensing et al., 2014).

- **Inibidores da transcriptase reversa não análogos de nucleosídeos – ITRNN (*Non-Nucleosidic Reverse Transcriptase Inhibitors* – NRTI)**

Os ITRNN agem diretamente na enzima transcriptase reversa, bloqueando o bolsão hidrofóbico dentro do sítio ativo da p66. Até poucos anos atrás, os únicos medicamentos licenciados para o uso eram a nevirapina, efavirenz, delavirdina. Estes medicamentos apresentam praticamente o mesmo modo de ligação na transcriptase reversa, e apenas uma mutação no códon da desta enzima, como por exemplo, a K103N, confere perda importante de susceptibilidade e uma resistência cruzada a esses fármacos (Bachelier, 2000; Delaugerre, 2001). Recentemente a FDA aprovou drogas de segunda geração, etravirina e rilpivirina, ambas diarilpirimidinas (Dapy) com barreira genética mais elevada e ativa contra cepas resistentes aos ITRN de primeira linha (Adries et al., 2004; Vingerhoets et al., 2005; Azijn et al., 2010). Uma dose injetável de rilpivirina que permita aplicações em maiores espaços de tempo também está em estudos (Margolis et. al., 2015). No Brasil, a rilpivirina ainda não está disponível para o uso clínico e a etravirina somente é usada em terapias de

resgate de pacientes multi-experimentados. Embora, ambas etravirina e rilpivirina possuam alguns códons de resistências cruzada (figura 5) o padrão de resistência compartilhado por drogas de primeira linha desta classe é grande.



**Figura 5:** Mutações associadas a resistência aos inibidores da transcriptase Reversa não análogos de nucleosídeos (Wensing et al., 2014).

- **Inibidores de protease – IP (*Protease Inhibitors- PI*)**

Os IP interferem no último estágio do ciclo de replicação viral, mimetizando a estrutura dos substratos naturais da protease, inibindo assim atividade catalítica da enzima (Clavel & Hance, 2004). Os IPs possuem uma barreira genética maior quando comparados aos ITRNs e ITRNNs, pois em geral necessitam de um acúmulo de mutações para a perda da susceptibilidade. Mutações associadas à resistência aos IPs são divididas em: (i) primárias ou principais, agem no sítio ativo da enzima protease e conferem mudanças fenotípicas, o que prejudica a ação dos IPs reduzindo sua capacidade de se ligar a enzima; (ii) secundárias ou menores, estão localizadas fora do sitio ativo da protease e emergem após as primárias, não apresentam um efeito sobre a conformação da enzima, mas em conjunto com as mutações primárias melhora a capacidade de replicação do vírus ou *fitness viral* (Figura 6). Antirretrovirais de segunda geração desta classe foram desenvolvidos e podem beneficiar pacientes que apresentam falha



terapêutica aos IPs de primeira linha. Tipranavir e darunavir foram aprovados pela FDA e estudos mostram que esses medicamentos têm grande capacidade ativa contra cepas resistentes aos IPs de primeira linha (Cahn et al., 2006; Tremplay, 2008; Llibre et al., 2008). No Brasil, assim como a etravirina, o tipranavir e o darunavir são utilizados somente em esquemas de resgate terapêutico de pacientes multi-experimentados. O tipranavir também pode ser usado por crianças a partir de dois anos de idade.

Atazanavir +/- ritonavir*	L 10	G 16	K 20	L 24	V 32	L 33	E 34	M 36	M 46	G 48	I 50	F 53	I 54	D 60	I 62	I 64	A 71	G 73	V 82	I 84	I 85	N 88	L 90	I 92
	I F V C	E R M I T V	I I F V	Q I L	I F V				L I	V V	L L Y	V V M T A		E V		L M V	V C I S T L A		T T F I	A V V S			M L M	
Darunavir/ ritonavir*	V 11				V 32	L 33			I 47	I 50	I 54						T 74	L 76		I 84			L 89	
	I I				I F			V V	V M L								P V		V V				V V	
Fosamprenavir/ ritonavir*	L 10				V 32				M 46	I 47	I 50	I 54					G 73	L 76	V 82	I 84			L 90	
	I F I R V				I			L I	V V	V L M							S S	V V	A F S T	V V			M	
Indinavir/ ritonavir**	L 10	K 20	L 24	V 32			M 36		M 46		I 54						A 71	G 73	L 76	V 77	V 82	I 84		L 90
	I R V	M I R	I	I			I		I I		V V						V S T A	V S V I	V I	A F T	V V		M	
Lopinavir/ ritonavir*	L 10	K 20	L 24	V 32	L 33				M 46	I 47	I 50	F 53	I 54				L 63	A 71	G 73	V 76	L 77	V 82	I 84	L 90
	I F I R V	M I R	I	I	F				L I	V A	V L	V L A M T S					P	V S T	V S V	V V	A F T S	V V		M
Nelfinavir <sup>LSW</sup>	L 10			D 30			M 36		M 46								A 71		V 77	V 82	I 84	N 88	L 90	
	I F I			N			I		I I								V T		I I	V I	A V	D S	M	
Saquinavir/ ritonavir**	L 10		L 24						G 48		I 54			I 62			A 71	G 73	V 77	V 82	I 84		L 90	
	I R V		I						V V		V L			V V			V S T	V S V	I I	A F T S	V V		M	
Tipranavir/ ritonavir*	L 10				L 33		M 36		K 43	M 46	I 47		I 54	Q 58			H 69		T 74		V 82	N 83	I 84	L 89
	I R V				F		I L V		T T	L V			A M V	E		K R		P		L T	D V		I M V	

**Figura 6:** Mutações associadas a resistência aos inibidores de protease. Mutações primárias estão destacadas em negrito (Wensing et al., 2014).

- **Inibidores de fusão**

Os inibidores de fusão agem na gp41 impedindo a fusão da membrana viral com a célula (Melby et al., 2006). O enfuvirtide (T-20) é o único medicamento desta classe licenciado para uso clínico. É um peptídeo sintético de 36 aminoácidos lineares. Por se tratar de uma molécula bastante

grande sua administração é por via subcutânea, o que dificulta a adesão. Mutações associadas à resistência ao T-20 encontram-se nos códons 36, 37, 38, 39, 40, 42 e 43 do gene do envoltório da gp41, uma única mutação confere redução de susceptibilidade (Wensing et al., 2014).

- **Antagonistas de CCR5**

Os antagonistas de CCR5 impedem a ligação do vírus a correceptores estruturais da célula hospedeira, conhecidos como CCR5. O Maraviroc é o único antagonista de CCR5 licenciado para uso, outro medicamento desta classe, o vicriviroc, foi descontinuado em fase tardia de estudos. O Maraviroc só é efetivo em vírus R5, portanto é necessário antes da introdução do esquema terapêutico contendo este medicamento, um teste de tropismo fenotípico ou genotípico que determine a presença de variantes CCR5 (McArthur & Novak 2008).

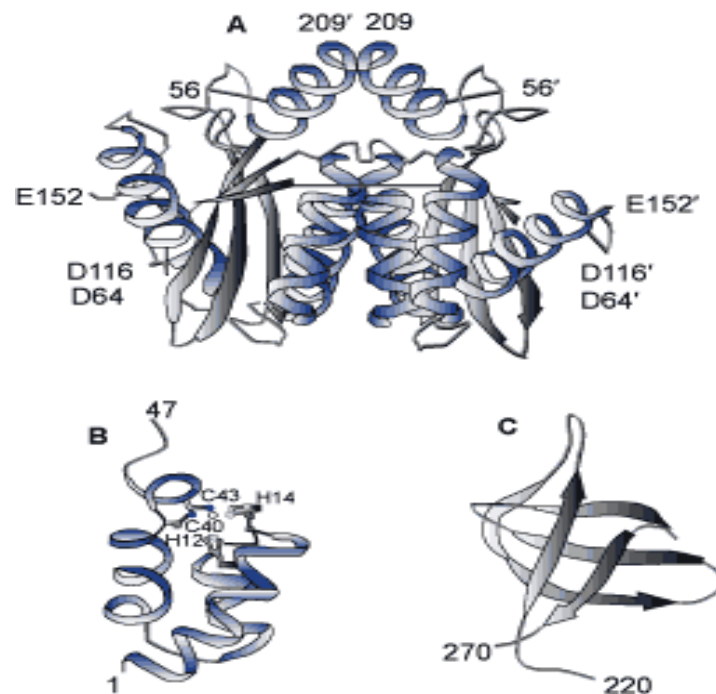
### **1.3 Integrase**

Um alvo que tem se mostrado bastante promissor é a enzima integrase (IN). Esta enzima tem um papel crucial durante a infecção do HIV, pois ela atua inserindo cDNA viral na célula hospedeira. Medicamentos que atuam na integrase têm sido extensivamente estudados e na última década vem demonstrando resultados importantes (Pommier et al., 2005; Dayam et al., 2007). Os inibidores de integrase (INIs) impossibilitam a inserção do cDNA viral no genoma humano e são designados como inibidores de transferência de fita (integrase strand transfer inhibitors - InSTIs) (Espeseth et al., 2000).

A integrase é uma enzima de 32kDa com 288 aminoácidos constituída por três domínios, sendo dois com regiões altamente conservadas (Engelman et al., 1993) (Figura 7). Cada domínio tem um papel crucial na integração do genoma viral ao genoma da célula hospedeira (Chiu et al., 2004). O domínio N-Terminal (1-49) possui regiões que são altamente

conservadas (H<sub>12</sub>, H<sub>16</sub>, C<sub>40</sub> e C<sub>43</sub>) que se ligam ao Zn<sup>2+</sup>, promovendo a multimerização da enzima (Zheng et al., 1996). O domínio catalítico (50-212) também possui regiões altamente conservadas (D<sub>64</sub>, D<sub>116</sub>, E<sub>152</sub>), que são o sítio ativo da enzima (Engelman et al., 1992; Chiu et al., 2004). O último domínio é o C-Terminal (213-288), o qual tem o papel de orientar a ligação do DNA viral durante o processo de integração (Chiu et al., 2004).

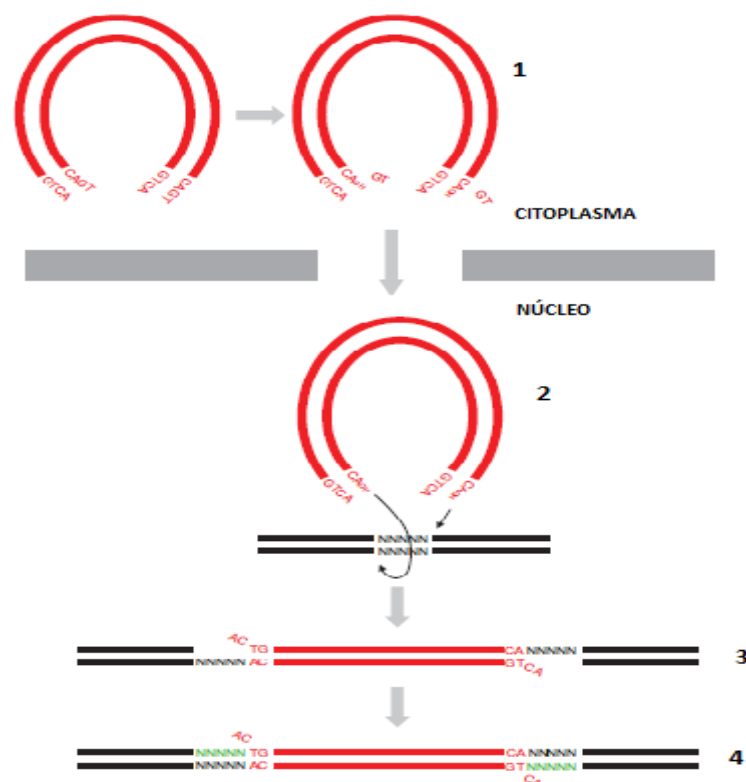
O domínio catalítico ainda contém resíduos importantes para a pré-integração do vírus na célula hospedeira. Estes resíduos, constituídos pelos aminoácidos H<sub>12</sub>, L<sub>102</sub>, A<sub>128</sub>, A<sub>129</sub>, C<sub>130</sub>, W<sub>131</sub>, W<sub>132</sub>, I<sub>161</sub>, R<sub>166</sub>, Q<sub>168</sub>, E<sub>170</sub>, H<sub>171</sub>, T<sub>174</sub>, M<sub>178</sub>, Q<sub>214</sub>L, e o dímero K<sub>186</sub>R<sub>187</sub>K<sub>188</sub> que interagem com o LEDGF/p75 (Lens epithelium-derived growth factor), favorecem a integração do HIV na célula (Busschots et al., 2007).



**Figura 7:** Representação dos três domínios da integrase: domínio catalítico (A) demonstrando as posições de aminoácidos associados à resistência; domínio N-terminal (B) e domínio C-terminal (Markowitz et al., 2008).

O processo de integração (Figura 8) é irreversível e se inicia ainda no citoplasma, com a formação de um complexo estável do DNA viral dupla

hélice com regiões *Long Terminal Repeat (LTR)*, sintetizado anteriormente pela RT. O passo seguinte será a remoção de dois nucleotídeos (GT) de ambas as regiões 3', processo este chamado de reação de processamento 3', que expõe o grupo hidroxil 3' terminal dinucleotídeo do CA. Este complexo processado será transferido para dentro do núcleo hospedeiro através do poro nuclear e integrado ao DNA celular. A etapa de reparos das fitas é provavelmente catalisada por enzimas da própria célula hospedeira (Temesgen & Siraj, 2008).



**Figura 8:** Etapas do processo de integração: Etapa 1: formação de um complexo estável do DNA viral dupla hélice com regiões *Long Terminal Repeat* (vermelho) sintetizado anteriormente pela RT; remoção de dois nucleotídeos (GT) de ambas as regiões 3', processo este chamado de reação de processamento 3', que expõe o grupo hidroxil 3' terminal dinucleotídeo CA; Etapa 2: DNA viral exportado para o núcleo; Etapa 3: integração do DNA viral ao genoma da célula hospedeira (preto) e Etapa 4: reparos das fitas (verde) são provavelmente catalisados por enzimas da própria célula hospedeira (Adaptado de Mbisa et al., 2011).

## **1.4 Inibidores de integrase (INI)**

Não há homólogos da enzima integrase em humanos. Por isso, esta enzima tem se tornado um importante alvo terapêutico. Teoricamente, todas as etapas de integração do vírus na célula hospedeira podem ser alvos promissores (Ceccherini-Silberstein et al., 2009).

Atualmente três medicamentos já foram licenciados para uso tanto em pacientes naïve quanto para multi-experimentados. Vários outros fármacos estão em fase de estudo (Marchand et al., 2009; Métifiot et al., 2011; Le Rouzic et. al., 2013; Margolis et. al., 2015; Bernarous et. al., 2015; Yoshinaga et. al., 2015). Todos estes compostos são análogos de ácido diceto (DKA) e interferem no processo de transferência da fita de DNA viral dentro do núcleo da célula hospedeira. Estas drogas bloqueiam tanto o processamento 3' no citoplasma, quanto a transferência da fita de DNA viral dentro do núcleo celular, e são denominadas inibidores de transferência de fita ou do inglês strand transfer inhibitors (INSTI) (Espeseth et al., 2000).

### **1.4.1 Raltegravir**

Raltegravir, inicialmente conhecido por MK-0518 (RAL, Isentress®, Merck Laboratories) foi o primeiro INIs licenciado para uso em terapia pela FDA. Raltegravir bloqueia a ação da integrase durante a transferência da fita de DNA viral ao genoma hospedeiro (Espeseth et al., 2000).

Raltegravir foi licenciado baseado nos resultados de dois estudos conhecidos por BENCHMRK I e BENCHMRK II (Blocking Integrase in Treatment Experienced Patients with a Novel Compound against HIV, Merck I and II). Nestes ensaios, constatou-se que nos pacientes que tomaram doses de 400 mg de raltegravir duas vezes ao dia em combinação com uma terapia otimizada, quando comparados com pacientes que tomaram placebo, tiveram uma redução significativa na carga viral além de um aumento importante da contagem de células TCD4<sup>+</sup> (Steigbigel et al., 2008).

Raltegravir demonstrou ser rapidamente absorvido e bem tolerado pelos pacientes, possuindo poucos efeitos colaterais. Em geral, os efeitos colaterais são náuseas, diarreia, dores de cabeça e febre (Steigbigel et al., 2008).

Comercializado com o nome de Isentress® encontra-se sob a forma de comprimidos de 400 mg. A administração é feita por via oral duas vezes ao dia, tomado com ou sem alimentos em combinação com outros antirretrovirais (Steigbigel et al., 2008).

Em dezembro de 2011, a FDA baseada no estudo IMPAACT P1066 também aprovou o Isentress® para crianças e adolescentes de 2 a 18 anos, (Nachman et al, 2010) sendo a forma mastigável do comprimido somente para crianças de 2 a 11 anos (Nachman et al, 2011). IMPAACT P1066 foi um estudo multicêntrico aberto de fase I/II que avaliou o perfil farmacocinético, a segurança, a tolerabilidade e a eficácia de raltegravir em um grupo de crianças HIV multi-experimentadas com idade entre 2 e 18 anos. No estudo foi possível verificar que 54% das crianças apresentaram carga viral plasmática <50 cópias/mL na semana 24 e os níveis de células TCD4<sup>+</sup> tiveram um aumento de 3,8% (Nachman et al, 2009).

No Brasil, o raltegravir foi incluído na terapia antirretroviral no final de 2008, para o resgate de pacientes adultos multi-falhados (Ministério da Saúde, 2008).

#### **1.4.2 Elvitegravir**

Elvitegravir, também conhecido como GS-9137 (Gilead Sciences, Inc.), assim como raltegravir, se liga a cátions de magnésio e inibe a reação de transferência das fitas de DNA viral ao genoma hospedeiro (Bhattacharya et al., 2009).

Estudos mostram que elvitegravir necessita de reforço farmacológico de um inibidor de citocromo P450, demonstrando atividade superior quando administrado com *booster* de Ritonavir (Zolopa et al., 2010). A Gilead

Sciences desenvolveu o Cobicistat (GS-9350), que se mostrou semelhante ao ritonavir para esse fim (Elion et al, 2011).

Na fase II de estudos clínicos elvitegravir 125 mg (potencializado com ritonavir) com um regime terapêutico otimizado, mostrou um declínio na carga viral na semana 24. (Shimura et al., 2008).

Na fase III de estudo clínico, elvitegravir mostrou sua não inferioridade comparado a raltegravir. No estudo randomizado, duplo cego, foram incluídos pacientes de 15 países. Os pacientes foram estratificados em grupos que receberam elvitegravir 150 mg uma vez ao dia (n=361) ou raltegravir 400 mg duas vezes ao dia (n=363), ambos com inibidor de protease potencializado com ritonavir. Elvitegravir foi semelhante ao raltegravir em tolerância e eficácia, porém sugere ter melhor adesão por ser administrado uma vez ao dia (Molina et al., 2012)

A Gilead Sciences, desenvolveu uma combinação em um único comprimido com EVG+COBI+FTC+TDF, também denominada QUAD pill ou Stribild®, que é administrada uma vez ao dia, sendo sua utilização com outros antirretrovirais não recomendada. Este medicamento foi licenciado pela FDA em agosto de 2012.

Em um estudo de fase III onde se avaliou a segurança e a eficácia de EVG+COBI+FTC+TDF versus EFV+FTC+TDF, foram selecionados 707 pacientes naïve de terapia antirretroviral separados randomicamente em grupos que receberem doses de EVG+COBI+FTC+TDF (150, 150, 200 e 300 mg respectivamente) ou EFV+FTC+TDF (600, 200 e 300 mg respectivamente) uma vez ao dia. Os grupos eram bastante similares em relação a dados clínicos e demográficos. As análises da semana 48 demonstraram que ambos os grupos obtiveram supressão virológica, o que mostrou a eficácia de EVG+COBI+FTC+TDF não inferior ao EFV+FTC+TDF (87,6% x 84,1%). Entretanto, análises anteriores a semana 16 mostraram que a proporção de pacientes com carga viral <50 cópias/ml era alta no grupo EVG+COBI+FTC+TDF quando comparado ao outro grupo. O número de pacientes que deixaram de usar a droga durante o estudo por efeitos colaterais foi similar entre os grupos. Seleção de cepas resistentes a algum

medicamento de ambos os compostos foi baixa (Sax et al., 2012). Outro estudo de fase III realizado por DeJesus e colaboradores (2012) demonstrou resultados semelhantes de segurança e eficácia de EVG+COBI+FTC+TDF quando comparado com Atazanavir/r+ FTC+TDF. Em ambos os estudos pôde se verificar a eficácia e segurança de EVG+COBI+FTC+TDF, que pode ser administrado uma vez ao dia em um único comprimido. Tratamentos com esse tipo de estratégia são bastante favoráveis para o sucesso na adesão ao esquema terapêutico pelo paciente.

A não inferioridade de EVG+COBI+FTC+TDF também foi comprovada no estudo de fase III de Clumeck e colaboradores (2014). Neste estudo, a supressão virológica na semana 48 de seguimento dos pacientes que receberam EVG+COBI+FTC+TDF (89,5%) foi similar ao grupo que recebeu ATV+RTV+FTC/TDF (86,8%). Na semana 144, a supressão viral continuou sendo similar entre os dois grupos.

Em outro estudo, EVG+COBI+FTC+TDF foi comparado a EFV/FTC/TDF (ATRIPLA<sup>®</sup>) em pacientes em início de tratamento. A supressão viral do grupo que recebeu Stribild foi similar ao grupo EFV/FTC/TDF nas semanas 48 (87,6% versus 84,1%), 96 (84% versus 82%) e ao final da semana 144 (80,2% versus 75,3%) (Wohl *et al*, 2014).

### **1.4.3 Dolutegravir**

Dolutegravir (GSK-1349572) foi desenvolvido pelas indústrias Shionogi, GlaxoSmithKline e ViiV Healthcare. Esse medicamento foi licenciado pela FDA em 2013 para uso clínico em indivíduos naïve ou multi-experimentados, inclusive aqueles com exposição ao raltegravir e elvitegravir. É um INI de segunda geração que mostrou eficácia contra cepas resistentes ao raltegravir e elvitegravir, apresentando um perfil de resistência diferente (Eron et al., 2011). DTG é administrado uma vez ao dia, sem a necessidade de *booster* para aumentar sua farmacocinética (Kobayashi et al., 2011).



Um estudo de dez dias foi realizado com doses diferenciadas de DTG em indivíduos naïve de antirretroviral que apresentavam carga viral  $\geq 5000$  cópias/ml e  $\text{TCD4}^+ \geq 100$  células/ $\text{mm}^3$ . Os indivíduos foram randomizados para receber doses de 2mg, 10mg, 50mg de DTG ou placebo uma vez ao dia. Ao final do estudo foi possível verificar uma redução de 1,51 - 2,46  $\log_{10}$  cópias/mL na carga viral em todos os indivíduos que receberam dolutegravir, quando comparados ao grupo placebo. Destes, 70% dos pacientes que receberam a dose de 50mg obtiveram carga viral  $\leq 50$  cópias/ml. Poucos efeitos adversos foram observados durante o estudo (Lalezari et al., 2009).

A eficácia, segurança e tolerabilidade de DTG em indivíduos naïve de terapia antirretroviral foram comprovadas em três ensaios clínicos: o SPRING-2, SINGLE e o FLAMINGO.

No estudo SPRING-2, foram incluídos 822 pacientes randomicamente para receberem dolutegravir 50 mg uma vez ao dia (411 indivíduos) ou RAL 400 mg duas vezes ao dia (411 indivíduos) em combinação tenofovir/emtricitabina ou abacavir/lamivudina, os resultados foram verificados nas semanas 48 e 96. Na semana 48, 88% no grupo de DTG e 86% no grupo RAL atingiram a supressão viral (Raffi et. al., 2013a). Na semana 96 a supressão viral ocorreu em 81% no grupo que recebeu DTG em comparação com 76% dos tratados com RAL (Raffi et. al., 2013b). A resposta virológica em ambos os grupos foi comparável.

No ensaio clínico SINGLE, um total de 833 indivíduos foi distribuído randomicamente a receber uma vez ao dia 50 mg de DTG associado a abacavir/lamivudina ou um comprimido único com efavirenz/tenofovir/emtricitabina. Os pacientes que receberam DTG atingiram supressão viral antes daqueles que receberam efavirenz/tenofovir/emtricitabina (28 versus 84 dias). Na semana 48, a resposta virológica (carga viral  $< 50$  cópias/mL) do grupo que recebeu DTG foi maior quando comparados ao outro grupo. Além de comprovar a eficácia e a segurança de DTG, este estudo também mostrou que o tratamento com DTG foi estatisticamente superior ao com efavirenz/ tenofovir/emtricitabina (Walmsley et. al., 2013).

O estudo FLAMINGO também mostrou a não inferioridade de DTG 50 mg uma vez ao dia quando comparado a darunavir/ritonavir 800 mg / 100 mg uma vez ao dia (ambos associados a tenofovir/emtricitabina ou abacavir/lamivudina). Na semana 48, 90% no grupo de DTG e 83% no grupo darunavir/ritonavir alcançaram carga viral <50 cópias/ml. Neste estudo também foi comprovada a superioridade do tratamento com DTG quando comparado com darunavir/ritonavir (Clotet et. al., 2014).

Para pacientes que já haviam recebido tratamento antirretroviral, a eficácia de DTG foi comprovada em dois estudos o SAILING (pacientes expostos à terapia antirretroviral, porém sem RAL) e o VIKING (pacientes expostos à terapia antirretroviral, inclusive a RAL).

No estudo SAILING, os pacientes (todos expostos a TARV) foram randomizados a receberem DTG 50 mg uma vez ao dia ou raltegravir 400 mg duas vezes ao dia, ambos com uma terapia otimizada (incluindo um ou dois antirretrovirais completamente ativos). Para ser elegível a este estudo os indivíduos deveriam ser adultos, ter carga viral > 400 cópia/mL e resistência documentada a  $\geq 2$  classes de antirretrovirais. Na semana 48 o número de pacientes que suprimiram a carga viral foi maior entre aqueles que receberam DTG (71% versus 64%). Neste estudo, DTG mostrou ser bem tolerado e com maior sucesso virológico em comparação com RAL (Cahn et. al., 2013)

No estudo VIKING, os pacientes incluídos tinham tratamento prévio com RAL e evidência de resistência aos INIs. No estudo inicial duas coortes foram propostas: coorte I, onde os indivíduos receberam DTG 50 mg uma vez ao dia; e coorte II, os pacientes receberam a dose de DTG 50 mg duas vezes ao dia. No dia 11, foi verificada a proporção de indivíduos que tiveram declínio de  $\geq 0,7 \log_{10}$  na carga viral inicial. Neste dia foi observado que a coorte II teve um maior declínio da carga viral (96% versus 78%) em relação à coorte I. Na semana 24, 75% dos pacientes da coorte II tinham atingindo a supressão viral contra 41% dos casos da coorte I. Os dados deste estudo foram de grande importância para fixar a dose de DTG (50 mg duas vezes ao

dia) para os estudos sequenciais em pacientes falhados com INIs de primeira linha (Eron et al., 2014).

No VIKING III, todos os pacientes eram adultos, com resistência ao RAL e/ou EVG e tinham carga viral  $\geq 500$  cópias/ml. Nos primeiros 7 dias do estudo, os pacientes receberam DTG (50 mg duas vezes ao dia) e continuaram com o mesmo tratamento de base da falha anterior. Nesse período o declínio da carga viral foi de  $1,43 \log_{10}$ . No dia 8 os pacientes continuaram com DTG (50 mg duas vezes ao dia), entretanto o esquema de base foi otimizado. Os resultados da semana 24 mostraram que 69% dos pacientes atingiram carga viral  $>50$  cópias/ml. Entretanto, a resposta a DTG foi reduzida entre pacientes que apresentavam a mutação Q148 +  $\geq 2$  outras mutações secundárias (Castagna et. al., 2014).

Dados do estudo IMPAACT P1093, mostram que DTG tem sido bem tolerado e eficaz no tratamento antirretroviral com um esquema de base otimizado em pacientes pediátricos maiores de seis anos (Viani et. al., 2014a; Viani et. al., 2014b). Entretanto, em pacientes pediátricos o DTG somente foi licenciado para indivíduos com idade  $>12$  anos e pesando mais que 40 quilos, com exposição ou não a outros antirretrovirais, porém naïves para INIs.

## **1.5 Inibidores de integrase em desenvolvimento**

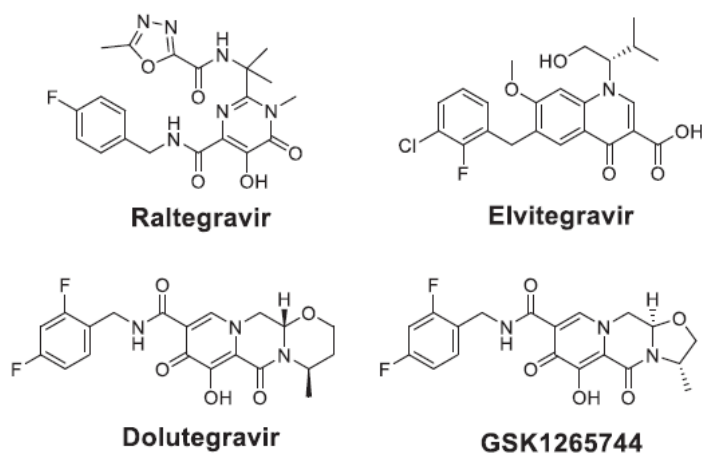
### **1.5.1 Bloqueadores de interação da integrase com a LEDGF/p75 (LEDGINS)**

Outros compostos que interferem na integração do DNA viral na célula hospedeira, mas que tem mecanismos de ação diferentes dos INSTIs e não compartilham o mesmo perfil de resistência, estão também em processo de estudos. Os compostos denominados como LEDGINS, bloqueiam a interação com a LEDGF/p75 interferindo indiretamente na atividade catalítica da integrase. (Christ et al., 2012; Xue et. al. 2014).

### 1.5.2 GSK1265744 ou Cabotegravir

Cabotegravir também conhecido como GSK1265744, vem sendo desenvolvido pelas indústrias farmacêuticas Shionogi e GlaxoSmithKline, as mesmas que em conjunto desenvolveram o dolutegravir. O cabotegravir está em fase IIb de estudos clínicos e possui além de uma estrutura química similar ao do DTG (figura 9) uma alta barreira genética e não necessita de um potencializador na sua administração, como é o caso do EVG.

Duas formas de administração do cabotegravir estão sendo estudadas: via oral (cabotegravir oral ou bucal CAB) e uma forma de ação prolongada injetável (GSK744 LA ou cabotegravir LA) (Spreen et. al., 2013; Spreen et. al., 2014; Yoshinaga et. al., 2015).



**Figura 9:** Estrutura química dos INIs licenciados (raltegravir, elvitegravir e dolutegravir) e do composto em estudo cabotegravir (GSK1265744) (Li et. al. 2015)

Em um estudo conduzido por Spreen e colaboradores (2013), o cabotegravir demonstrou ser bem tolerado em indivíduos saudáveis e/ou infectados pelo HIV. Este mesmo estudo apontou que indivíduos infectados pelo HIV apresentaram uma redução significativa da carga viral administrando doses diárias de 5mg ou 30mg.

Em outro estudo, também conduzido por Spreen e colaboradores (2014), foram incluídos 744 indivíduos saudáveis para receber doses intramuscular ou subcutânea de cabotegravir. Os resultados do estudo mostram que o tempo de concentração de cabotegravir no plasma foi prolongado, com concentrações mensuráveis até 52 semanas após a administração. Neste estudo foi possível constatar o uso de cabotegravir como uma opção na prevenção do HIV.

### **1.6 Mutações de resistência associadas aos INIs.**

A falha terapêutica ao RAL tem sido associada à seleção de quatro vias distintas E92Q, Q148H/R/K, N155H ou menos frequentemente a Y143R/H/C, as quais podem estar associadas a mutações menores. As mutações nos códons 148 e 155 têm maior impacto na susceptibilidade e estão localizadas próximas ao sítio catalítico da enzima (Hazuda et al., 2007). A via Q148H/R/K pode ser associada a mutações secundárias L74M+ E138A, E138K ou G140S, sendo a via mais comum Q148H/R/K + G140S. Essas mutações secundárias ou compensatórias, quando emergem sozinhas na presença do medicamento, tem pouco ou nenhum efeito na susceptibilidade aos INIs, porém quando associadas as mutações principais restauram o *fitness* viral (Ceccherini-Silberstein et al., 2010; Hu & Kuritzkes, 2010). Um exemplo é a mutação G140S que sozinha não confere resistência aos INIs, mas quando associada a Q148H restaura a capacidade de replicação viral (Delelis et al., 2009).

A mutação Y143R/H/C é menos frequente, e em geral está associada a T97A (Reigadas et al., 2011). Em um estudo realizado por Métifiot e colaboradores (2011) foi possível se constatar que mutações nos códons Y143 não estão associadas a resistência ao elvitegravir.

A via descrita para N155H é associada a L74M, E92Q, G163R (Hazuda et al., 2007; Charpentier et al., 2008; Malet et al., 2008) Em estudos, as mutações T66I e E92Q sozinhas conferiram resistência a elvitegravir. Outras mutações foram identificadas, incluindo as H51Y, Q95K,

S119R/G, E138K, Q146P, S147G e E157Q. Essas mutações sozinhas não tiveram grande impacto na susceptibilidade ao elvitegravir, porém quando combinadas com T66I ou E92Q aumentaram ainda mais a resistência a esta droga (McColl et al., 2007; Shimura et al., 2008).

As mutações nos códons E92, E138, Q148 e N155 são associados como resistência cruzada entre raltegravir e elvitegravir (McColl et al., 2007).

Para determinar a frequência de polimorfismos naturais associados à resistência aos INIs e em posições relacionadas a ligação com LEDGF / p75, um estudo foi realizado analisando 243 sequências do subtipo B de pacientes naïves para INIs. As posições de aminoácidos que interagem com LEDGF/p75 permaneceram conservadas, porém em 64% das outras posições foram polimórficas. Os polimorfismos observados foram V72I, L74I, T97A, T112I, A128T, E138K, Q148H, V151I, S153Y/A, M154I, N155H, K156N, E157Q, G163R, V165I, V201I, I203M, T206S, S230N e R263K (Lataillade et al., 2007). Em outro estudo conduzido por Low e colaboradores (2009) substituições nos códons V72I, L74I, T97A, V151I, M154I/L, E157Q, V165I, V201I, I203M, T206S e S230N ocorreram naturalmente em pacientes naïves para INIs, sendo que a substituição V72I apareceu em 56,3% (63/112) dos pacientes com infecção recente pelo HIV. Outros estudos evidenciam que alguns polimorfismos naturais no gene da integrase estão associados à resistência aos INIs de alguns subtipos virais do HIV. O polimorfismo V72I está associado à resistência aos INIs em subtipos A, B, D, F, G, CRFAG\_02, assim como L74M nos subtipos B, C, G, CRF02\_AG; V151I nos subtipos B, F; e M154I nos subtipos B, D, CRF01\_AE, CRF02\_AG (Hackett et al., 2005). Os polimorfismos naturais T97A, G163R e S230N também são descritos como mutações acessórias (Rhee et al., 2008).

Recentemente estudos “*in vitro*” mostraram que as mutações G118R e F121Y, raramente encontradas entre pacientes em falha ao RAL, conferem resistência cruzada entre raltegravir, elvitegravir e DTG (Munir et al., 2015; Malet et al., 2014). Outros ensaios “*in vitro*” identificaram que a combinação de H51Y+R263K aumenta a resistência ao dolutegravir, entretanto, diminuem a atividade da enzima e o *fitness viral*. (Mésplede et al., 2013). A

capacidade do vírus se replicar também é diminuída na presença de R263K (no gene da integrase) associada a mutação M184IV, (no gene da transcriptase reversa, esta mutação é selecionada na presença da lamivudina ou da emtricitabina) (Singhroy *et. al.*, 2015)

O estudo de Kobayashi e colaboradores (2011) demonstrou “*in vitro*” que as vias de mutação N155H+E92Q e Y143CHR+T97A não são compartilhadas pelo dolutegravir, embora a susceptibilidade a este fármaco seja reduzida pela via Q148HRK+G140SAC+E138KA.

Embora sem grande impacto na susceptibilidade ao dolutegravir, outros estudos “*in vitro*” mostraram a seleção de E92Q, L101I, T124A, S153YF e G193E sobre presença a de dolutegravir. (Kobayashi et al, 2011; Seki et al., 2010).

Nos estudos SPRING, SINGLE e FLAMINGO, não foi observada seleção de mutações associadas à resistência (Raffi *et. al.*, 2013a; Raffi *et. al.*, 2013b; Walmsley *et. al.*, 2013; Clotet *et. al.*, 2014).

No estudo VIKING III os pacientes com exposição prévia ao RAL que apresentavam mutação no códon 148 acompanhada de  $\geq 2$  mutações acessórias (incluindo L74I, E138A/K ou G140S/A), tiveram uma resposta reduzida no tratamento com DTG (Castagna *et. al.*, 2014).

Ferns e colaboradores (2009) descreveram a dinâmica do aparecimento e desaparecimento de mutações associadas à resistência em pacientes com evidência de falha terapêutica ao RAL. Neste estudo, o grupo observou que a mutação Q148HRK desapareceu cerca de um mês após a retirada do medicamento, o que segundo o autor reforça a ideia de que esta mutação sugere uma grande desvantagem para a replicação viral. Cepas virais que apresentam a N155 demoraram de cinco a sete meses para retornar ao tipo selvagem.

Dois casos isolados de resistência transmitida de INIs foram descritos em 2011. Boyd e colaboradores descreveram o caso de uma mulher de 47 anos, natural dos Camarões, infectada com cepa CRF\_AG e que após iniciar o tratamento com RAL não indetectou a carga viral. Uma amostra anterior ao

tratamento revelou a presença das mutações N155H + E157Q + G163R, além de variantes virais resistentes a ITRN, ITRNN e IP. Outro caso descrito foi o de um homem de 57 anos, naíve de terapia antirretroviral, e que após tratamento contendo RAL não teve supressão virológica. Análises de amostras anteriores ao tratamento evidenciaram a presença das mutações G140S+Q148H, assim como mutações associadas à resistência aos IP e ITRN (Young et al., 2011)

Apesar de poucos casos descritos de resistência primária aos INIs, há de se ressaltar que com o uso generalizado destes medicamentos o risco de resistência transmitida pode vir a ser um problema. Desta forma, por enquanto, ainda não parece necessário um teste genotípico antes do tratamento com RAL (Ceccherini-Silberstein et al., 2010), porém o teste em pacientes falhando a esse medicamento pode contribuir na prevenção da evolução da resistência, preservando as novas drogas dessa classe.

No Brasil, RAL é utilizado como parte de terapia de resgate de pacientes multi-falhados. Em nosso país, ainda são poucos os estudos que evidenciam dados sobre polimorfismos no gene da integrase e prevalência de mutações primárias associadas à resistência aos INIs, tornando-se de extrema importância à busca de conhecimento neste tema.

Também é de grande relevância estudos sobre perfil de mutações associados aos INIs em pacientes expostos a RAL, pois as opções terapêuticas nestes indivíduos ainda são bastante limitadas. Além disso, apesar de DTG ter uma barreira genética maior quando comparada a RAL e EVG, esses medicamentos compartilham alguns perfis de mutações associadas a resistência. Assim, a detecção desses perfis de mutações pode garantir conhecimentos sobre a evolução da resistência, dando subsídio para a conduta clínica nos casos de falha terapêutica.



## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Avaliar o gene da integrase em pacientes vivendo com HIV/aids.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Avaliar polimorfismos naturais no gene da integrase em amostras naïve para inibidores de integrase;
- Avaliar a taxa de mutações associadas à resistência a inibidores de integrase em pacientes em uso de inibidores de integrase;
- Descrever o perfil clínico, laboratorial e aspectos moleculares do HIV em amostras de pacientes em falha virológica a terapia antirretroviral com raltegravir nos últimos 6 anos.
- Avaliar fatores associados ao sucesso terapêutico da terapia antirretroviral com raltegravir (TARV+RAL);
- Avaliar o impacto da terapia antirretroviral com raltegravir (TARV+RAL) na susceptibilidade de inibidores de integrase de segunda geração;

## 3. PACIENTES E MÉTODOS

### 3.1 População do estudo

#### 3.1.1 Pacientes naïve de TARV+RAL

Um grupo de pacientes sem exposição a TARV+RAL foram incluídos neste estudo para avaliar a resistência transmitida e polimorfismos naturais da região da integrase que possam interferir na susceptibilidade aos INIs ou que estejam associados a subtipos específicos do HIV.

Assim, foram incluídas amostras de pacientes sabidamente naïve de terapia antirretroviral e de pacientes expostos à terapia antirretroviral, mas sem uso de RAL. Essas amostras foram selecionadas, quando possível de acordo com o subtipo da região polimerase (protease+transcriptase reversa), priorizando subtipos não B, visto que estudos com estes pacientes são menos disponíveis.

#### 3.1.2 Pacientes expostos à TARV+RAL

Todos os pacientes com exposição à terapia antirretroviral com RAL (TARV+RAL) encaminhados ao nosso laboratório no período de julho de 2009 a maio de 2015 foram incluídos neste estudo.

Os pacientes foram divididos de acordo com o sucesso virológico a TARV+RAL:

- **Pacientes com falha virológica a TARV+RAL (grupo virêmico):** pacientes que apresentavam falha virológica, ou seja, carga viral >50 cópias/mL após no mínimo 6 meses de TARV+RAL. Foram considerados os dados clínicos e laboratoriais disponíveis até o momento da genotipagem para a integrase.

- **Pacientes com sucesso virológico a TARV+RAL (grupo avirêmico):** pacientes com supressão viral, ou seja carga viral <50 cópias/mL após no mínimo 6 meses de TARV+RAL. As amostras foram coletadas de janeiro de 2011 à março de 2013, entretanto esses pacientes foram acompanhados até dezembro de 2014 pelo histórico de carga viral e quantificação de TCD4<sup>+</sup> no SISGENO (Sistema de Controle de exames de Genotipagem) e/ou prontuário médico, quando disponíveis. Os pacientes desse grupo que apresentaram falha virológica até dezembro de 2014 não foram incluídos no grupo virêmico.

### **3.2 Comitê de Ética**

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Adolfo Lutz – CEPIAL e do Instituto de Infectologia Emilio Ribas (Anexo1).

### **3.3 Métodos laboratoriais**

#### **3.3.1 Coleta e processamento das amostras**

As amostras foram coletadas em dois tubos de sangue total com EDTA (ácido etileno diamino tetra-acético) e encaminhadas para o Laboratório de Genotipagem do HIV do Instituto Adolfo Lutz no prazo máximo de seis horas após a coleta. Os tubos de sangue foram centrifugados a 2000 rpm por 20 minutos para a separação do plasma, o qual foi armazenado a temperatura de  $-70^{\circ}$  C até o processamento. Também foram separadas e armazenadas a temperatura de  $-70^{\circ}$  C, duas alíquotas com 500  $\mu$ l (cada) de células mononucleares do sangue periférico (do inglês peripheral blood mononuclear cell - PBMC).

Para amostras com carga viral plasmática >200 e <1000 cópias/ml, duas alíquotas de 1mL de plasma separadas no momento da chegada no laboratório foram centrifugadas a 18000 rpm por 60 minutos a 4°C. Após a centrifugação foi retirado 930 µl do sobrenadante de ambos os tubos, restando 70 µl de plasma concentrado em cada tubo para a extração do RNA viral.

### **3.3.2 Quantificação da carga viral e contagem de células TCD4<sup>+</sup>**

A quantificação da carga viral (CV) foi realizada a partir do método bDNA (Versant 3,0 Siemens, Erlanged, Alemanha) ou Abbott Real Time HIV-1 (ABBOTT Molecular, INC). A contagem de células TCD4<sup>+</sup> foi realizada por citometria de fluxo (FACS Calibur, BD, San José, SA, EUA).

O histórico de CV e contagem de células TCD4<sup>+</sup> anteriores e TARV+RAL foram verificadas no SISGENO ou no prontuário médico quando disponíveis.

A evolução da contagem de células TCD4<sup>+</sup> e quantificação da CV foram analisadas em três momentos: antes da introdução da TARV+RAL, entre as semanas 12-24 após a exposição a TARV+RAL e no momento da coleta para teste de genotipagem da integrase (para pacientes com falha virológica a TARV+RAL) ou na visita da ultima consulta (para pacientes do grupo avirêmico).

### **3.3.3 Extração do RNA e DNA viral**

A extração do RNA viral foi realizada a partir de 140 µl do plasma utilizando o QIAmp Viral RNA Mini Kit (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante. Para a extração do DNA viral foi utilizado o QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) de acordo com instruções do fabricante.

### 3.3.4 Retrotranscrição e amplificação do gene da Integrase

O RNA viral extraído foi retrotranscrito e amplificado utilizando a técnica de *One Step RT-PCR* descrito a seguir (para uma reação): 15,775 de água livre de DNase/RNase (Life Technologie, USA), 2,5 µl de 10x PCR Buffer High Fidelity (Life Technologie, USA), 1 µl de 50 mM MgSO<sub>4</sub> (Life Technologie, USA), 0,5 µl 10mM dNTP, 1.25 µl de 0,1 mM DTT (Life Technologie, USA), 0,1 µl de inibidor de RNase 40U/µl (Biolabs), 0,1 µl de RT Superscript III 200 U/µl (Life Technologie, USA), 0,125 µl Taq Platinum High Fidelity 5 U/µl (Life Technologie, USA), 0,5 µl de *primer* KVL 68, 0,5 µl de *primer* KVL 69 e 10 µl de RNA viral extraído. A reação foi incubada a 50°C por 30 minutos e a 94°C 2 minutos, seguida de 40 ciclos de 94°C por 15 segundos, 53°C por 30 segundos, 68°C por 1 minuto e ao final a 68°C 10 min gerando um fragmento de 2,127 Kb.

Para o *Nested PCR* foi utilizado (para uma reação) 12.5µl GoTaq® Green Master Mix (Promega), 5.5µl de água livre de nuclease (Promega), 1µl *primer* KVL70, 1µl *primer* KVL84 e 5µl do produto do *One Step RT-PCR*. As condições de ciclagem foram 94°C por 15 segundos, 58°C por 30 segundos, 72°C por 1 minuto seguido de 25 ciclos de 94°C por 15 segundos, 72°C por 1 minuto adicionando 5 segundos por ciclo e ao final para a extensão 72°C por 7 minutos, gerando um fragmento de aproximadamente 1,253 Kb. O produto do *Nested PCR* foi quantificado por gel de agarose a 1% em tampão TBE (Tris/Borato/EDTA) 0,5X corado com Sybr Safe® (Life Technologie, USA) utilizando *Low DNA Mass Ladder* (Life Technologie, USA) como marcador.

Os *primers* utilizados neste estudo para a amplificação e sequenciamento do gene da integrase foram sintetizados pela (Life Technologie, USA) e estão descritos na tabela 1.

**Tabela 1:** Iniciadores utilizados para a amplificação e sequenciamento do gene completo da integrase. (Laethem et al., 2008)

Etapa	Sequência (5' → 3')	Posição <sup>a</sup>
<b>One Step RT-PCR</b>		
KVL068 (F)	AGGAGCAGAACTTWCTATGTAGATGG	3854-3880
KVL069 (R)	TTCTTCCTGCCATAGGARATGCCTAAG	5955 - 5981
<b>Nested PCR</b>		
KVL070 (F)	TTCRGGATYAGAAGTAAAYATAGTAACAG	4013 - 4042
KVL084 (R)	TCCTGTATGCARACCCCAATATG	5243 - 5266
<b>Sequenciamento</b>		
KVL076	GCACAYAAAGGRATTGGAGGAAATGAAC	4013 - 4042
KVL084	TCCTGTATGCARACCCCAATATG	5243 – 5266
KVL082	GGVATTCCCTACAATCCCCAAAG	4647 – 4669
KVL083	GAATACTGCCATTTGTACTGCTG	4750 – 4772

**Legenda:** <sup>a</sup> Posição em relação ao HXB2; F- Forward; R- Reverse.

Amostras negativas no PCR foram resgatadas por protocolo utilizando DNA genômico extraído de PBMC. A amplificação do gene da integrase do HIV-1 a partir do DNA proviral foi realizada em replicata. Para a primeira etapa da reação foi utilizado (para uma reação) 15 µl GoTaq® Colorless Master Mix (Promega) ,2 µl Nuclease free water (Promega), 1,5 µl *primer* KVL70, 1,5 µl *primer* KVL84 e 5 µl de DNA proviral extraído. As condições de ciclagem foram: 40 ciclos de 94°C por 15 segundos, 58°C por 30 segundos, 72°C por 2 minutos e 30 segundos e ao final para a extensão 72°C por 7 minutos.

Para o *Nested PCR* foi utilizado (para uma reação) 15 µl GoTaq® Green Master Mix (Promega) ,3 µl de água livre de nuclease (Promega), 1 µl de *primer* KVL70, 1 µl de *primer* KVL84 e 5 µl do produto da primeira PCR. As condições de ciclagem foram: 10 ciclos de 94°C por 2 minutos, 53°C por 30 segundos, 72°C por 1 minuto e 30 segundos, seguido de 30 ciclos á 94°C por 15 segundos, 53°C por 30 segundos, 72°C por 1 minuto e 30 segundos

adicionando 5 segundos por ciclo e ao final para a extensão 72°C por 7 minutos. O produto do *Nested PCR* foi quantificado por gel de agarose a 1% em tampão TBE (Tris/Borato/EDTA) 0,5X corado com Sybr Safe® (Life Technologie, USA) utilizando Low DNA Mass Ladder (Life Technologie, USA) como marcador.

### **3.3.5 Retrotranscrição e amplificação dos genes da protease e transcriptase reversa**

Para todas as amostras de pacientes expostos a TARV+RAL foram sequenciados, além do gene da integrase, os genes da protease (PT) e transcriptase reversa (RT), a fim de analisar qual ARV não estava ativo no momento da falha virológica a TARV+RAL. Os genes da PT e RT foram amplificados utilizando o TRUGENE® HIV-1 Genotyping Assay/OpenGene® DNA System (Siemens Healthcare Diagnostics, Tarrytown, NY) ou por metodologia *in house* de *One Step RT-PCR* descrita a seguir: 15,775 de água livre de DNase/RNase (Life Technologies, USA), 5 µl de 10x PCR Buffer High Fidelity (Life Technologie, USA), 2 µl de 50 mM MgSO<sub>4</sub> (Life Technologie, USA), 1,5µl 10mM dNTP, 2,5µl de 0,1 mM DTT (Life Technologie, USA), 0,25 µl de inibidor Rnase 40U/µl ( Biolabs), 0,25µl de RT Superscript III 200 U/µl (Life Technologie, USA),0,25µl Taq Platinum High Fidelity 5 U/µl (Life Technologie, USA), 1,5 µl *primer* Z2167, 1,5 µl *primer* 3429 e 10 µl de RNA viral extraído. A reação foi encubada a 50°C por 30 minutos e a 94°C por 5 minutos, seguidos de 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos, 68°C por 50 segundos adicionando-se 5 segundos por ciclo e ao final a 68°C por 10 minutos gerando um fragmento de 1,25 Kb.

Para o *Nested PCR* foi utilizado (para uma reação) 15 µl GoTaq® Green Master Mix (Promega) ,3 µl Nuclease free water (Promega), 1 µl *primer* Z2167, 1 µl *primer* F2 e 5 µl do produto da primeira PCR. As condições de ciclagem foram 10 ciclos de 94°C por 2 minutos, 53°C por 30 segundos, 72°C por 1 minuto e 30 segundos, seguido de 30 ciclos á 94°C

por 15 segundos, 53°C por 30 segundos, 72°C por 1 minuto e 30 segundos adicionando 5 segundos por ciclo e ao final para a extensão 72°C por 7 minutos. O produto do *Nested PCR* foi quantificado por gel de agarose a 1% em tampão TBE (Tris/Borato/EDTA) 0,5X corado com Sybr Safe® (Life Technologie, USA) utilizando Low DNA Mass Ladder (Life Technologie, USA) como marcador.

Os *primers* para a amplificação e sequenciamento do gene da PT e RT estão descritos na Tabela 2, e assim como os iniciadores da região da integrase foram sintetizados pela Life Technologie, USA.

**Tabela 2:** Iniciadores utilizados para a amplificação e sequenciamento do gene da protease e transcriptase reversa. (Rodrigues et al., 2005; Niubó et al., 2000)

Etapa	Sequência (5' → 3')	Posição
<b>One Step RT-PCR</b>		
Z2167 (F)	CCAGAAGAGAGCTTCAGGT	2164 – 2182
Z3429 (R)	GTGCTTTGGTTCCTCTAAGG	3395 – 3414
<b>Nested PCR</b>		
Z2167 (F)	CCAGAAGAGAGCTTCAGGT	2164 - 2182
F2 (R)	GTATGTCATTGACAGTCCAGC	3321 - 3301
<b>Sequenciamento</b>		
DP10 (F)	TTTCCCCACTAACTTCTGTATGTCATTGACA	2198 - 2223
DP11 (R)	CCATTCCTGGCTTTAATTTTACTGGTA	2598 - 2572
DP16 (F)	CCTCAAATCACTCTTTGGCAAC	2253 - 2274
DP17 (R)	AAAATTTAAAGTGCAGCCAAT	2549 - 2529
F1 (F)	GTTGACTCAGATTGGTTGCAC	2519 - 2539
F2 (R)	GTATGTCATTGACAGTCCAGC	3321 - 3301
F3 (R)	TATCAGGATGGAGTTCATAAC	3241 - 3261
F4 (F)	GGATGGCCCCAAAAGTTAAAC	2597 - 2616

**Legenda:** <sup>a</sup> Posição em relação ao HXB2; F- Forward; R- Reverse.



### 3.3.6 Reação de sequenciamento dos genes da IN, PT e RT

Foram realizadas 4 reações de sequenciamento para o gene da integrase, contendo em cada tubo 0.5µl do Kit DNA Sequencing –Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction – ABI Prism® (Life Technologies, USA), 4µl 2.5X Sequencing Buffer (Applied Biosystems, USA), 1µl de água DNase RNase free (LifeTechnologies, USA), 1.5µl (10-20ng) de produto amplificado e 3µl primer para cada tubo contendo KVL76, KVL84, KVL82, KVL83. A reação de sequenciamento foi realizada em placa (Life Technologies, USA). As condições de ciclagem foram 25 ciclos de 94°C por 10 segundos, 50°C por 5 segundos e a 60°C por 4 minutos.

Para o sequenciamento dos genes da PT e RT para amostras amplificadas pela metodologia *in house* foram feitas 8 reações contendo em cada tubo 0.5µl do Kit DNA Sequencing–Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction – ABI Prism® (Life Technologies, USA), 4µl 2.5X Sequencing Buffer (Applied Biosystems, USA), 2.4µl de água DNase RNase free (Life Technologies, USA), 1.5µl (5-20ng) de produto amplificado e 1.6µl primer para cada tubo contendo DP10, DP11, DP16, DP17, F1, F2, F4 e F3.

A purificação e precipitação do produto das reações de sequenciamento dos genes da Integrase, PT e RT foram realizadas com etanol e acetado de sódio de acordo com o protocolo recomendado pela Life Technologies. Após a etapa de precipitação adicionou-se 10 µL de HiDi Formamida (Life Technologies, USA) para cada amostra, em seguida foram desnaturadas em termociclador a 95°C por 3 minutos e imediatamente resfriadas em gelo para serem sequenciadas utilizando-se o analisador automático ABI 3130XL Genetic Analyzer (Life Technologies, USA). Os cromatogramas foram editados manualmente utilizando o programa software Sequencher 4.7 (GeneCodes, USA).

## **4. Análise Molecular**

### **4.1 Susceptibilidade aos antirretrovirais**

A susceptibilidade aos INIs, IP, NRTI e NNRTI foi determinada a partir do algoritmo de Stanford University HIV Drug Resistance Database – HIVdb (Stanford HIVdb) e a lista de mutações da International Aids Society de 2014 (Wensing et al., 2014).

### **4.2 Medicamentos ativos da TARV+RAL (do inglês *Genotypic Sensitivity Score – GSS*)**

Na avaliação dos antirretrovirais ativos na TARV+RAL (*Genotypic Sensitivity Score - GSS*), foram levadas em consideração dados da última genotipagem do gene da PT e RT anteriores ao TARV+RAL. Os antirretrovirais foram pontuados de acordo com a susceptibilidade determinada pelo HIVdb: *susceptible* ou *potential low-level resistance* foram ativos e receberam 1 ponto; *low-level resistance* foram parcialmente ativos recebendo 0.5 ponto; *intermediate resistance* ou *resistance* foram considerados não ativos e receberam pontuação 0. O GSS dos antirretrovirais foi verificado antes da TARV+RAL (GSS1) e no momento da genotipagem para integrase (GSS2), em ambos os momentos RAL não foi considerado na pontuação do GSS.

### **4.3 Mutações associadas a resistência aos INIs e polimorfismos naturais da integrase**

As mutações associadas à resistência aos INIs, IP, NRTI e NNRTI foram determinadas a partir do algoritmo de Stanford HIVdb e da lista de mutações da International Aids Society de 2014 (Wensing et al., 2014)

A análise de polimorfismos e mutações associadas a resistência aos INIs foram feitas considerando tanto o algoritmo de HIVdb quanto a lista do IAS-USA. Para análise de polimorfismos associados ou não a resistência

aos INIs, foram incluídas sequências do gene da integrase do HIV-1 (códon 1-288) de 85 pacientes sabidamente sem exposição ao RAL e 5012 depositadas no banco de dados Los Alamos National Laboratory (LANL). Como não havia dados de exposição à INIs das sequências depositadas no LANL, foram selecionadas apenas aquelas que não tinham mutações principais no gene da integrase. As sequências foram alinhadas usando ClustalW do software BioEdit v. 7.0.9, sendo separadas em grupos de acordo com o subtipo viral (B, C e F). Foram excluídas cepas com evidência de recombinação.

#### **4.4 Subtipos**

O subtipo viral foi determinado com REGA HIV-1 Subtyping Tool - Version 2.0 (<http://dbpartners.stanford.edu/RegaSubtyping/>) e National Center for Biotechnology Information-NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genotyping/formpagex.cgi>).

A construção da árvore filogenética foi realizada utilizando o software PAUP v4.0b 10 (Swofford, 2005) aplicando o modelo de evolução selecionado pelo Modeltest (TVM+I+G).

#### **4.5 Fatores associados com sucesso terapêutico a TARV+RAL**

Os pacientes em uso de TARV+RAL, grupo virêmico e o grupo avirêmico, foram comparados para analisar os fatores que poderiam estar associados ao sucesso virológico a TARV+RAL. Os pacientes foram avaliados no período de julho de 2009 a julho de 2013.

Os dados demográficos dos pacientes, assim como os resultados de exames laboratoriais (linfócitos TCD4+, carga viral e genotipagem dos genes da PT/RT), histórico de exposição aos antirretrovirais e tempo de exposição ao RAL foram obtidos através de consulta aos prontuários ou preenchimento dos dados pelo médico do paciente. A avaliação da adesão à TARV+RAL foi consultada na ficha de pedido de genotipagem para integrase ou no

prontuário clínico. A adesão foi categorizada em boa ou ruim de acordo com o próprio médico do paciente.

As variáveis analisadas foram: zenith de carga viral (maior carga viral disponível durante o tempo de infecção); nadir de células TCD4<sup>+</sup> (menor contagem de células TCD4<sup>+</sup> disponível durante o tempo de infecção); idade; sexo; contagem de células TCD4<sup>+</sup> e carga viral anterior a exposição a RAL, entre as semanas 12-24 de exposição ao RAL e na coleta de amostra; o tempo de exposição ao RAL; tempo de tratamento HAART; adesão a TARV+RAL; e os antirretrovirais ativos compondo a TARV+RAL (GSS1- *Genotypic Sensitivity Score - GSS*).

## **5. Análises estatísticas**

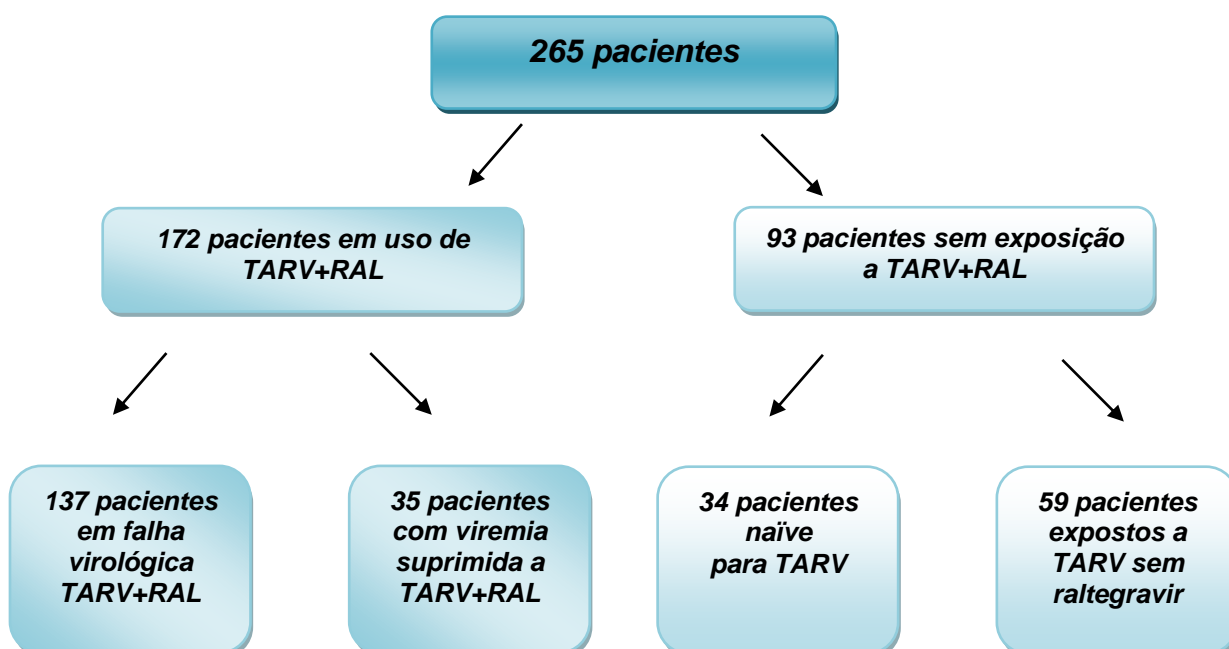
Os dados demográficos, clínicos, laboratoriais e moleculares dos pacientes incluídos neste estudo foram digitados em banco de dados EpInfo6 (CDC).

As análises estatísticas foram feitas utilizando os programa Epilnfo 6 (CDC), STATA e GraphPad software, assumindo um valor de significância  $p < 0.05$ . O teste t foi utilizado para a análise de variáveis categóricas e para as variáveis contínuas testes não paramétricos de Kruskal-Wallis ou Mann-Whitney, respectivamente. Para comparar variáveis contínuas entre um mesmo individuo de cada grupo teste t pareado. Os resultados foram expressos em medianas e percentis 25th e 75th (IQR). O intervalo de confiança (IC) considerado foi de 95%. Análises de regressão logística foram feitas utilizando o STATA software.

## 6. Resultados

### 6. 1 População do estudo

No total, foram incluídas amostras de 265 pacientes vivendo com HIV/aids neste estudo, como mostra o organograma a seguir:



### 6.2 Resistência transmitida e polimorfismos naturais no gene da integrase

Nesta análise, foram incluídas 93 sequências da integrase provenientes de amostras de pacientes sem exposição a RAL.

Dos 288 aminoácidos que compõem o gene da integrase 53% (154/288) permaneceram conservados em todos os subtipos analisados. Os códons descritos na literatura como associados à resistência aos INIs que apresentaram discordância entre os subtipos B, F, e C das sequências analisadas estão descritos na tabela 3.

As mutações V151I e M154IL foram observadas somente em amostras do subtipo B. A frequência da mutação V151I entre as sequências

do subtipo B deste estudo (28%) foi maior quando comparadas as sequências B depositadas em LANL (4%) ( $p < 0.001$ ). A mutação V72I foi presente em 100% das amostras do estudo do subtipo C, enquanto 54% das sequências de LANL apresentaram esta mutação ( $p < 0.001$ ). As proporções de polimorfismos associados a resistência está representado na tabela 6.

Os polimorfismos L100I, T124A e V201I, descritos como associados à resistência ao DTG, foram mais frequentes em amostras não B, sendo isto também observado em sequências depositadas no LANL.

Embora o polimorfismo V201I tenha sido observado entre sequências do subtipo B ele teve uma frequência maior entre os subtipos não B (tabela 3).

O polimorfismo T124A não foi verificado em sequências do subtipo C das amostras do estudo, contudo entre as sequências C de LANL a frequência desse polimorfismo foi de 71%.

Mutações principais nos códons 92, 143, 148 e 155 associadas a resistência aos INIs não foram observadas nas amostras de pacientes sem exposição a raltegravir. Um fato interessante foi a presença da mutação N155H em uma amostra do ano de 1996 de origem australiana depositada no LANL.

Entre pacientes naïve foi verificada, em uma sequência do subtipo B, uma inserção do aminoácido Glicina (GGG) entre os códons 105 e 106 do gene da integrase, e em outra do subtipo C uma Asparagina (AAT) entre os códons 254 e 255. Inserção de sete aminoácidos (K/V/D/Y/S/H e L) entre os códons 68 e 69 foi observada em uma sequência do subtipo B de amostra de paciente tratado com TARV. Deleção do códon 144 foi verificada em uma sequência do subtipo F de paciente tratado com TARV.

**Tabela 3:** Prevalência de polimorfismos associados à resistência aos INIs, de acordo com o algoritmo de Stanford University HIV Drug Resistance Databases, em amostras do estudo sem exposição ao raltegravir e as sequências depositadas no LANL.

Subtipo	Polimorfismos	Amostras do estudo <sup>a</sup> % (n=93)	Amostras depositadas em LANL % (n=5012)
<b>B</b>	V72I	60	55
	L101I	45	40
	T124A	17	25
	V151I*	28	4
	M154I/L	7	10
	V201I	44	38
<b>F</b>	V72I	60	53
	L 101I	100	91
	T124A	100	70
	V201I	88	95
<b>C</b>	V72I *	100	54
	L 101I	80	97
	T124A*	0	71
	V201I	100	96

**Legenda:** \* p<0.001; LANL - Los Alamos National Laboratory. <sup>a</sup> Amostras do estudo sabidamente sem exposição ao raltegravir.

### 6.3 Evolução do perfil clínico, laboratorial e aspectos moleculares do HIV em pacientes em uso de TARV+RAL

#### 6.3.1 Pacientes com sucesso virológico

Entre os pacientes com sucesso virológico a TARV+RAL, 19% (7/35) haviam usado o T-20 por no máximo 6 meses antes da troca para raltegravir. Esses sete pacientes não tinham adesão ou tinham intolerância ao T-20, sendo que três desses já estavam com a carga viral indetectável no momento da troca de T-20 para raltegravir. Além desses três pacientes, quatro também estavam com carga viral suprimida quando iniciaram o tratamento com raltegravir.

O sequenciamento genético a partir do DNA extraído foi possível em 48% (17/35) das amostras de pacientes com sucesso virológico a TARV+RAL. Essas amostras foram coletadas durante o período sem viremia (ou seja, com carga viral <50 cópias/mL) e todas as sequências obtidas foram caracterizadas como subtipo B.

Das 17 sequências analisadas, nenhuma apresentou mutações principais aos INIs. Entretanto, uma sequência apresentou as mutações H51HR+V151I+G163R. Essas mutações foram consideradas pelo algoritmo HIVdb como mutações acessórias de resistência ao raltegravir e elvitegravir, mas não predizem grande impacto na susceptibilidade. Outra sequência apresentou somente a mutação acessória V151I, que isolada não gera impacto na susceptibilidade aos INIs.

Os polimorfismos observados foram V72I (41%), L101I (29%), T112I (12%), T124A (29%), V151I (12%), K156N (18%), G163R (6%), V165I (12%), V201I (35%), T206S (6%), S230N (6%). Esses polimorfismos não interferem diretamente na susceptibilidade aos INIs.

De acordo com os dados de carga viral verificados no Sisgeno e/ou prontuário médico até dezembro de 2014, 6% (2/35) dos pacientes embora com sucesso virológico, tiveram episódios de *blips* (carga viral <200 e >50 cópias/mL) e 11% (4/35) apresentaram falha virológica a TARV+RAL durante esse período. As amostras desses quatro pacientes foram encaminhadas para teste de genotipagem da integrase e três apresentaram mutação de resistência associadas aos INIs. A via mutacional Q148H+G140S foi observada em duas sequências e a via N155H+V151I em uma sequência. Estes quatro pacientes não estão incluídos no grupo com falha virológica a TARV+RAL. A média de tratamento com TARV+RAL entre os pacientes que apresentaram falha terapêutica foi de 210 semanas.

### **6.3.2 Pacientes com falha virológica a TARV+RAL**

Para avaliar o desfecho clínico e laboratorial entre indivíduos com falha virológica a TARV+RAL, foram incluídas 69 amostras de pacientes com



pedido de genotipagem de integrase entre julho de 2009 a março de 2013. Os resultados descritos a seguir já foram publicados. (Cavalcanti et al., 2014).

O subtipo B foi prevalente em 61 sequências (88%) do gene da integrase. Em 22 pacientes (32%), embora com viremia detectável, não foi observada a presença de mutações associadas a resistência ao raltegravir. Uma ou mais mutações associadas à resistência ao raltegravir foi observada em 68% das sequências (47/69), com um padrão de mutações que também poderia prever a resistência à elvitegravir na maioria dos casos (62%). Não houve diferença estatística entre as características de *baseline* (antes da introdução da TARV+RAL) dos pacientes com (resistentes a RAL) ou sem mutações associadas a resistência ao raltegravir (susceptíveis a RAL) (tabela 4).

**Tabela 4:** Características de *baseline* dos pacientes em falha a TARV+RAL de acordo com a susceptibilidade ao RAL

Características	Total (n = 69[100%])	Susceptível a RAL (n = 22 [38%])	Resistente a RAL (n = 47 [68%])	p-value
Idade (anos)	42 (22–49)	44 (21–52)	42 (22–48)	0.661
Sexo masculino (%)	46 (67)	16 (73)	30 (64)	0.465
Nadir TCD4 <sup>+</sup> (células/mm <sup>3</sup> )	65 (12–155)	40 (7–176)	75 (17–161)	0.374
Zenith de carga viral (log <sub>10</sub> )	5.33 (4.72–5.70)	5.08 (4.40–5.59)	5.43 (4.86–5.70)	0.078
Nº de tratamentos	7 (6–9)	7 (6–9)	7 (5–9)	0.693
Nº de antirretrovirais utilizados	12 (10–14)	12 (10–14)	12 (11–14)	0.939
Tempo de tratamento (anos)	13 (11–15)	12 (11–15)	13 (11–15)	0.605
GSS1				
<2 antirretrovirais (%)	38 (79)	10 (67)	28 (85)	0.248
≥2 antirretrovirais (%)	10 (21)	5 (33)	5 (15)	

A carga viral e o TCD4<sup>+</sup> obtidos entre as semanas 12 e 24 estavam disponíveis em 83% dos casos (57/69). A maioria dos pacientes susceptíveis ao RAL tiveram carga viral significativamente menor em comparação aos casos com resistência a RAL (1,76 log<sub>10</sub> versus 3,85 log<sub>10</sub>; *p*=0,005). Não houve grande diferença no aumento de células TCD4<sup>+</sup> entre os dois grupos.

A mediana da exposição a TARV+RAL dos pacientes resistentes a RAL foi de 113 semanas, em comparação com 94 semanas para aqueles susceptíveis ( $p=0,161$ ). A duração acumulativa em viremia detectável, ou seja, carga viral >50 cópias/mL durante a TARV+RAL, foi significativamente maior entre aqueles que apresentaram resistência ao RAL (86 versus 32 semanas;  $p=0,001$ ). A tabela 5 descreve os dados clínicos e laboratoriais dos pacientes após a introdução da TARV+RAL.

**Tabela 5:** Dados clínicos e laboratoriais dos pacientes após a introdução da TARV+RAL de acordo com a susceptibilidade ao RAL

	<b>Total</b> (n = 69)	<b>Susceptível a RAL</b> (n = 22)	<b>Resistentes a RAL</b> (n = 47)	<b>p-value</b>
<b>TCD4<sup>+</sup> (células/mm<sup>3</sup>)</b>				
Início de RAL	190 (46–461)	199 (38–475)	189 (43–459)	0.765
Semana 12–24	282 (111–491)	269 (112–517)	282 (92–515)	0.685
Na genotipagem	244 (89–464)	179 (51–449)	252 (86–512)	0.577
<b>Carga viral (log<sub>10</sub>)</b>				
Início de RAL	4.42 (3.71–4.76)	3.89 (3.50–4.74)	4.46 (3.99–4.83)	0.207
Semana 12–24	3.23 (1.70–4.23)	1.76 (1.70–3.25)	3.85 (2.16–4.41)	<b>0.005</b>
Na genotipagem	3.92 (3.24–4.42)	3.89 (3.17–4.33)	3.92 (3.24–4.47)	0.827
<b>Tempo de exposição ao RAL (semanas)</b>	111 (61–154)	94 (38–140)	113 (76–161)	0.161
<b>Tempo em falha (semanas)</b>	71 (26–128)	32 (7–65)	86 (46–143)	<b>0.001</b>
<b>GSS2 (%)</b>				
<2 antirretrovirais	48 (86)	9 (53)	39 (100)	<b>0.001</b>
≥2 antirretrovirais	8 (14)	8 (47)	0 (0)	
<b>Clinica atual (%)</b>				
Assintomático	42 (76)	13 (76)	28 (74)	0.806
Sintomático	13 (24)	4 (24)	10 (26)	

Os resultados mostraram que, embora sem diferença estatística, no *baseline* os pacientes susceptíveis a RAL tenderam ter mais que dois antirretrovirais ativos no GSS1 (33% versus 15%,  $p=0,248$ ) e darunavir completamente ativo (60% versus 33%,  $p=0,275$ ). Entretanto, na genotipagem, tanto a atividade do darunavir (69% vs. 3%;  $p<0,001$ ) quanto o GSS2 (47% vs. 0%;  $p<0,001$ ) foram significativamente menores entre aqueles resistentes a RAL. As mutações de resistência para darunavir mais frequentes entre as sequências desse grupo foram V32I (67%), L33F (48%), I47V (44%), I54ML (48%) e I84V (56%).

Entre os pacientes analisados, 68% (47/69) apresentaram mutações para RAL, sendo a Q148H/R/K (21/47; 45%) a mais frequente, seguida de N155H (14/47; 30%), Y143R/H/C (3/47; 6%) e E92Q (1/47; 2%). Três sequências apresentaram as mutações E92Q+N155H (3/47; 6%), duas com Y143H+Q148H (2/47; 4%) e uma com Y143C+N155H (1/47; 2%). Além disso, a mutação F121Y que causa resistência intermediária à RAL de acordo com o algoritmo de Stanford HIVdb, foi observada em um paciente evoluindo para Y143R numa amostra de follow-up.

Na maior parte das sequências que apresentaram mutação de resistência no códon 155 (11/14; 79%) a mutação V151I também estava presente. Outras mutações observadas com N155H foram: T97A, E92Q, E138D e G163Q/R.

A maioria das sequências com Q148H/R/K (21/47; 45%) apresentaram também a G140S/A/C. Em algumas sequências, as mutações V54I, L74M, T97A, Y143H, E138A/K, V151I e G163R estiveram presentes, juntamente com mutação no códon 148. De acordo com o algoritmo de Stanford HIVdb, o conjunto de mutações L74M+T97A+V151I+G163R presentes em uma sequência previu resistência intermediária à raltegravir.

Apesar de não ser estatisticamente significativa, sequências de pacientes com mutação no códon 155 tenderam a ter uma menor mediana de carga viral (3,35  $\log_{10}$  versus 3,92  $\log_{10}$ ;  $p=0,059$ ) e uma contagem de TCD4<sup>+</sup> um pouco maior (360 células/mL versus 253 células/mL;  $p=0,114$ ) em comparação as sequências de pacientes com mutação no códon 148. O

tempo de exposição a raltegravir entre os pacientes com vírus com mutação no códon 155 (144 semanas) não foi diferente ( $p=0,131$ ) em comparação com aqueles com mutação no códon 148 (98 semanas).

### **6.3.3 Pacientes em falha virológica a TARV+RAL nos últimos 6 anos**

Nesta análise foram incluídas todas as amostras de pacientes ( $n=137$ ) com falha virológica a TARV+RAL no período de julho de 2009 a maio de 2015 (tabela 6). Dos 137 pacientes analisados, 41% estavam em uso de RAL+3TC+TDF+DRV/r. Em relação a medicamentos de segunda geração compondo a TARV+RAL, 14 pacientes estavam em uso de T20, 10 com etravirina e 7 com maraviroc. O darunavir/r foi utilizado em 66% dos casos.

A mediana de idade entre esses pacientes foi de 43 anos sendo 66% do gênero masculino. A mediana de carga viral foi de  $3,92\log_{10}$  e de TCD4<sup>+</sup> de 252 células/mm<sup>3</sup>.

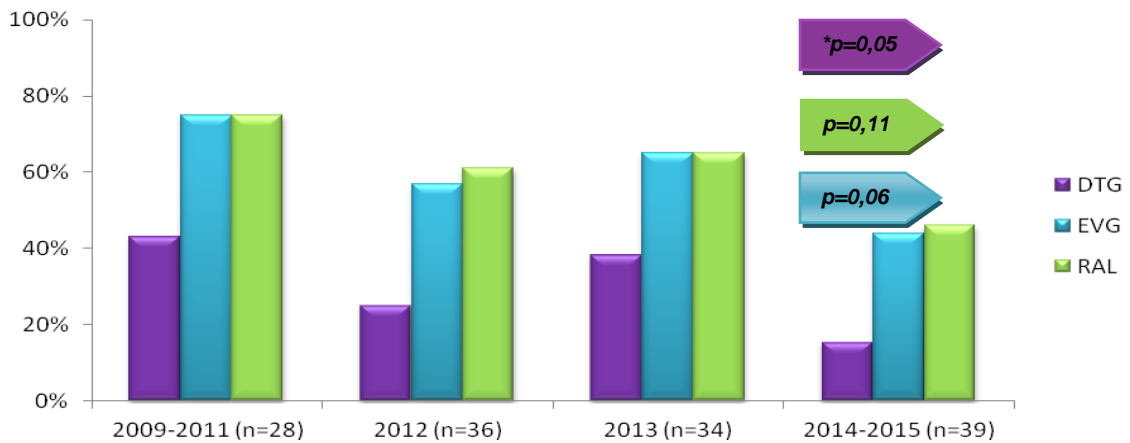
Entre as semanas 12-24 após a introdução de TARV+RAL, apenas 29% atingiram supressão viral. Estes pacientes que conseguiram essa supressão, apresentaram menos mutações associadas à resistência aos INIs quando comparados aos que não estavam suprimidos neste período (34% versus 66%,  $p=0,001$ ).

Das 137 sequências, 62% apresentaram resistência ao raltegravir e 30% para DTG, sendo a via 148RHK+140SA observada em 38% dos casos.

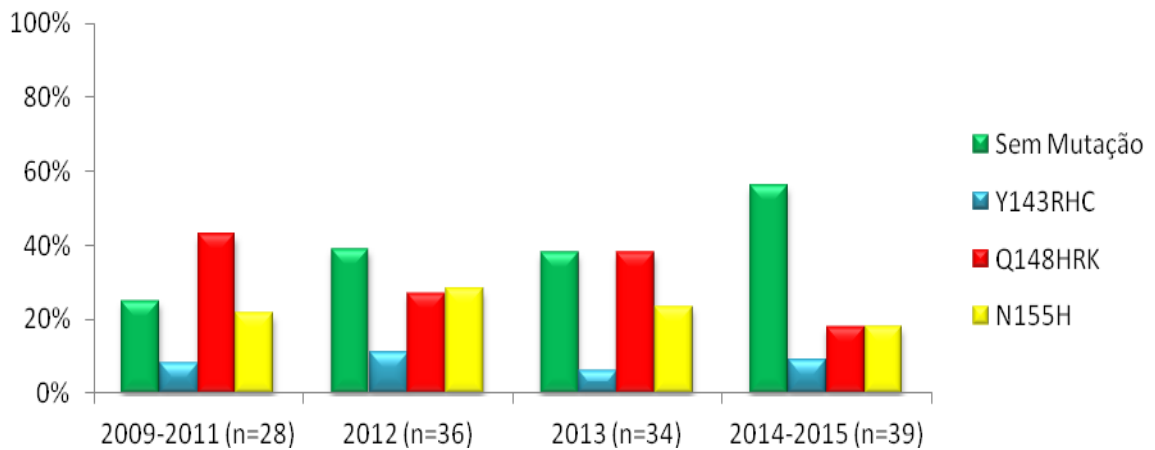
Quando comparados os anos de 2009 a 2015 (tabela 6), houve um aumento significativo do tempo de exposição ao TARV+RAL ( $p=0,001$ ). Entre esses anos, também houve diminuição significativa da resistência para DTG ( $p=0,05$ ) (figura 10) e no tempo em falha virológica a TARV+RAL ( $p=0,039$ ).

Embora sem significância estatística, foi observado um aumento de pacientes com viremia, mas sem a presença de mutações associadas à resistência ( $p=0,073$ ). Um declínio da presença de Q148RHK foi observado, porém sem significância estatística ( $p=0,11$ ) (figura 11). A frequência das mutações Y143RHC ( $p=0,848$ ) e N155H ( $p=0,783$ ) permaneceram estáveis.

Também, embora sem significância estatística, houve uma tendência no declínio na viremia entre as semanas 12-24 após o tratamento com TARV+RAL entre os seis anos analisados ( $p=0.068$ ).



**Figura10:** Resistência intermediária a alta aos INIs de acordo com o Stanford HIVdb em amostras de pacientes em falha virológica a TARV+RAL, durante os 6 anos. (DTG: dolutegravir; EVG: elvitegravir; RAL: raltegravir)



**Figura11:** Frequência das mutações principais associadas a resistência aos INIs de acordo com o Stanford HIVdb em amostras de pacientes em falha virológica a TARV+RAL, durante os 6 anos.

**Tabela 6:** Dados clínicos e laboratoriais dos pacientes em falha virológica a TARV+RAL entre os anos de 2009 a 2015.

	<b>Total (n = 137)</b>	<b>2009-2011 (n =28 )</b>	<b>2012 (n =36)</b>	<b>2013 (n =34)</b>	<b>2014-2015 (n =39 )</b>	<b>p-value</b>
<b>Idade (anos)</b>	43 (32-50)	41 (21 – 51)	44 (21 – 48)	46 (37 – 53)	40 (35 – 52)	0,241
<b>Sexo Masculino (%)</b>	66	71	58	73	64	0,525
<b>Nadir TCD4+ (cells/mm<sup>3</sup>)</b>	62 (12 -148)	31 (13 – 111)	76 (13 – 210)	42 (11 – 134)	72 (11 – 203)	0,466
<b>TCD4+ (cells/mm<sup>3</sup>)</b>						
baseline	181 (56 – 383)	121 (21 – 305)	287 (83 – 469)	150 (42 – 370)	175 (114 – 348)	0,488
Semana 12–24 de exposição ao RAL	314 (133 – 498)	211 (91 – 316)	388 (171 – 649)	309 (116 – 504)	325 (201 – 530)	0,165
Última observação	252 (17 – 463)	199 (58 – 314)	343 (106 – 517)	224 (141 – 448)	288 (157 – 486)	0,371
<b>Carga Viral (log<sub>10</sub>)</b>						
baseline	4,42 (3,71 – 4,77)	4,42 (4,07 – 4,83)	4,25 (3,62 – 4,66)	4,54 (3,51 – 5,05)	4,47 (4,06 – 4,90)	0,637
Semana 12–24 de exposição ao RAL	2,77 (1,70 – 4,15)	4,00 (2,69 – 4,53)	2,13 (1,70 – 3,50)	2,64 (1,70 – 4,45)	2,50 (1,70 – 3,66)	0,068
Última observação	3,92 (3,21 – 4,58)	4,22 (3,83 – 4,73)	3,67 (3,14 – 4,25)	3,74 (2,73 – 4,54)	3,98 (3,02 – 4,96)	<b>0,075</b>
Delta de carga viral	5,30 (4,83 – 5,70)	5,54 (5,02 -5,70)	5,43 (4,63 – 5,70)	5,20 (4,85 – 5,88)	5,09 (4,65 – 5,51)	0,614
<b>Tempo de exposição ao RAL (semanas)</b>	123 (70 – 178)	76 (42 – 117)	115 (62 – 160)	156 (91 – 196)	161 (69 – 244)	<b>0,001</b>
<b>Tempo com viremia (semanas)</b>	75 (34 – 130)	71 (34-113)	61 (27-130)	124 (79-172)	47 (31-116)	<b>0,039</b>
<b>Número de tratamentos</b>	6 (5 – 9)	8 (6 – 11)	7 (4 – 9)	6 (4 – 7)	6 (5 – 8)	0,109
<b>Número de antirretrovirais utilizados</b>	11 (9 – 13)	12 (11 – 14)	12 (10 – 14)	11 (8 – 13)	10 (9-13)	0,082
<b>Tempo de diagnóstico (anos)</b>	15 (13 – 19)	14 (13 – 17)	15 (13 – 19)	16 (13 – 18)	17 (13-19)	0,440
<b>Tempo de tratamento (anos)</b>	13 (11 – 15)	13 (10 – 15)	13 (11 – 15)	13 (10 – 16)	15 (10 -17)	0,395

#### **6.3.4 Seguimento pós genotipagem da integrase de pacientes com falha terapêutica a TARV+RAL**

Após o resultado de genotipagem da integrase, 16 pacientes com falha terapêutica a TARV+RAL (16/137), foi possível avaliar uma nova coleta de amostra. A amostra foi coletada em média 95 semanas após o laudo de resistência para integrase.

Em relação ao tratamento antirretroviral na segunda coleta, seis pacientes (37%) mantiveram a TARV+RAL mesmo após o laudo de resistência ao raltegravir, dois não tinham dados disponíveis do tratamento atual e oito deixaram de utilizar raltegravir (tabela 7)

Dos 16 pacientes analisados, oito mantiveram as mutações maiores associadas à resistência. Todos os pacientes que mantiveram a TARV+RAL (6/16) estavam entre esses pacientes.

Entre os pacientes que voltaram a ser susceptíveis a todos os INIs disponíveis (8/16), inclusive ao raltegravir, seis deixaram de usar este medicamento e o restante não tinham dados disponíveis de tratamento atual.

O tempo entre a primeira e a segunda genotipagem para integrase foi estatisticamente significativa ( $p=0,042$ ) entre os pacientes que continuaram resistentes ao raltegravir (85 semanas) e aqueles que voltaram a ser sensíveis a este medicamento (114 semanas).

**Tabela 7:** Perfil de mutações associadas a resistência e tratamento dos 16 pacientes em seguimento pós genotipagem para integrase

	Paciente	Perfil de mutações na 1ª Genotipagem	Perfil de mutações na 2ª Genotipagem	TARV na 1ª genotipagem	TARV na 2ª genotipagem	Tempo entre a 1ª e 2ª genotipagem (semanas)
Pacientes que permaneceram resistentes ao raltegravir na 2ª genotipagem	1	Y143R	Y143R	3TC+TDF+DRV/r+T20+RAL	3TC+TDF+DRV/r+T20	102
	2	Y143R+N155H+V151I	Y143R+V151IV	AZT+3TC+TDF+DRV/r+RAL	3TC+TDF+DRV/r	81
	3	Q148H+G140S	Q148H+G140S	3TC+TDF+DRV/r+RAL	3TC+TDF+DRV/r+ <b>RAL</b>	88
	4	Q148H+G140S	Y143H+Q148H+G140S+G163R	3TC+TDF+DRV/r+RAL	3TC+DRV/r+ <b>RAL</b>	105
	5	Q148H+G140S	Q148H+G140S	3TC+TDF+DRV/r+RAL	3TC+TDF+DRV/r+ <b>RAL</b>	14
	6	N155H	N155H	3TC+TDF+DRV/r+T20+RAL	3TC+TDF+DRV/r+ <b>RAL</b>	7
	7	N155H+V151I	N155H+E138D+V151I	3TC+TDF+LPV/r+RAL	3TC+TDF+LPV/r+ <b>RAL</b>	113
	8	N155H+V151I	Y143H+N155H	3TC+TDF+DRV/r+RAL	3TC+TDF+LPV/r+ <b>RAL</b>	64
Pacientes que voltaram a ser susceptíveis a raltegravir na 2ª genotipagem	9	Q148R+G140C+E138K	Não detectado	3TC+TDF+DRV/r+RAL	3TC+TDF+DRV/r	216
	10	Q148H+G140S	Não detectado	3TC+TDF+DRV/r+RAL	3TC+TDF+DRV/r+ETR+T20	108
	11	Q148H+G140S+V151IV	V151IV	3TC+TDF+DRV/r+ETR+RAL	3TC+TDF+TPV/r	164
	12	Q148+G140	Não detectado	3TC+TDF+LPV/r+RAL	Sem informação	120
	13	Y143H+Q148H+G140S	Não detectado	AZT+3TC+TDF+DRV/r+RAL	Sem informação	84
	14	Q148R+G140A	Não detectado	DRV/r+MRV+RAL	3TC+TDF+DRV/r	65
	15	N155H+V151I	V151I	AZT+3TC+TDF+RAL	3TC+TDF+DRV/R	150
	16	E92Q+N155H	Não detectado	Não informado+RAL	3TC+TDF+DRV/R+ETV	82



### 6. 3.5 Padrões atípicos de mutações associadas à resistência aos INIs

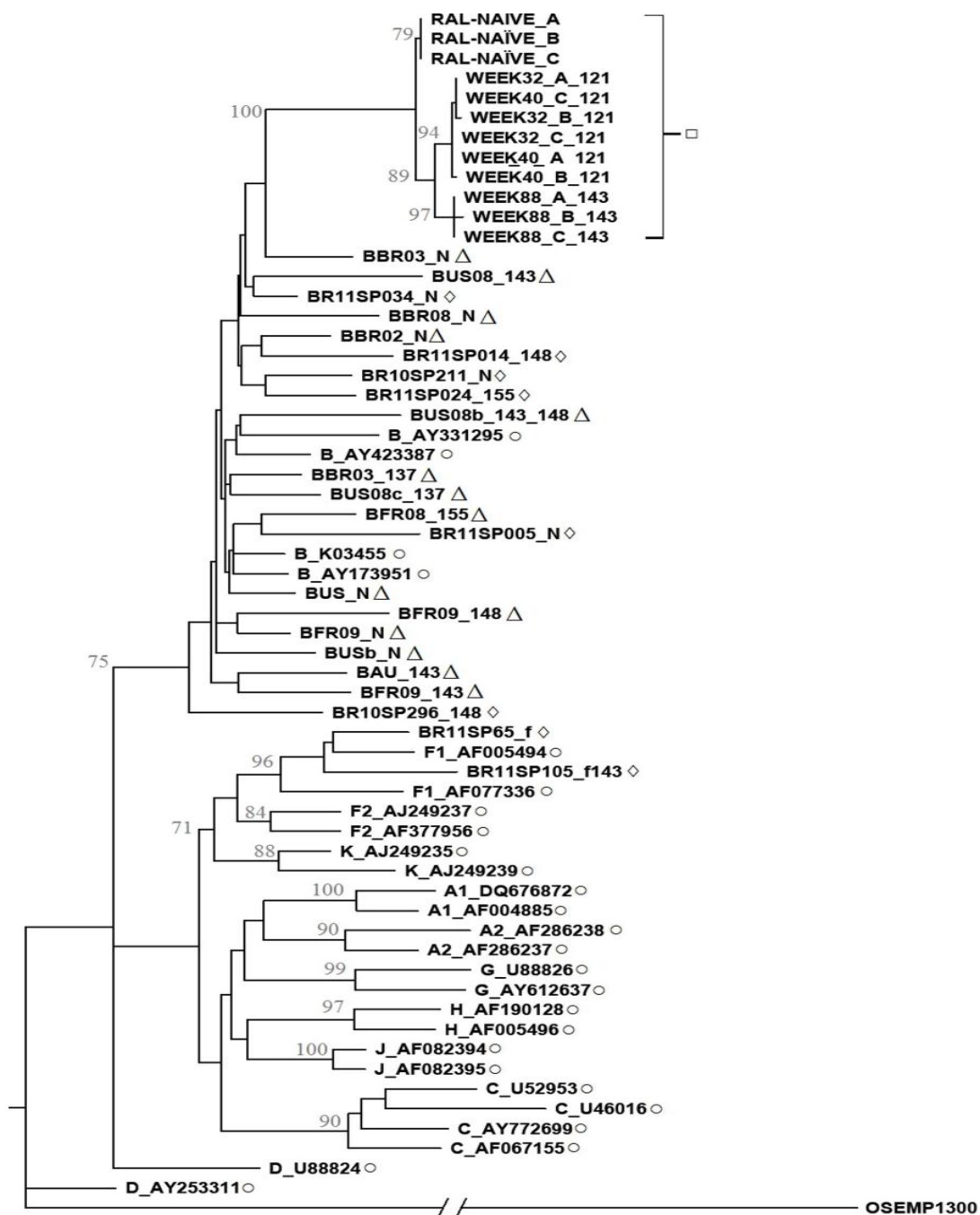
Entre os 137 pacientes com falha virológica a TARV+RAL, um paciente de 31 anos, sexo masculino e com aproximadamente 14 anos de infecção pelo HIV-1 apresentou a mutação F121Y após 32 semanas da introdução a TARV+RAL (Cavalcanti et al., 2012). A TARV+RAL era composta por 3TC+TDF+DRV/r+ETR+RAL. A evolução da carga viral e contagem de TCD4<sup>+</sup> podem ser observadas na figura 12.

Simultaneamente à mutação F121Y, foi observado o surgimento de L74I, T97A, Q137H e V151I, bem como polimorfismos sinônimos no códon 167. Para confirmar a presença desta mutação foi analisada uma amostra antes da exposição a TARV+RAL e nas semanas 32, 40 e 88 após a introdução de TARV+RAL. Todas as amostras foram amplificadas e sequenciadas independentemente em triplicata. As mutações descritas anteriormente com F121Y "*in vitro*", como T124A e T125K não foram encontradas nestas sequências. Nenhuma mudança relevante foi observada entre as semanas 32 (WK32) e 40 (WK40). Entretanto, na semana 88 (WK88), uma reversão nas posições F121Y, Q137H e V151I ao aminoácido selvagem foi observada, mantendo a T97A e revelando a emergência de K42R, V72I, L234I, V258I e a mutação maior Y143R (Figura 12 e 13).

Para determinar a proporção de posições polimórficas do gene da integrase e contextualizar as substituições de aminoácidos, as sequências do vírus do paciente foram alinhadas com o consenso de 2.523 sequências do subtipo B disponíveis no LANL (alinhamento global). As amostras RAL-naïve (antes da exposição à TARV+RAL) não exibiram mutações associadas a resistência aos INIs, mas tinham mutações tanto em posições polimórficas, como E11D, observadas em 26,9% do alinhamento global de B, bem como em posições não polimórficas, tais como Q164K, ocorrendo em apenas 0,0004% de sequências. A análise da reconstrução filogenética mostra um padrão evolutivo onde as sequências RAL-Naïve estão situadas perto dos principais ramos do subtipo B, mas longe do ramo com as cepas resistentes







**Figura 14:** Árvore filogenética representativa construída usando PAUP \* 4.10b com o modelo evolutivo GTR + i + g. Valores de bootstrap foram obtidos com 1000 repetições e valores superiores a 50 são representados em cinza claro. Árvore inclui repetições do paciente a partir de todos os pontos de tempo do estudo (□), referências subtipo LANL (○), as sequências aleatoriamente selecionados a partir do alinhamento global (◇) e as sequências de outros pacientes com a mutação no códon 143(Δ). As sequências do paciente ID10 são nomeados como RAL-naïve (antes da introdução do raltegravir) e WK32, 40 e 88 após a introdução raltegravir, seguido por uma letra (A, B, C) para cada triplicata. A sequência OSEMP1300 foi incluída na árvore como outgroup.

Entretanto, mesmo com o paciente em falha virológica e terapêutica a TARV+RAL o tratamento foi mantido cerca de 128 semanas após a genotipagem da integrase onde foi detectada a mutação Y143R. Em setembro de 2013 o paciente manteve tratamento com 3TC+TDF+DRV/r+ETR sendo o raltegravir substituído por DTG (TARV+DTG). Na semana 24, após a introdução da TARV+DTG, o paciente apresentou supressão virológica. Essa supressão foi mantida por aproximadamente 52 semanas (dados disponíveis no SISGENO), onde depois a carga viral aumentou 2,32 log<sub>10</sub>. Na semana 86 após a TARV+DTG uma amostra de sangue foi coletada e sequenciada, onde apresentou as mutações maiores Y143R+N155H e as acessórias L74I+T97A+E157Q. Apesar desse conjunto de mutações não ter causado grande impacto na susceptibilidade ao dolutegravir, todos os outros antirretrovirais do esquema estavam comprometidos apresentando resistência intermediária (DRV/r) ou alta (3TC, TDF e ETR).

#### **6.4 Fatores associados com sucesso terapêutico a TARV+RAL**

Noventa e dois pacientes com falha virológica a TARV+RAL (grupo virêmico) e 35 pacientes com viremia suprimida (grupo avirêmico) foram comparados a fim de se determinar fatores associados ao sucesso virológico durante TARV+RAL. Tanto para os pacientes do grupo avirêmico quanto para o dos virêmicos foram considerados os dados disponíveis até a data da coleta de amostra para a genotipagem da integrase (tabela 8)

Considerando a mediana de idade os pacientes do grupo avirêmico eram mais velhos do que os do grupo virêmico (44 vs. 48 anos,  $p=0.054$ ).

Embora o nadir (52 vs. 82 células/mm<sup>3</sup>,  $p=0.215$ ) e o CD4 de *baseline* (181 vs. 274 células/mm<sup>3</sup>,  $p=0.097$ ) tenham sido maiores entre o grupo avirêmico essa diferença não foi estatisticamente diferente.

A mediana de tempo de exposição ao raltegravir não foi estatisticamente diferente ( $p=0.357$ ) quando comparados grupo virêmico (115 semanas) e avirêmico (118 semanas).

Variáveis significativamente diferentes entre o grupo virêmicos e grupo avirêmicos foram: mediana de TCD4<sup>+</sup> na última avaliação (224 versus 388 células/mm<sup>3</sup>,  $p=0,006$ ), o tempo total de tratamento com ARV (13 versus 15 anos,  $p=0,012$ ), a adesão a TARV+RAL (48% versus 98%,  $p <0,001$ ) e a supressão viral nas semanas 12 a 24 (29% versus 83%,  $p <0,001$ ).

O darunavir/ritonavir foi utilizado por 85% do grupo avirêmico e em 82% dos casos do grupo virêmico. Embora não seja significativa, a maioria dos pacientes do grupo avirêmico (72%) tinham darunavir/ritonavir totalmente ativo compondo a TARV+RAL, entretanto apenas 41% dos pacientes do grupo virêmico eram completamente sensíveis a esse medicamento ( $p = 0,06$ ).

Na análise de regressão logística tanto a adesão ( $p=0,010$ ) e a viremia entre as semanas 12-24 ( $p=0,015$ ) foram associados de forma independente à supressão viral.

**Tabela 8:** Dados clínicos e laboratoriais dos pacientes expostos a TARV+RAL categorizados de acordo com o sucesso virológico.

	<b>Total</b> <b>(n = 126)</b>	<b>Virêmicos</b> <b>(n = 92)</b>	<b>Avirêmicos</b> <b>(n = 35)</b>	<b>p-value</b>
<b>Idade (anos)</b>	45 (33-52)	44 (23-50)	48 (39-54)	0.054
<b>Sexo masculino (%)</b>	66	67	75	0.400
<b>Nadir TCD4<sup>+</sup> (células/mm<sup>3</sup>)</b>	70 (18-144)	52 (13 - 143)	82 (25 - 128)	0.215
<b>Zenith carga viral (log<sub>10</sub>)</b>	5.26 (4.77-5.68)	5.21 (4.54-5.70)	5.30 (4.92-5.49)	0.724
<b>Número de tratamentos</b>	7 (5-9)	7 (5-9)	7 (6-8)	0.794
<b>Tempo de tratamento</b>	13 (11-15)	13 (10-15)	15 (13-16)	0.012
<b>TCD4<sup>+</sup> (células/mm<sup>3</sup>)</b>				
Baseline	218 (56-457)	181 (49-451)	274 (121-476)	0.097
Semana 12-24	314 (146-511)	282 (112-493)	323 (168-687)	0.165
Última observação	277 (117-518)	224 (89-464)	388 (247-653)	<b>0.006</b>
<b>HIV RNA level (log<sub>10</sub>)</b>				
Baseline	4.31 (3.49-4.80)	4.44 (3.72-4.82)	4.11 (1.70-4.80)	0.062
Semana 12-24	2.00 (1.70-4.00)	3.04(1.70-4.21)	1.70(1.70-1.70)	<b>&lt;0.001</b>
Supressão entre as semana 12-24 (%)	43	29	83	<b>&lt;0.001</b>
<b>Tempo de exposição ao RAL</b> <b>(semanas)</b>	115 (71-175)	115 (70-162)	118 (78-189)	0.357
<b>GSS (%)<sup>b</sup></b>				
≥1 antirretroviral	73	69	87	0.302
<b>Darunavir/r ativo (%)</b>	48	40	72	0.061
<b>Adesão (%)</b>	71	48	96	<b>&lt;0.001</b>

## 6.5 Impacto do uso prévio da TARV+RAL na atividade do dolutegravir

O estudo do impacto do uso prévio de TARV+RAL foi analisado em 92 amostras de pacientes com falha virológica a TARV+RAL e também já foi publicado (Cavalcanti et al., 2015)

Entre as 92 sequências da integrase, 35% (32/92) apresentaram resistência intermediária (27/32) ou alta (5/32) ao DTG (tabela 9). Esses pacientes foram classificados como resistentes ao dolutegravir.

Os pacientes portadores de vírus resistentes ao DTG tendiam a ter diminuição de TCD4<sup>+</sup> após ganho inicial. Além disso, esses indivíduos tinham uma carga viral mais elevada na última análise quando comparados aqueles susceptíveis aos DTG ( $p=0,011$ ).

Na coleta para genotipagem da integrase, pacientes com resistência ao DTG tinha valores de carga viral mais perto do Zenith (carga viral de delta -0,89 versus -1,31,  $p=0,033$ ), sugerindo alguma recuperação do *fitness viral*.

Além disso, embora não estatisticamente significante, os pacientes com viremia superior a 1.000 cópias/ml entre as semanas 12-24 após o início do tratamento com TARV+RAL tendiam a ter resistência ao DTG ( $p=0,072$ ).

Todos os pacientes com resistência a DTG tinha substituição de aminoácidos na posição 148, sendo acompanhada geralmente de G140S/A (30/32 dos casos). As sequências com a presença da mutação G140S/A associada com Q148H/R/K apresentaram carga viral mais elevada no momento da genotipagem para integrase quando comparados a aqueles sem estas duas mutações associadas (4,26 log<sub>10</sub> contra 3,73 log<sub>10</sub>;  $p=0,012$ ). As mutações acessórias L74I (16%, 5/32) e E138K/A (19%, 6/32) também foram observadas entre as sequências analisadas. Houve uma forte associação entre a presença de mutações G140S/A ( $p<0,001$ ) e E138A/K ( $p<0,001$ ) na perda de susceptibilidade ao dolutegravir.



**Tabela 9:** Dados clínicos e laboratoriais dos pacientes resistentes e susceptíveis ao dolutegravir (DTG)

	Total (n = 92)	Susceptíveis ao DTG (n = 60)	Resistentes ao DTG (n = 32)	p-value
<b>Idade (anos)</b>	44 (23-50)	44 (23-50)	44 (28-49)	0.982
<b>Sexo Masculino [n (%)]</b>	62 (67)	41 (68)	21 (66)	0.792
<b>Nadir TCD4<sup>+</sup> (cells/mm<sup>3</sup>)</b>	51 (13-143)	63 (21-143)	20 (11-141)	0.140
<b>TCD4<sup>+</sup> (cells/mm<sup>3</sup>)</b>				
baseline	181 (49 - 451)	150 (42-465)	229 (55-449)	0.925
Semana 12–24 de exposição ao RAL	314 (126 - 515)	282 (118-498)	316 (83-445)	0.544
Última observação	221 (89-448)	241 (111-435)	198 (31-448)	0.359
<b>Carga Viral (log<sub>10</sub>)</b>				
baseline	4.44 (3.72-4.82)	4.41 (3.61-4.77)	4.47 (4.09-4.84)	0.420
Semana 12–24 de exposição ao RAL	3.04 (1.70-4.21)	2.71 (1.70-4.07)	3.83 (1.92-4.27)	0.120
Última observação	3.99 (3.21-4.58)	3.82 (3.18-5.54)	4.36 (3.63-7.84)	<b>0.011</b>
Delta de carga viral	-1.07 (-0.66 – -1.88)	-1.31 (-0.75 – -2.15)	-0.89 (-0.31 – -1.53)	<b>0.033</b>
<b>Tempo de exposição ao RAL (semanas)</b>	115 (70-161)	114 (62-155)	122 (75-171)	0.794
<b>Tempo com viremia (semanas)</b>	75 (33-132)	71 (29-139)	77 (52-179)	0.655
<b>Número de tratamentos</b>	7 (7 – 9)	7 (6 – 9)	6 (4 – 8)	0.279
<b>GSS1 [n (%)]</b>				
<2 antirretrovirais	38 (79)	24 (77)	14 (82)	0.923
≥2 antirretrovirais	10 (21)	7 (23)	3 (18)	
<b>GSS2 [n (%)]</b>				
<2 antirretrovirais	50 (81)	30 (71)	20 (100)	0.391
≥2 antirretrovirais	12 (19)	12 (29)	0 (0)	

## 7. Discussão

No Brasil, desde de 1996 os pacientes infectados pelo HIV recebem gratuitamente pelo SUS (Sistema Único de Saúde) a terapia antirretroviral altamente ativa (HAART) para o tratamento dessa doença.

De acordo com o “Protocolo clínico de diretrizes terapêuticas para manejo da infecção pelo HIV em adultos” do Ministério da Saúde (PCDT-MS) recomenda que para a primeira linha de tratamento seja usada a combinação de três antirretrovirais sendo dois ITRNs associados a um ITRNN, como regra o esquema inicial seja tenofovir+lamivudina+efarivenz, caso exista alguma contraindicação ou intolerância esses medicamentos podem ser substituídos por outros da mesmas classes.

Para a segunda linha de tratamento o PCDT-MS recomenda o uso de dois ITRNs + um inibidor de protease (IP) associado ao ritonavir, sendo o lopinavir preferencialmente usado. Outras opções como atazanavir (ATV) e o fosamprenavir (FPV) podem ser utilizados em caso de contraindicações.

A terceira linha de tratamento, dita como terapia de resgate, é destinada a pacientes com ampla exposição a terapia antirretroviral. De acordo com o PCDT-MS o tratamento desses pacientes também chamados de multi-experimentados é complexo e exige a interação de profissionais experientes no tratamento de resistência viral. Os medicamentos que compõem a terapia de resgate de acordo com a PCDT-MS são o danuravir, tipranavir (segunda geração de IP), etravirina (segunda geração de NNRTI), maraviroc (antagonistas de co-receptores CCR5), enfuvirtida (inibidor de entrada) este último tem seu uso cada vez menos frequente. O raltegravir foi o primeiro INI licenciado em 2007, tanto para pacientes naïve de TARV quanto para os multiexperimentados. Atualmente além do RAL outros dois medicamentos desta classe estão licenciados, EVG e DTG. Embora, de acordo com *guidelines* internacionais os inibidores de integrase, sobretudo o RAL e DTG são indicados como primeira opção no tratamento de pacientes com HIV, no Brasil de acordo com o PCDT-MS publicado em 2013 o RAL é

considerado um medicamento de terceira linha e é reservado somente para o resgate terapêutico de pacientes multiexperimentados.

Os medicamentos que compõem a terceira linha de tratamento somente são recomendados para os pacientes que preencham os seguintes critérios: (i) falha virológica confirmada, (ii) teste de genotipagem realizado no máximo há 12 meses e (iii) resistência a pelo menos um antirretroviral de cada uma das três classes (ITRN, ITRNN e IP). Além disso, RAL está indicado nos casos em que somente o uso do darunavir/ritonavir (DRV/r) ou tipranavir/ritonavir (TPV/r) não permitam estruturar um esquema com potência para suprimir a replicação viral.

Em setembro de 2015 através de uma consulta pública a CONITEC (Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no SUS) deliberou a recomendação do DTG para a terceira linha de tratamento para infecção pelo HIV no âmbito do SUS (Sistema Único de Saúde). Poucos pacientes estão em uso deste medicamento e em geral esses indivíduos falharam a terapia com RAL. De acordo com o portal do Departamento de DST/aids e hepatites virais este medicamento deverá estar disponível no SUS em 2016 e incorporado como substituição ao RAL para jovens e adultos (a partir dos 12 anos), sempre que possível. Atualmente PCDT-MS está em revisão, pois a sua última atualização é de 2015. Uma nota oficial foi recentemente deliberada no início de 2017 e dispõe das recomendações para o uso de DTG, entre outros medicamentos.

A recomendação do uso dos inibidores de integrase para o tratamento de pacientes tanto naïve de TARV como os multiexperimentados foi devido a muitos estudos que comprovaram a eficiência e a eficácia desses medicamentos. Entretanto mutações associadas a resistência a essa classe já tem sido descritas. O RAL e o EVG tem uma barreira genética mais baixa em comparação ao DTG. Todavia, apesar de DTG possuir uma barreira genética maior e um perfil de resistência diferente de RAL e EVG, estudos mostram que mutações no códon 148 associadas a duas ou mais mutações secundárias podem influenciar na susceptibilidade a este medicamento.

Com o uso dos INIs na terapia antirretroviral, tornam-se necessários estudos sobre o perfil de mutações associados a essa classe de medicamentos para subsidiar a conduta clínica nos casos de falha terapêutica.

Neste estudo buscou-se inicialmente avaliar a diversidade do gene da integrase de amostras de sangue de pacientes vivendo com HIV/aids com ou sem exposição ao raltegravir.

Iniciou-se este trabalho com o objetivo de descrever a taxa de resistência primária a INIs em amostras de pacientes naïve ou tratados com TARV, mas sem exposição aos INIs. Poucos estudos no país evidenciam dados sobre polimorfismos no gene da integrase e prevalência de mutações primárias associadas à resistência aos INIs. Apesar de poucos casos descritos de resistência primária aos INIs, há de se ressaltar que com o uso generalizado destes medicamentos, o risco de resistência transmitida pode vir a ser um problema futuro. Neste estudo, não foi observado mutações principais associadas aos INIs em pacientes naïve ou tratados sem raltegravir entre amostras brasileiras o que corrobora com estudos disponíveis em nosso país (Passaes et. al, 2009; Arruda et. al., 2010; Mantovani et. al, 2012). Estes mesmos estudos, assim como nesta análise, têm observado uma alta proporção de polimorfismos associados a baixa resistência aos INIs já descrito na literatura.

Alguns destes polimorfismos observados neste estudo foram associados a subtipos específicos. Apesar da mutação V72I estar presente em sequências dos subtipos B e F tanto de amostras brasileiras quanto das depositadas em LANL, no subtipo C ela foi observada em todas as sequências brasileiras e em 54% das depositadas em LANL. Estes resultados corroboram com os de Passaes e colaboradores (2009) que descreveram esse polimorfismos como uma assinatura de amostras do subtipo C. Hackett e colaboradores (2005) descreveram a mutação V151I como associada a amostras do subtipo B e F. Entretanto, neste estudo esse polimorfismo foi observado apenas em sequências do subtipo B sendo mais

presente em amostras brasileiras (28% vs. 4%). Passaes e colaboradores (2009) também descreveram uma alta frequência desse polimorfismo entre amostras do subtipo B brasileiras de pacientes sem exposição a INIs. Esses resultados sugerem que V151I pode ser uma assinatura de amostras do subtipo B brasileiras. A mutação M154IL apesar de uma baixa frequência (7%) foi observada somente em amostra do subtipo B. Entretanto, Mantovani e colaboradores (2012) descreveram a mutação M154I como frequente entre amostras do subtipo não-B em uma frequência de 6.7%. Este mesmo estudo mostrou uma frequência maior da mutação V201I entre subtipos não-B, isto também pode ser verificado em nosso estudo, onde a frequência dessa mutação foi maior tanto entre amostras não-B brasileiras quanto as depositadas em LANL.

Apesar de nosso estudo, assim como os estudos descritos indicarem uma relação entre alguns polimorfismos naturais da integrase associados a resistência a determinados subtipos virais, outros estudos com um número maior de pacientes devem ser realizados a fim de se determinar qual seria o impacto desses polimorfismos no tratamento com os INIs em determinados subtipos virais.

As análises posteriores deste estudo incluíram apenas amostras de pacientes com exposição à terapia antirretroviral contendo raltegravir (TARV+RAL). A maioria dos pacientes no momento da inclusão apresentavam falha virológica a TARV+RAL. Também foi incluída uma amostragem de conveniência de pacientes em TARV+RAL com viremia suprimida (pacientes com sucesso virológico) a fim de predizer fatores que poderiam estar associados ao sucesso a TARV+RAL e de se detectar o momento da falha virológica entre esse grupo de indivíduos. Essa amostragem foi coletada aleatoriamente.

Entre os pacientes com falha virológica a TARV+RAL analisados neste estudo, foi observada uma alta proporção de mutações associadas à resistência aos INIs, inclusive mutações que comprometem a susceptibilidade ao dolutegravir. O presente estudo representa uma série de

casos de pacientes resistentes a INIs fora dos ensaios clínicos, utilizando TARV+RAL na América Latina. Apenas um estudo com uma pequena coorte de 10 pacientes com falência virológica a TARV+RAL documentou a presença das mutações Q148H+G140S em 2 indivíduos (Passaes et al., 2012). Embora essa população provavelmente não represente pacientes em falha ao tratamento inicial com RAL, eles representam casos que serão progressivamente encontrados em sítios clínicos de países de baixa e média renda, onde a primeira linha de antirretrovirais é composta principalmente por medicamentos de baixa barreira genética sendo os de segunda geração e os de terceira linha, geralmente reservado para terapia de resgate de pacientes multifalhados, em fase tardia da doença. Uma das principais características deste grupo de pacientes com opções limitadas de medicamentos para compor esquemas de resgate é a tentativa de usar medicamentos reciclados e que não são completamente ativos. No entanto, um recente estudo prospectivo observacional brasileiro relatou 83% de sucesso virológica em 92 pacientes multiexperimentados. Todos esses pacientes receberam um esquema baseado em darunavir (83% com total sensibilidade ao darunavir), incluindo 72% com RAL (Vidal et. al.,2013). Este resultado indica que resultados semelhantes aos relatados em países de alta renda são possíveis em países de baixa e média renda reforçando a importância da progressiva ampliação da segunda linha ARVs.

A maioria das características demográficas e clínicas dos pacientes incluídos neste estudo, não apresentou associação com a falha terapêutica a TARV+RAL, contudo um ganho na contagem de células TCD4<sup>+</sup> foi observado em ambos os grupos que evoluíram ou não para mutações de resistência a RAL.

Neste estudo, a maioria dos pacientes tinham menos de dois antirretrovirais ativos quando iniciaram o resgate com TARV+RAL, sem associação significativa com a seleção de mutação a RAL. No entanto, uma associação significativa foi identificada entre a presença de mutações associadas a RAL e um baixo GSS2. A baixa atividade de darunavir, um

inibidor de protease comumente usados em terapias de resgate também foi associado significativamente com a seleção de mutação para RAL. A determinação do GSS1 foi baseado em relatórios de testes de genotipagens prévios, registros médicos disponíveis, com dados de testes incompletos em alguns casos realizados em outros serviços. Entretanto, os dados obtidos para o GSS2 eram da mesma amostra utilizada para genotipagem da integrase, com uma correlação significativa de baixa resistência GSS com RAL. Um estudo de uma grande coorte multicêntrica francesa com 468 indivíduos em tratamento TARV+RAL mostrou que o número de novos fármacos associados a RAL foi associada independentemente com falência virológica (Marcelin et al., 2013). Estes resultados suportam que a composição do esquema de resgate deve sempre considerar não apenas o número de medicamentos, mas principalmente o seu perfil de resistência e a potência destes, especialmente do melhor inibidor de protease disponível.

Também foi verificada, uma longa duração acumulativa de viremia detectável (VL > 50 cópias/ml) para a maioria dos casos (média de 71 semanas). Esta é uma situação preocupante e poderia explicar pelo menos em parte, a presença de mutações para os INIs, sobretudo para DTG. A proporção de mutações associadas à resistência a RAL em ensaios clínicos randomizados é menor quando comparada aos dados aqui relatados, porém um estudo francês também relatou uma alta prevalência de resistência associada ao RAL com 43% (27/63) dos casos (Gallien et al., 2011). Neste mesmo estudo os autores relataram que o surgimento de mutações para INIs podem ocorrer durante episódios de baixa viremia em pacientes recebendo terapia com RAL (Gallien et al., 2011). Assim, a genotipagem na presença de viremia detectável para avaliar mutações relacionadas a resistência aos INIs se torna necessária, a fim de estruturar o esquema de resgate para futuras opções terapêuticas.

A maioria dos pacientes com falha terapêutica a TARV+RAL apresentava a mutação Q148H/R/K seguida de N155H. Durante a falha precoce ao RAL a mutação N155H emerge primeiro na maioria dos isolados,

sendo depois substituída por Q148H/R/K (Doyle et al., 2015). Uma das limitações deste estudo é que a amostra utilizada para a genotipagem da integrase não é a mais próxima possível do momento da falha virológica a TARV+RAL (visto que os pacientes permaneceram em média 75 semanas em viremia) não sendo possível detectar qual era o perfil mutacional quando o paciente apresentou aumento na viremia plasmática. No entanto, neste estudo, quando comparado os pacientes que carregavam vírus com Q148H/R/K e N155H não houve diferença entre o tempo de exposição ao RAL.

Uma alta proporção de pacientes com resistência intermediária a alta ao DTG (35%) foi observada neste estudo. Todos os pacientes com perda importante de susceptibilidade ao DTG tinham a substituição de aminoácido na posição 148 (glutamina, histidina, arginina ou lisina) e em sua maioria acompanhada por G140S/A. As amostras de pacientes que tinham G140S/A associada com Q148H/R/K tinham uma carga viral média mais elevada no momento da genotipagem para integrase em comparação com aqueles sem essas duas mutações. A mutação G140S/A geralmente surge quando Q148H/R/K é selecionado, e sua presença tem sido relacionada à melhora do *fitness viral* (Delelis et al., 2009), o que pode explicar este aumento da carga viral.

Também se observou uma forte associação entre a presença de mutações nos códons 140 e 138 e a resistência ao DTG. Dessa forma, nosso estudo revelou que o número de mutações secundárias está associada a uma pior resposta ao DTG, isto é uma predição suportada pelas observações clínicas do estudo VIKING-3, que mostraram uma resposta pior para pacientes com exposição prévia ao RAL e com duas ou mais mutações associadas a resistência aos INIs, incluindo a G140S/A, L74I e E138A/K (Castagna et al., 2014). Saladini e colaboradores (2012) documentaram a presença de variantes G140S+Q148H nas sequências obtidas a partir de pacientes utilizando RAL, embora com uma taxa inferior (17,5%) do que o encontrado neste estudo (35%).



Apesar deste estudo ter diferentes limitações, foi possível uma análise do uso de RAL nos últimos 6 anos no Brasil. Neste período foi observado que mesmo com uma taxa elevada de pacientes com susceptibilidade reduzida ao DTG, houve um declínio significativo da resistência intermediária a alta a esse medicamento e no tempo em falha virológica a TARV+RAL quando comparados os anos de 2009 a 2015. Talvez isso se deva a implantação dos testes de genotipagem para resistência da integrase sugerindo que o exame está sendo solicitado de forma mais precoce após a identificação da falha virológica, favorecendo um eventual resgate com DTG. Além disso, embora também sem significância estatística, a frequência da mutação Q148RHK teve um declínio enquanto as mutações Y143RHC e N155H permaneceram estabilizadas. Como dito anteriormente, a mutação Q148H/R/K emerge substituindo a N155H durante a falha precoce (Doyle et al., 2015), talvez a melhor estruturação para a solicitação do exame de resistência para integrase tenha influenciado na frequência desta via mutacional.

Em 16 pacientes com falha terapêutica a TARV+RAL (ou seja, com presença de mutações associadas a resistência aos INIs) deste estudo, foi possível uma análise de seguimento pós genotipagem da integrase. Entre esses pacientes, oito permaneceram com o mesmo tratamento, mesmo após um laudo com presença de mutações para RAL, isto é bastante preocupante tendo em vista que três desses pacientes tiveram o acúmulo de mais mutações. Entre os oito pacientes que não apresentavam mais as mutações de resistência, seis tinham informação de retirada do RAL do tratamento. Embora não tenhamos a amostra mais próxima ao momento em que variantes resistentes desaparecem e o vírus selvagem emerge, o tempo entre a primeira e a segunda genotipagem para integrase foi estatisticamente significativo entre os pacientes que continuaram resistentes ao raltegravir e aqueles que voltaram a ser sensíveis a este medicamento. A via mutacional mais frequente entre esses pacientes que voltaram a ser sensíveis aos INIs foi a 148+140. O estudo de Ferns e colaboradores evidenciou que a mutação Q148HRK desapareceu cerca de um mês após a retirada do

medicamento, o que segundo o autor reforça a ideia de que esta mutação sugere uma grande desvantagem para a replicação viral. Cepas virais que apresentam a N155 demoraram de cinco a sete meses para retornar ao tipo selvagem.

Apesar da amostragem deste estudo não ser grande, foi possível observar a presença da mutação F121Y em uma amostra (Cavalcanti et al, 2012). A seleção desta mutação associada a resistência aos INIs, somente havia sido descrita "*in vitro*". A mutação F121Y tem sido descrita como resistência cruzada entre os três medicamentos da classe dos INIs (Munir et al.,2015; Malet et al., 2014). Na primeira amostra disponível obtida após a introdução da TARV+RAL (semana 32) foi observada a substituição no códon 121 de fenilalanina para tirosina em todas as sequências (F121Y). Na emergência da F121Y observou-se a presença de L74I, T97A, Q137H e V151I. Mutações anteriormente descritas com F121Y "*in vitro*", como T124A e T125K (Menéndez-Arias, 2010) não foram encontrados nestas sequências. Nas semanas 32 e 40 após a introdução da TARV+RAL não houve alterações relevantes observadas. Entretanto, na semana 88, quando houve a reversão das posições F121Y, Q137H e V151I para o tipo selvagem, emergiram as mutações K42R, V72I, T97A, L234I, V258I e a mutação maior de resistência Y143R. A T97A é uma substituição polimórfica, selecionada por RAL e está relacionada com Y143R/C (Canducci et al., 2009). Embora não diretamente associada à resistência, esta mutação é sinérgica para Y143R, uma vez que é capaz de restaurar a capacidade de replicação do vírus, e espera-se que ela apareça após a fixação da Y143R (Delelis et al, 2010; Reigadas et al., 2011). Este resultado tem sido incluído nas referências do IAS e no Stanford Database.

Outro dado interessante a ser discutido no presente estudo, são os possíveis fatores que possam ter influenciado o sucesso terapêutico com TARV+RAL. Poucos são os estudos que evidenciam esses fatores entre pacientes pertencentes a sítios clínicos reais. Neste estudo, sugerimos que que a adesão e a viremia entre as semanas 12-24 estão associadas de forma independente à supressão viral. Apesar de não ser significativa a

diferença os dados também sugerem que ter darunavir/ritonavir totalmente ativo compondo a TARV+RAL pode ser um fator benéfico para a terapia. Alguns estudos, não brasileiros têm evidenciado a aderência ao tratamento e a potência dos antirretrovirais que compõe o esquema com RAL como sendo fatores importantes para o sucesso terapêutico. O estudo de Boyd e colaboradores (2015) avaliou pacientes em terapia antirretroviral de 2010 a 2013, incluindo aqueles em uso de RAL e demonstrou que uma baixa adesão foi o fator determinante para a falha terapêutica, e sugere que um investimento na otimização da adesão ao invés da implementação de testes de resistência aos medicamentos pode ser aconselhável. Outro estudo mostrou que o número de novos antirretrovirais, como darunavir, etravirina ou maraviroc compondo o esquema terapêutico com RAL pode influenciar a uma melhor resposta durante essa terapia (Marcelin et al., 2013). A adesão e um alto valor de GSS também foi associada a uma resposta melhor ao tratamento com RAL no estudo de Rusconi e colaboradores (2012). No presente estudo os pacientes com sucesso virológico foram selecionados de forma aleatória pelo médico responsável e apesar dos dados de quantificação de carga viral, contagem de células TCD4+, dados de GSS antes da TARV+RAL e demográficos terem sido obtidos em prontuários médicos e bancos de dados SIGENO ou SISCEL, e a adesão ser uma variável difícil de ser definida, nossos resultados corroboraram com os estudos disponíveis na literatura. Assim, uma boa aderência a terapia, antirretrovirais ativos para compor o esquema com RAL e a supressão virológica nas primeiras semanas de inclusão da medicação devem ser pontos importantes a serem levados em consideração pelo profissional responsável pelo paciente.

Apesar deste estudo ter limitações como o pequeno número de pacientes analisados, visto que RAL somente é administrado para terapia de resgate, o fato de não ter a padronização e regularidade de coletas e análises quando comparados aos estudos clínicos e os dados serem extraídos de prontuários médicos que por sua vez podem não ser preenchidos corretamente, este estudo trata-se de um dos primeiros que

refletem a realidade de uma coorte de pacientes em uso de terapia contendo raltegravir no Brasil, antes deste apenas um havia sido publicado (Passaes et al., 2012) com uma quantidade de pacientes muito menor quando comparado a este estudo.

Os resultados evidenciam o perfil de mutações associadas a resistência aos INIs, além de apresentar que o acúmulo durante uma falha virológica podem comprometer o eventual resgate com dolutegravir, uma opção de medicamento bastante importante para esses pacientes multifalhados.

Neste contexto, o conjunto de resultados descritos nesse estudo, agregam importantes informações para o uso clínico sobre a diversidade genética da integrase em pacientes com ou sem exposição a INIs, sobre o perfil de resistência aos INIs e sobre fatores que sugerem uma melhor resposta ao tratamento com TARV+RAL.

## 8. Conclusões

Resistência transmitida não foi observada entre pacientes naïve para INIs, entretanto alguns polimorfismos parecem estar associadas a certos subtipos virais.

Os pacientes com exposição a TAR+RAL apresentaram uma alta proporção de falha virológica e terapêutica a este esquema.

Foi observada a seleção da mutação F121Y associada a resistência aos INIs que havia sido observada anteriormente somente *“in vitro”*.

Houve um declínio significativo da resistência intermediária a alta ao DTG e no tempo em falha virológica a TARV+RAL quando comparados os anos de 2009 a 2015.

A adesão e a viremia entre as semanas 12-24 parecem estar associadas de forma independente à supressão viral. Além, disso ter um IP completamente ativo, como o darunavir/r na TARV+RAL pode favorecer a supressão viral.

Uma proporção importante de pacientes com resistência intermediária ou alta ao DTG em falha a TARV+RAL foram observados neste estudo. Além disso, alterações na viremia durante a falha virológica indicam a evolução da resistência ao RAL e podem prever o aparecimento de mutações secundárias que são associadas com uma diminuição da susceptibilidade ao DTG.

Como opções de tratamento para pacientes com doença avançada são muito limitada, é concebível que a interrupção imediata de RAL mediante identificação de falência virológica pode favorecer a terapia de resgate com DTG, mantendo o restante da combinação, porém mais estudos são necessários para dar melhor suporte a esta recomendação.

Neste estudo pôde-se avaliar a resposta a TARV+RAL em uma situação realista, que inclui as condições inerentes de nossos serviços de saúde, favorecendo a produção de informações e recomendações de uso prático.

## 9. Referências bibliográficas

Andries, K.; Azijn, H.; Thielemans, T.; Ludovici, D.; Kukla, M.; Heeres, J.; Janssen, P.; De Corte, B.; Vingerhoets, J.; Pauwels, R.; de Béthune, M.P.. TMC125, a novel next-generation nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor active against nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor-resistant human immunodeficiency virus type 1. **Antimicrob Agents Chemother.** 2004; v.48, p.4680-6.

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):105-7

Azijn, H.; Tirry, I.; Vingerhoets, J.; de Béthune, M.P.; Kraus, G., Boven, K.; Jochmans, D.;Van Craenenbroeck, E.; Picchio, G.;Rimsky, L.T..TMC278, a next-generation nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor (NNRTI), active against wild-type and NNRTI-resistant HIV-1. **Antimicrob Agents Chemother.** 2010; v.54, p. 718-27.

Bachelor, L.T.; Anton, E.D.; Kudish, P.; Baker, D.; Bunville, J.; Krakowski, K.; Bolling, L.; Aujay, M.; Wang, X.V.; Ellis, D.; Becker, M.F.; Lasut, A.L.; George, H.J.; Spalding, D.R.; Hollis, G.; Abremski, K.. Human immunodeficiency virus type 1 mutations selected in patients failing efavirenz combination therapy. **Antimicrob Agents Chemother.** 2000; v.44, p. 2475-84.

Bhattacharya, S.; Osman, H. Novel targets for anti-retroviral therapy. **J. of Infection.** 2009; v.59, p. 377-386.

Benarous R., Le Rouzic E., Bel N., Velden Y. V., Bonnard D., Das A., Amadori C. , Zamborlini A.,Emiliani S.,Berkhout B. Late Stage Integrase-

LEDGF Inhibitors Mode of Action and Acquisition of Resistance. CROI 2015  
Poster 540

Boyd, S.D.; Maldarelli, F.; Sereti, I.; Ouedraogo, G.L.; Rehm, C.A.; Boltz, V.; Shoemaker, D.; Pau, A.K. Transmitted raltegravir resistance in an HIV-1 CRF\_AG-infected patient. **Antivir Ther.** 2011; v.16,p.257-6.

Boyd MA, Moore CL, Molina JM, Wood R, Madero JS, Wolff M, Ruxrungtham K, Losso M, Renjifo B, Teppler H, Kelleher AD, Amin J, Emery S, Cooper DA; SECOND-LINE study group. Baseline HIV-1 resistance, virological outcomes, and emergent resistance in the SECOND-LINE trial: an exploratory analysis. **Lancet HIV.** 2015; 2(2):e42-51.

Busschots K, Voet A, De Maeyer M, Rain Jc, Emiliani S, Benarous R, Desender L, Debyser Z, Christ F. Identification of the LEDGF/p75 binding site in HIV-1 integrase. **J Mol Biol.** 2007; v.365, p. 1480-92.

Cahn, P.; Villacian, J.; Lazzani, A.; Katlama, C.; Grinsztejn, B.; Arasteh, K.; López, P.; Clumeck, N.; Gerstoft, J.; Stavrianeas, N.; Moreno, S.; Antunes, F.; Neubacher, D.; Mayers, D. Ritonavir-Boosted Tipranavir demonstrates superior efficacy to Ritonavir-Boosted protease inhibitors in treatment experienced HIV infected patients: 24 week results of the RESIST-2 Trial. **Clin. Infect. Diseases.** 2006; v.43, p. 1347-1356.

Cahn P., Pozniak A.L., Mingrone H., Shuldyakov A., Brites C., Andrade-Villanueva J.F., Richmond G., Buendia C.B., Fourie J., Ramgopal M, Hagins D, Felizarta F, Madruga J, Reuter T, Newman T, Small CB, Lombaard J, Grinsztejn B, Dorey D, Underwood M, Griffith S, Min S; extended SAILING Study Team. Dolutegravir versus raltegravir in antiretroviral-experienced, integrase-inhibitor-naïve adults with HIV: week 48

results from the randomised, double-blind, non-inferiority SAILING study. **Lancet**. 2013; 24;382(9893):700-8.

Canducci, F., Sampaolo, M., Marinozzi, M.C., Boeri, E., Spagnuolo, V., Galli, A., Castagna, A., Lazzarin, A., Clementi, M., Gianotti, N., Dynamic patterns of human immunodeficiency virus type 1 Integrase gene evolution in patients failing raltegravir-based salvage therapies. **AIDS**. 2009; 23, 455–460.

Castagna A., Maggiolo F., Penco G., Wright D., Mills A., Grossberg R., Molina J.M., Chas J., Durant J., Moreno S., Doroana M., Ait-Khaled M., Huang J., Min S., Song I., Vavro C., Nichols G., Yeo J.M.; VIKING-3 Study Group. Dolutegravir in antiretroviral-experienced patients with raltegravir- and/or elvitegravir-resistant HIV-1: 24-week results of the phase III VIKING-3 study. **J Infect Dis**. 2014; 1;210(3):354-62.

Cavalcanti J de S, Minhoto Lança A, de Paula Ferreira JL, da Eira M, de Souza Dantas DS, de Macedo Brígido LF. In-vivo selection of the mutation F121Y in a patient failing raltegravir containing salvage regimen. **Antiviral Res**. 2012 ;95(1):9-11

Cavalcanti J de S, de Paula Ferreira JL, Vidal JE, de Souza Guimarães PM, Moreira DH, de Macedo Brigido LF; São Paulo Salvage Workgroup. HIV-1-infected patients with advanced disease failing a raltegravir-containing salvage regimen in São Paulo, Brazil. **Int J Antimicrob Agents**. 2014 ;43(3):287-91

Cavalcanti Jde S, Ferreira JL, Guimarães PM, Vidal JE, Brigido LF. High frequency of dolutegravir resistance in patients failing a raltegravir-containing salvage regimen. **J Antimicrob Chemother**. 2015;70(3):926-9



Ceccherini-Silberstein F.; Malet I.; D'arrigo R.; Antinori A.; Marcelin A.; Perno C.F. characterization and structural analysis of HIV-1 integrase conservation. **AIDS**. 2009; v.11, p. 17-29.

Ceccherini-Silberstein, F.; Malet, I.; Fabeni, L.; Dimonte, S.; Svicher, V.; D'Arrigo, R.; Artese, A.; Costa, G.; Bono, S.; Alcaro, S.; Monforte, A.; Katlama, C.; Calvez, V.; Antinori, A.; Marcelin, A.G.; Perno, C.F.. Specific HIV-1 integrase polymorphisms change their prevalence in untreated versus antiretroviral-treated HIV-1-infected patients, all naïve to integrase inhibitors. **J Antimicrob Chemother**. 2010; v.65, p.2305-18.

Charpentier C.; Karmockine M.; Laureillard D.; Tisserand P.; Belec L.; Weiss, L.; Si-Mohamed, A.; Picketti, C. Drug resistance profiles for the HIV Integrase gene in patients failing Raltegravir salvage therapy. **HIV Med**. 2008; v.9, p. 765-770.

Chiu, T.K.; Davies, D. R. Structure and function of HIV-1 Integrase. **Cur. Top. Med. Chem**. 2004; v.4, p.965-977.

Christ, F.; Shaw, S.; Demeulemeeste, J.; Desimmie, B. A.; Marchand, A.; Butler, S.; Smets, W.; Chaltin, P; Westby, M.; Debyser, Z; Pickford, C.. Small molecule inhibitors of the LEDGF/p75 binding site of integrase (LEDGINs) block HIV replication and modulate integrase multimerization. **Antimicrob Agents Chemother**. 2012; v.56, p.4365-74.

Clavel, FD.; Guetard D.; Brun-Vezinet, F.; Chamaret, S.; Rey, M.A.; Santos Ferreira, O.; Laurent, AG.; Dauguet, C.; Katlama, C.; Rouzioux, C.; Klatzmann, D.; Champalimaud, JL.; Montagnier, L. Isolation of a new retrovirus from West Africa patients with AIDS. **Science**, v.233, p. 343-6, 1986.

Clavel F.; Hance A.J.; HIV Drug Resistance. **N. Engl. J. Med.** 2004; v.350p.1023-1035.

Clotet B., Feinberg J., van Lunzen J., Khuong-Josses M.A., Antinori A., Dumitru I., Pokrovskiy V., Fehr J., Ortiz R., Saag M., Harris J., Brennan C., Fujiwara T., Min S.; ING114915 Study Team. Once-daily dolutegravir versus darunavir plus ritonavir in antiretroviral-naïve adults with HIV-1 infection (FLAMINGO): 48 week results from the randomised open-label phase 3b study. **Lancet.** 2014; 28;383 (9936):2222-31.

.

Clumeck N, Molina JM, Henry K, Gathe J, Rockstroh JK, DeJesus E, Wei X, White K, Fordyce MW, Rhee MS, Szwarcberg J; GS-236-0103 Study Team A randomized, double-blind comparison of single-tablet regimen elvitegravir/cobicistat/emtricitabine/tenofovir DF vs ritonavir-boosted atazanavir plus emtricitabine/tenofovir DF for initial treatment of HIV-1 infection: analysis of week 144 results. **J Acquir Immune Defic Syndr.** 2014; 1;65(3):e121-4

.

Dayam R.; Al-Mawsawi, L. Q.; Neamati, N. HIV-1 Integrase inhibitors an emerging clinical reality. **Drugs R. D.** 2007; v.8, p. 155-168.

Delaugerre, C.; Rohban, R.; Simon, A.; Mouroux, M.; Tricot, C.; Agher, R.; Huraux, J.M.; Katlama, C.; Calvez, V..Resistance profile and cross-resistance of HIV-1 among patients failing a non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor-containing regimen. **J Med Virol.** 2001; v.65, p.445-448.

Delelis O, Malet I, Na L, Tchertanov L, Calvez V, Marcelin AG, Subra F, Deprez E, Mouscadet JF. 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).

Delelis, O., Thierry, S., Subra, F., Simon, F., Malet, I., Alloui, C., Sayon, S., Calvez, V., Deprez, E., Marcelin, A.G., Tchertanov, L., Mouscadet, J.F., Impact of Y143 HIV-1 Integrase mutations on resistance to raltegravir in vitro and in vivo. **Antimicrob. Agents Chemother.** 2010; 54, 491–501.

DeJesus, E.; Rockstroh, J.K.; Henry, K.; Molina, J.M.; Gathe, J.; Ramanathan, S.; Wei, X.; Yale, K.; Szwarcberg, J.; White, K.; Cheng, A.K.; Kearney, B,P, and GS-236-0103 Study Team. Co-formulated elvitegravir, cobicistat, emtricitabine, and tenofovir disoproxil fumarate versus ritonavir-boosted atazanavir plus co-formulated emtricitabine and tenofovir disoproxil fumarate for initial treatment of HIV-1 infection: a randomised, double-blind, phase 3, non-inferiority trial. **Lancet.** 2012; v.30, p.2429-38.

Di Marzo Veronese, F.; De Vico, A.L.; Copeland, T.D. Corozland, S.; Gallo, R.E.; Sangsdharab, M.G. Characterization of gp41 as the transmembrane protein coded by the HTLV-III/LAV envelope gene. **Science**, 1985; v.229, p. 1402-5.

Doyle T, Dunn DT, Ceccherini-Silberstein F, De Mendoza C, Garcia F, Smit E, Fearnhill E, Marcelin AG, Martinez-Picado J, Kaiser R, Geretti AM; CORONET Study Group. Integrase inhibitor (INI) genotypic resistance in treatment-naïve and raltegravir-experienced patients infected with diverse HIV-1 clades. *J Antimicrob Chemother*, 2015; 243. [Epub ahead of print]

Elion R, Cohen C, Gathe J, Shalit P, Hawkins T, Liu HC, Mathias AA, Chuck SL, Kearney BP, Warren DR; GS-US-216-0105 Study Team. Phase 2 study of cobicistat versus ritonavir each with once-daily atazanavir and fixed-dose emtricitabine/tenofovir df in the initial treatment of HIV infection. *AIDS*. 2011; 24;25(15):1881-6.

Engelman A.; Craigie, R. Identification of conserved amino acid residues critical for HIV-1 Integrase function in vitro. **J. Virol.** 1992; v.66, p.6361-9.

Eron J, Kumar P, Lazzarin A, et al. DTG in subjects with HIV exhibiting RAL resistance: functional monotherapy results of VIKING study cohort II. Abstract 151LB, 18th CROI 2011, Boston.

Eron JJ, Clotet B, Durant J, Katlama C, Kumar P, Lazzarin A, Poizot-Martin I, Richmond G, Soriano V, Ait-Khaled M, Fujiwara T, Huang J, Min S, Vavro C, Yeo J; VIKING Study Group. Safety and efficacy of dolutegravir in treatment-experienced subjects with raltegravir-resistant HIV type 1 infection: 24-week results of the VIKING Study. **J Infect Dis.** 2013; 1;207(5):740-8.

Espeseth A. S., Felock P., Wolfe A., Marc Witmer, Grobler J., Anthony N, Egbertson M., Melamed J. Y., Young S., Hamill T., Cole J., Hazuda D.J. HIV-1 integrase inhibitors that compete with the target DNA substrate define a unique strand transfer conformation for integrase. **Biochemistry.** 2010; 10;97: 11244–11249

Ferns, R.B.; Kirk, S.; Bennett, J.; Cook, P.M.; Williams, I.; Edwards. S.; Pillay D.. The dynamics of appearance and disappearance of HIV-1 integrase mutations during and after withdrawal of raltegravir therapy. **AIDS.** 2009; v.23, p.2159-64.

Fischl MA, Richman DD, Grieco MH, Gottlieb MS, Volberding PA, Laskin OL, Leedom JM, Groopman JE, Mildvan D, Schooley RT, et al The efficacy of azidothymidine (AZT) in the treatment of patients with AIDS and AIDS-related complex. A double-blind, placebo-controlled trial. **N Engl J Med.** 1987; 23;317(4):185-91.

Gallien S, Delaugerre C, Charreau I, Braun J, Boulet T, Barrail-Tran A, de Castro N, Molina JM, Kuritzkes DR. Emerging integrase inhibitor resistance mutations in raltegravir-treated HIV-1-infected patients with low-level viremia. **AIDS**. 2011;13;25(5):665-9

Gelderblom, H.R.; Ozel, M.; Pauli, G. Morphogenesis and morphology of HIV. Structure-function relations. **Arch. Virol.**, 1989; v106, p. 1-13.

Hackett, J.J, Swanson P., Harris B., Holzmayer V., Yamaguchi J., Bodelle P., Brennan C., Schochetman G., Devare S. Comprehensive evaluation of HIV-1 integrase gene diversity in group m, n, and o viruses. **Conf Retr. Opportunistic Infect** 12:abstract n° 366, Feb 22-25 2005.

Hazuda D.J.; Miller M.D.; Nguyen B.Y.; Zhao J. For The P005 Study Team. Resistance to the hiv-integrase inhibitor raltegravir: analysis of protocol 005, a phase II study in patients with triple-class resistant hiv-1 infection. **Antivir Ther.**, 16th International HIV Drug Resistance Workshop: Basics Principles & Clinical Implications 12:S10 (abstract no. 8), 2007

Hu Z. & Kuritzkes D.R. Effect of raltegravir resistance mutations in HIV-1 integrase on viral fitness. **J Acquir Immune Defic Syndr**. 2010; v.55(2), p.148-55.

Janssens, W.; Heindrickx, L.; Fransen, K.; Motte, J.; Peeters, M.; Nkengasong, J.N.; Ndunbe, P.M.; Delaporte, E.; Perret, J.L.; Atende, C.; Piot, P.; Van der Groen, G. Genetic and phylogenetic analysis of env subtypes G and H in central Africa. **ARHR**, v.10, p. 877-9, 1994.

Klatzmann, D.; Champagne, E.; Cjamaret, S. et al. T-lymphocyte T-4 molecule behaves as the receptor for human retroviral LAV. **Nature**. 1984; v.312, p. 767-8.

Kobayashi, M.; Yoshinaga, T.; Seki, T. Et Al. In vitro virology of S/GSK1349572, a nextgeneration HIV integrase inhibitor. **Antimicrob Agents Chemother.** 2011; v. 55; p. 813–821.

Lalezari J, Sloan L, Dejesus E. , Hawkins T., Mccurdy L., Song I., Borland J., Stroder R., Chen S., Lou Y., Underwood M., Fujiwara T., Piscitelli S. , Min S., ING111521 Investigators Potent antiviral activity of S/GSK1349572, a next generation integrase inhibitor (INI), in INI-naïve HIV-1-infected patients . Abstract 5th IAS Conference on HIV Pathogenesis, Treatment and Prevention 2009, Cape Town.

Laethem, K.V; Schrooten, Y;Covens, K; Dekeersmaeker, N; De Munter, P; Wijngaerden, E.V; Ranst, M.V; Vandamme, A. Agenotypic assay for the amplification and sequencing of Integrase from diverse HIV-1 group M subtypes. **J. Virol. Met.**2008; v.153, p. 176-181.

Lataillade M., Chiarella J., Kozal, M. Natural polymorphism of the HIV-1 Integrase gene and mutations associated with Integrase inhibitors. **Ant. Ther.** 2007; v12, p. 563-570.

Le Rouzic E., Bonnard D., Chasset S., Bruneau J.M., Chevreuil F., Le Strat F., Nguyen J., Beauvoir R., Amadori C., Brias J., Vomscheid S., Eiler S., Lévy N., Delelis O., Deprez E., Saïb A., Zamborlini A., Emiliani S., Ruff M., Ledoussal B., Moreau F., Benarous R. Dual inhibition of HIV-1 replication by integrase-LEDGF allosteric inhibitors is predominant at the post-integration stage. **Retrovirology.**, 2013; 21;10:144.

Lewinson, W. & Jawetz, E. **Microbiologia Médica e Imunologia.** 7<sup>o</sup>ed. Porto Alegre. Artmed. 2005. Cap.45, p 295-303.

Li Y., Xuan S., Feng Y., Yan A. Targeting HIV integrase with strand transfer inhibitors. **Drug Discov Today.** 2015; 20(4):435-49.

Llibre, J.M.; Bonjoch, A.; Iribarren, J.; Galindo, M.J.; Negredo, E.; Domingo, P.; Pérez-Alvarez, N.; Martínez-Picado, J.; Schapiro, J.; Clotet, B. and HIV Conference Call Study Group. Targeting only reverse transcriptase with zidovudine/lamivudine/abacavir plus tenofovir in HIV-1-infected patients with multidrug-resistant virus: a multicentre pilot study. **HIV Med.** 2008; v.9,p.508-13.

Louwagie, J.; Janssens, W.; Mascola, J.; Heyndrickx, L.; Hegerich, P.; van der Groen, G.; McCutchan, F.E.; Burke, D.S. Genetic diversity of the envelope glycoprotein from Human Immunodeficiency virus type 1 isolates of African origin. **J. Virol.**, v.69, p. 263-71, 1995.

Low, A; Prada, N; Topper, M; Vaida, F; Castor, D; Mohri, H; Hazuda, D; Muesing, M; Markowitz, M. Natural Polymorphisms of HIV-1 Integrase and Inherent Susceptibilities to a Panel of Integrase Inhibitors. **Ant. Agents and Chem.**, 2009; v.1, p.397-99.

MacArthur RD, Novak RM. Reviews of anti-infective agents: maraviroc: the first of a new class of antiretroviral agents. **Clin Infect Dis.** 2008; 15;47(2):236-41.

Malet I.; Delelis O.; Valantin M.A.; Montes B.; Soulie C.; Wirden M.; Tchertanov L.; Peytavin G.; Reynes J.; Mouscadet J. F.; Katlama C.; Calvez V.; Marcelin A. G. mutations associated with failures of Raltegravir treatment affect integrase sensitivity to the inhibitor in vitro. **Ant. Agents and Chem.** 2008; v.52, n°4, p. 1351-1358.

Malet I., Gimferrer Arriaga L., Artese A., Costa G., Parrotta L., Alcaro S., Delelis O., Tmeizeh A., Katlama C., Valantin M.A., Ceccherini-Silberstein F., Calvez V., Marcelin A.G. New raltegravir resistance pathways induce broad cross-resistance to all currently used integrase inhibitors. **J Antimicrob Chemother.** 2014; 69(8):2118-22.

Mantovani NP, Azevedo RG, Rabelato JT, Sanabani S, Diaz RS, Komninakis SV. Analysis of transmitted resistance to raltegravir and selective pressure among HIV-1-infected patients on a failing HAART in Sao Paulo, Brazil. **J Clin Microbiol.** 2012 50(6):2122-5.

Marcelin AG, Delaugerre C, Beaudoux C, Descamps D, Morand-Joubert L, Amiel C, Schneider V, Ferre V, Izopet J, Si-Mohamed A, Maillard A, Henquell C, Desbois D, Lazrek M, Signori-Schmuck A, Rogez S, Yerly S, Trabaud MA, Plantier JC, Fourati S, Houssaini A, Masquelier B, Calvez V, Flandre P; ANRS AC11 Resistance Group. A cohort study of treatment-experienced HIV-1-infected patients treated with raltegravir: factors associated with virological response and mutations selected at failure. *Int J Antimicrob Agents.* 2013;42(1):42-7

Marchand C, Maddali K, Métifiot M, Pommier Y. HIV-1 IN inhibitors: 2010 update and perspectives. **Curr Top Med Chem.** 2009;9(11):1016-37.

Margolis D.A. & Boffito M. Long-acting antiviral agents for HIV treatment. **Curr Opin HIV AIDS.** 2015; 10(4):246-52. 2015

Markowitz , M.; Targeting Integrase: Mechanisms of action and mechanisms of resistance to Integrase inhibitors. **Clin. Care Options**, 2008.

McBurney SP, Ross TM. Viral Sequence diversity: challenges for AIDS vaccine designs. **Expert Review of Vaccines.**2008; 7: 1405-17.

Mbisa J.L., Martin S.A., Cane P.A. Patterns of resistance development with integrase inhibitors in HIV. **Infect Drug Resist.** 2011; 4:65-76.

McColl , D; Fransen, S.; Gupta, S.; Resistance and cross-resistance to first generation Integrase inhibitors: insights from a phase 2 study of Elvitegravir



(GS-9137). **Antivir. Ther.** 16th International HIV Drug Resistance Workshop: Basics Principles & Clinical Implications 12:S11 (abstract no. 9), 2007.

McCune, J.M.; Rabin, L.B.; Feinberg, M.B.; Liernerman, M.; Kosek, J.C.; Reyes, G.R.; Weissman, I. Endoproteolytic cleavage of gp 160 is required for the activation of Human Immunodeficiency virus. **Cell.**, 1988;v.53, p. 55-67.

McDougal, J.S.; Mawle, A.; Cort, S.F.; Nicholson, K.A.; Cross, D. G.; Scheppeler- Campebell. J.A.; Hicks, D.; Sligh, J. Cellular tropism of human retrovirus HTLV III/LAV I role of T cell activation and expression of T4 antigen. **Imm.**, 1985; v.135, 3151-64.

Melby, T.; Sista, P.; Demasi, R. Kirkland, T.; Roberts, N.; Salgo, M.; Snyder, G.H.; Cammack, N.; Matthews, T.J.; Greenberg, M.L. Characterization of Envelope Glycoprotein gp41 Genotype and Phenotypic Susceptibility to Enfuvirtide at baseline and on Treatment in the Phase III Clinical Trials TORO-1 and TORO-2. **AIDS Res. and Human Retr.** 2006; v.22, p. 375-385.

Menéndez-Arias, L., 2010. Molecular basis of human immunodeficiency virus drug resistance. An update. **Antiviral Res.** 85, 210–231.

Mesplède T., Quashie P,K., Osman N., Han Y., Singhroy D.N., Lie Y., Petropoulos C.J., Huang W,, Wainberg M.A. Viral fitness cost prevents HIV-1 from evading dolutegravir drug pressure. **Retrovirology.** 2013; 22;10:22.

Métifiot M, Johnson B, Smith S, Zhao XZ, Marchand C, Burke T, Hughes S, Pommier Y. MK-0536 inhibits HIV-1 integrases resistant to raltegravir. **Antimicrob Agents Chemother.** 201; 55(11):5127-33.

Ministério da Saúde/SVS/PN-DSTAIDS. **Recomendações para a terapia antiretroviral em adultos e adolescentes infectados pelo HIV-1 2007/2008**. Brasília, 2008.

Molina JM, Lamarca A, Andrade-Villanueva J, Clotet B, Clumeck N, Liu YP, Zhong L, Margot N, Cheng AK, Chuck SL; Study 145 Team. 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.

Muesing, M.A.; Smith, D.H.; Cabradilla, C.D.; Benton, C.V.; Lasky, L.A.; Capon, D.J. Nucleic acid structure and expression of the human AIDS/lymphadenopathy retrovirus. **Nature**, 1985; v. 313, p. 450-8.

Munir S., Thierry E., Malet I., Subra F., Calvez V., Marcelin A.G., Deprez E., Delelis O..G118R and F121Y mutations identified in patients failing raltegravir treatment confer dolutegravir resistance. **J Antimicrob Chemother**. 2015; 70(3):739-49.

Myers G.; Macinnes, K.; Lorber, B. The emergence of simian/Human Immunodeficiency viruses. **ARHR**, v.8, p. 373-86, 1992.

Nachman S, Samson P, Frenkel L, et al. 24 week safety and efficacy from IMPAACT P1066: A phase I/II, multicenter, open-label, noncomparative study to evaluate raltegravir (RAL) in HIV-1 infected youth. Paper presented at: 49th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC); September 12-15, 2009; San Francisco, CA. Abstract H-924a.

Nachman S, Samson P, Acosta E, et al. Pharmacokinetic (PK), safety, and efficacy data on cohort IIA; youth aged 6 to 11 years from IMPAACT P1066:

A phase I/II study to evaluate raltegravir (RAL) in HIV-1 infected youth. Abstract 873, 17th CROI 2010 , San Francisco, CA..

Nachman S., E Acosta, N Zheng, H Teppler, B Homony, T Fenton, E Handelsman, C Worrell, B Graham, A Wiznia, and P1066 Study Team Interim Results from IMPAACT P1066: RAL Oral Chewable Tablet Formulation for 2- to 5-Year-olds. Abstract 715, 18th CROI 2011, Boston.

Niubo J, Li W, Henry K, Erice A. Recovery and Analysis of Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV) RNA Sequences from Plasma Samples with Low HIV RNA Levels. **Journal Of Clinical Microbiology**. 2000; 38: 309–312.

OU, S.H. I.; Gaynor, R.B. Intracellular factors involved in gene expression of human retroviruses. In: LEVY, J. A. (Ed.). **The Retr..** New York: Plenum Press, v.4, p. 97-187, 1995.

Panganiban, A.; Fiore, D. Ordered interstand and intrasand DNA transfer during reverse transcription. **Science**, 1988; v.241, p.1064-9.

Passaes CB, Guimarães ML, Fernandez SL, Lorete Rdos 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; 1;51(1):7-12

Peterlin, B.M. Molecular biology of HIV. In. J. A Levy (ED.).**The Retr.**, New York: Plenum Press, 1995; v.4, p.185-238.

Plantier J.C., Leoz M., Dickerson J.E., De Oliveira F., Cordonnier F., Lemée V., Damond F., Robertson D.L., Simon F.. A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. **Nat Med**. 2009; 15(8):871-2.

Pommier Y, Johnson A, Marchand C. Integrase inhibitors to treat HIV/AIDS. **Nat. Rev. Drug. Discov.** 2005; v4, p. 236-48.

Poveda E, Briz V, Quiñones-Mateu M, Soriano V. HIV tropism: diagnostic tools and implications for disease progression and treatment with entry inhibitors. **AIDS**, 2006; 20:1359-1367.

Raffi F., Rachlis A., Stellbrink H.J., Hardy W.D., Torti C., Orkin C., Bloch M., Podzamczar D., Pokrovsky V., Pulido F., Almond S., Margolis D., Brennan C., Min S., SPRING-2 Study Group. Once-daily dolutegravir versus raltegravir in antiretroviral-naïve adults with HIV-1 infection: 48 week results from the randomised, double-blind, non-inferiority SPRING-2 study. **Lancet.** 2013a; 2;381(9868):735-4.

Raffi F., Jaeger H., Quiros-Roldan E., Albrecht H., Belonosova E., Gatell J.M., Baril J.G., Domingo P., Brennan C., Almond S., Min S., extended SPRING-2 Study Group. Once-daily dolutegravir versus twice-daily raltegravir in antiretroviral-naïve adults with HIV-1 infection (SPRING-2 study): 96 week results from a randomised, double-blind, non-inferiority trial. **Lancet Infect Dis.** 2013b; 13(11):927-35.

Reigadas, S.; Masquelier, B.; Calmels, C.; Laguerre, M.; Lazaro, E.; Vandenhende, M.; Neau, D.; Fleury, H.; Andréola, M.L. Structure-analysis of the HIV-1 integrase Y143C/R raltegravir resistance mutation in association with the secondary mutation T97A. **Antimicrob Agents Chemother.** 2011; v.55, p. 3187-94.

Rhee S.Y.; Liu T. F.; Kiuchi M.; Zioni R.; Gifford R. J.; Holmes S.P.; Shafer R.W Natural variation of HIV-1 group M integrase: implications for a new class of antiretroviral inhibitors. **Retr.** 2008;5:74.

Rodrigues, R.; Vazquez, C.M.P.; Colares, J.K; Custodio, R. M.; Bonásser Filho, F.; Souza, L. R.; Gianna, M.C.; Marques, C.C.A.; Brígido, L. F. M. Antiretroviral resistance mutations in human immunodeficiency virus type 1 infected patients enrolled in genotype testing at the Central Public Health Laboratory, São Paulo, Brazil: preliminary results. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 2005; v.100, p.97-102.

Rusconi S, Vitiello P, Adorni F, Bruzzone B, De Luca A, Micheli V, Meraviglia P, Maserati R, Di Pietro M, Colao G, Penco G, Di Biagio A, Punzi G, Monno L, Zazzi M; Antiretroviral Resistance Cohort Analysis Collaborative Group. Factors associated with virological success with raltegravir-containing regimens and prevalence of raltegravir-resistance-associated mutations at failure in the ARCA database. **Clin Microbiol Infect.** 2013;19(10):936-42

Saladini F, Meini G, Bianco C, Monno L, Punzi G, Pecorari M, Borghi V, Di Pietro M, Filice G, Gismondo MR, Micheli V, Penco G, Carli T, De Luca A, Zazzi M; ARCA Collaborative Group. Prevalence of HIV-1 integrase mutations related to resistance to dolutegravir in raltegravir naïve and pretreated patients. **Clin Microbiol Infect.** 2012 18(10):E428-30.

Santos, N.S.O.; Romanos M.T.V; Wigg M.D. **Introdução à Virologia Humana.** 2ª Ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan. 2008. Cap.14, p 410-447.

Sax, P.E.; DeJesus, E.; Mills, A.; Zolopa, A.; Cohen, C.; Wohl, D.; Gallant, J.E.; Liu, H.C.; Zhong, L.; Yale, K.; White, K.; Kearney, B.P.; Szwarcberg, J.; Quirk, E.; Cheng, A.K. and GS-US-236-0102 study team. Co-formulated elvitegravir, cobicistat, emtricitabine, and tenofovir versus co-formulated efavirenz, emtricitabine, and tenofovir for initial treatment of HIV-1 infection: a randomised, double-blind, phase 3 trial, analysis of results after 48 weeks. **Lancet.** 2012; v.379, p.2439-48.

Seki T, Kobayashi M, Wakasa-Morimoto C, Yoshinaga T, Sato A, Fujiwara T., Underwood M R, Garvey E P, Johns B A. S/GSK1349572 is a Potent Next Generation HIV Integrase Inhibitor and Demonstrates a Superior Resistance Profile Substantiated with 60 Integrase Mutant Molecular Clones. Abstract 555, 17th CROI 2010, San Francisco.

Singhroy D.N., Wainberg M A., Mesplède T. Combination of the R263K and M184I/V resistance substitutions against dolutegravir and lamivudine decreases HIV replicative capacity. **Antimicrob Agents Chemother.** 2015; 59(5):2882-5

Shimura, K.; Kodama, E.; Sakagami, Y.; Broad antiretroviral activity and resistance profile of the novel HIV Integrase inhibitor Elvitegravir (JK-303/GS-9137). **J Virol**, 2008; v.82, p. 764-74.

Spren W., Ford S.L., Chen S., Wilfret D., Margolis D., Gould E., Piscitelli S. GSK1265744 pharmacokinetics in plasma and tissue after single-dose long-acting injectable administration in healthy subjects. **J Acquir Immune Defic Syndr.** 2014; 15;67(5):481-6.

Spren W., Min S., Ford S.L., Chen S., Lou Y., Bomar M., St Clair M., Piscitelli S., Fujiwara T. Pharmacokinetics, safety, and monotherapy antiviral activity of GSK1265744, an HIV integrase strand transfer inhibitor. **HIV Clin Trials.** 2013; 14(5):192-203.

Steigbigel , R. T.; Cooper, D.A.; Kumar, P.N.; Eron, J. E.; Schechter , M.; Markowitz M; Loutfy, M.R.; Lennox, J.L.; Gatell J.M.; Rockstroh J.K.; Katlama C.; Yeni P.; Lazzarin A.; Clotet B.; Zhao J.; Chen J.; Ryan D.M.; Rhodes R.R.; Killar J.A.; Gilde L.R.; Strohmaier K.M.; Meibohm A.R.; Miller M.D.; Hazuda D.J.; Nessler M.L.; Dinubile M.J.; Isaacs R.D.; Nguyen B.Y.; Teppler H.; Benchmark Study Teams. Raltegravir with optimized background therapy for resistant HIV-1 infection. **N. Engl. J. Med**, 2008; 359(4), p.416-8.

Stein, B.; Gouda, S.; Lifson.; Penhallow, R.; Bensch.; Bensch, K.; Engleman, E. pH-independent HIV entry in to CD4-positive T cell via virus envelope fusion to the plasma membrane. **Cell**, 1987; v.49, p. 659-68.

Temesgen, Z.; Siraj, D.S. Raltegravir: first in class HIV integrase inhibitor **Therap. and Clin. Risk Manag.** 2008; v. 4 (2), p. 493-500.

Thompson, M.A.; Aberg, J.A.; Hoy, J.F.; Telenti, A.; Benson, C.; Cahn, P.; Eron, J.J.; Günthard, H.F.; Hammer, S.M.; Reiss, P.; Richman, D.D.; Rizzardini, G.; Thomas, D.L.; Jacobsen, D.M.; Volberding, P.A.. Antiretroviral treatment of adult HIV infection: 2012 recommendations of the International Antiviral Society-USA panel. **JAMA**. 2012; v.308; p.387-402.

Tremblay, C.L. Combating HIV resistance – Focus on Darunavir. **Therap. and Clin. Risk Manag.** 2008; v.4(4), p.759-765, 2008.

Triques, K, A. Bourgeois, A.; S. Saracosti, S.; N. Vidal, N.; E. Mpoudi-Ngole, E.; N. Nzilambi, N.; C. Apetrei, C.; M. Ekwilanga, M.; E. Delaporte, E.; M. PeeterS, M. High diversity of HIV-1 subtype F strains in Central Africa. **Virol.**, v.259, p. 99-109, 1999.

UNAIDS: <http://www.unaids.org> (Acesso em 02/08/212)

Varmus, H.E.; Swanstrom, R. Replication Of Retrovirus. In: Weiss, R.; Teic, N.; Varmus, H.; Coffin, H. **RNA Tumor Vir.**, 1985; p. 75-134.

Viani R.M., Alvero C., Fenton T., et al. Safety, pharmacokintetics, and efficacy of dolutegravir in treatment experienced HIV positive children; Poster

presented at: 21st Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections; March 3–6, 2014a; Boston, MA.

Viani R.M., Alvero C., Fenton T., et al. Safety and efficacy of dolutegravir in HIV treatment-experienced adolescents: 48-week results; Poster presented at: 21st Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections; March 3–6, 2014b; Boston, MA.

Vidal JE, Song AT, Matos ML, Bartmann D, Anjos GD, Miranda ÉJ, Freitas ÂC, Dalben Mde F, Santana C, Segurado AC, Barreto CC, Hernández AV. High rate of virologic suppression with darunavir/ritonavir plus optimized background therapy among highly antiretroviral-experienced HIV-infected patients: results of a prospective cohort study in São Paulo, Brazil. **Braz J Infect Dis.** 2013; 17(1):41-7

Vingerhoets, J.; Azijn, H.; Fransen, E.; De Baere, I.; Smeulders. L.; Jochmans, D.; Andries, K.; Pauwels, R.; de Béthune, M.P..TMC125 displays a high genetic barrier to the development of resistance: evidence from in vitro selection experiments. **J Virol.** 2005; v.79. p.12773-82.

Walmsley S.L., Antela A., Clumeck N., Duiculescu D., Eberhard A., Gutiérrez F., Hocqueloux L., Maggiolo F., Sandkovsky U., Granier C., Pappa K., Wynne B., Min S., Nichols G.; SINGLE Investigators. Dolutegravir plus abacavir-lamivudine for the treatment of HIV-1 infection. **N Engl J Med.** 2013; 369(19):1807-18.

Weiss, R.A. Gulliver's travels in HIVland. **Nature.** 2001; v.410, p. 963-967.

Wensing A. M; Xalvez V; Günthard H f; Johnson V A ; Paredes R; Pillay D; Shafer R W; Richman D D. 2014 Update of the drug resistance mutations in HIV-1. **Topics in Antiviral Medicine**, 2014; p. 642-650.



Wohl DA, Cohen C, Gallant JE, Mills A, Sax PE, Dejesus E, Zolopa A, Liu HC, Plummer A, White KL, Cheng AK, Rhee MS, Szwarcberg J; GS-US-236-0102 Study Team. A randomized, double-blind comparison of single-tablet regimen elvitegravir/cobicistat/emtricitabine/tenofovir DF versus single-tablet regimen efavirenz/emtricitabine/tenofovir DF for initial treatment of HIV-1 infection: analysis of week 144 results. **J Acquir Immune Defic Syndr.** 2014; 1;65(3):e118-20.

Xue W., Liu H., Yao X..Molecular modeling study on the allosteric inhibition mechanism of HIV-1 integrase by LEDGF/p75 binding site inhibitors. **PLoS One.** 2014; 5;9(3):e90799.

Yoshinaga T., Kobayashi M., Seki T., Miki S., Wakasa-Morimoto C., Suyama-Kagitani A., Kawauchi-Miki S., Taishi T., Kawasuji T., Johns B.A., Underwood M.R., Garvey E.P., Sato A., Fujiwara T.. Antiviral characteristics of GSK1265744, an HIV integrase inhibitor dosed orally or by long-acting injection. **Antimicrob Agents Chemother.** 2015; 59(1):397-406.

Young, B.; Fransen, S.; Greenberg, K.S.; Thomas, A.; Martens, S.; St Clair, M.; Petropoulos, C.J.; Ha, B.. Transmission of integrase strand-transfer inhibitor multidrug-resistant HIV-1: case report and response to raltegravir-containing antiretroviral therapy. **Antivir Ther.** 2011; v.16,p.253-6.

Zheng, R; Jenkins, T.M; Craigie, R. Zinc folds the N-terminal domain of HIV-1 integrase, promotes multimerization, and enhances catalytic activity. **Proc. Nat. Acad. Sci. U S A,** 1996; v.93 p.13659–13664.

Zolopa AR, Berger DS, Lampiris H, Zhong L, Chuck SL, Enejosa JV, Kearney BP, Cheng AK. 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; 15;201(6):814-22.

## **10. ANEXOS**



SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE  
COORDENADORIA DE CONTROLE DE DOENÇAS  
INSTITUTO ADOLFO LUTZ

Comitê de Ética em Pesquisa - CEPIAL

Av. Dr. Arnaldo, 355 – Sala 83 - Cerqueira César - 01246-902

Fone: 3068-2859 e-mail: [cepi@ial.sp.gov.br](mailto:cepi@ial.sp.gov.br)



São Paulo, 17 de março de 2011.

Protocolo: 018/2011

Projeto de Pesquisa: “Resistência genotípica no resgate terapêutico de pacientes infectados pelo HIV com novas classes de antirretrovirais”.

Pesquisador Responsável: Luís Fernando de Macedo Brígido

Instituição: Instituto Adolfo Lutz

O Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Adolfo Lutz - CEPIAL analisou e deliberou em reunião ordinária de 17 de março de 2011, de acordo com a Resolução CNS nº 196 de 10 de outubro de 1996 e suas resoluções complementares, o projeto na categoria **APROVADO**.

Em conformidade com o item IX. 2 da Resolução CNS nº 196/96 - cabe ao pesquisador: a) desenvolver o projeto conforme delineado; b) elaborar e apresentar os relatórios parciais e final; c) apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; d) manter em arquivo, sob sua guarda, por 5 anos, os dados da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; e) encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; f) justificar, perante o CEP, interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

Os relatórios parciais deverão ser encaminhados ao CEPIAL a cada seis meses a partir do início da pesquisa.

Luz Marina Trujillo

Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos  
Instituto Adolfo Lutz – CEPIAL

1ª via – coordenador

2ª via - CEPIAL

LMT/dvmp



SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE  
COORDENADORIA DE CONTROLE DE DOENÇAS  
**INSTITUTO ADOLFO LUTZ**  
**Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos - CEPIAL**  
Av. Dr. Arnaldo, 355 – Sala 83 - Cerqueira César - 01246-902  
Fone: 3068-2859



São Paulo, 12 de janeiro de 2010

Parecer: **003/2010**

Titulo do Projeto: **Papel da resistência genotípica, à nova classe de medicamentos que atua na integrase, no resgate terapêutico de pacientes infectados pelo HIV.**

Pesquisador Responsável: Luis Fernando Brigido

Instituição: Instituto Adolfo Lutz

O Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Adolfo Lutz – CEPIAL analisou e deliberou em reunião, de acordo com a Resolução CNS nº 196, de 10 de outubro de 1996 e suas resoluções complementares, o projeto acima na categoria **APROVADO**.

Em conformidade com o item IX.2 da Resolução CNS nº 196/96 - cabe ao pesquisador: a) desenvolver o projeto conforme delineado; b) elaborar e apresentar os relatórios parciais e final ; c) apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; d) manter em arquivo, sob sua guarda, por 5 anos, os dados da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; e) encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; f) justificar, perante o CEP, interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados. Os relatórios parciais deverão ser encaminhados a cada seis meses a partir do início da pesquisa.

Luz Marina Trujillo

Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos  
Instituto Adolfo Lutz – CEPIAL

1ª via – coordenador  
2ª via - CEPIAL  
LMT/dvmp



**SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE**  
Coordenadoria de Controle de Doenças  
**Centro de Referência e Treinamento DST/Aids**  
Rua Santa Cruz, 81 Vila Mariana - São Paulo SP  
CEP 04121-000 - Fone: 5087-9911



São Paulo, 27 de abril de 2010.

Ofício CRT-DST/AIDS - CEP nº 040/2010.

**PROTOCOLO CEP Nº 026/2009:** "Papel da Resistência Genotípica, à Nova Classe de Medicamentos que Atua na Integrase, no Resgate Terapêutico de Pacientes Infectados pelo HIV".

- Folha de rosto;
- TCLE – versão 1.0 de abril de 2010;
- Declaração sobre o recrutamento de pacientes;
- Protocolo do Estudo versão 01 de abril de 2010.

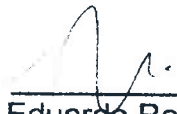
**Parecer: APROVADO**

Prezado Investigador,

Após a análise dos documentos do estudo acima referidos, pelos membros deste Comitê, em reunião ordinária do dia 26 de abril 2010, foi emitido parecer: **APROVADO**.

Conforme a Resolução CNS 196/96, solicitamos que sejam enviados relatórios semestrais, a contar desta data, comunicando o CEP sobre o andamento do estudo.

Atenciosamente,

  
Eduardo Ronner Lagonegro  
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa  
CRT - DST/AIDS

Ilma. Sr<sup>a</sup>.  
Dra. Rita Manzano Sarti  
Investigador Principal

Comitê de Ética em Pesquisa - CEP  
Fone/Fax: 5087-9837  
e-mail: [cep@crt.saude.sp.gov.br](mailto:cep@crt.saude.sp.gov.br)

*Recebido em*  
27/4/2010  
*[Handwritten signature]*



COORDENADORIA DOS SERVIÇOS DE SAÚDE  
INSTITUTO DE INFECTOLOGIA "EMILIO RIBAS"

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Av. Dr. Arnaldo, 165 - Cerqueira César - São Paulo - SP

CEP: 01246-900 - TEL: 3896-1406

E-mail: comitedeetica-ier@ig.com.br

**PARECER**

PROCOLO DE PESQUISA N.º 15/2012

PARECER N.º 243/2012

Data: 03/10/2012

*Título da Pesquisa: "Resistência genotípica no resgate terapêutico com novas classes de antiretrovirais"*

*Investigador Responsável: Dr. Alexandre Ely Campéas*

**CONSIDERAÇÕES:** O Comitê de Ética em Pesquisa considera respondida a pendência do parecer anterior referente ao Termo de Assentimento e Aprova o estudo e a nova versão do Termo de Assentimento.

(X) APROVADO

( ) REPROVADO

( ) COM PENDÊNCIAS- OBS.: a ausência de resposta em 60 dias, acarretará em arquivamento do processo por falta de interesse do pesquisador.

TEMÁTICA ESPECIAL

SIM  NÃO

CONEP

SIM  NÃO

SVS (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA)  SIM  NÃO

  
Dra. Anna Christina Nunes D'Ambrosio  
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisas - I.I.E.R.



Short communication

## *In-vivo* selection of the mutation F121Y in a patient failing raltegravir containing salvage regimen

Jaqueline Souza Cavalcanti<sup>a</sup>, André Minhoto Lança<sup>a</sup>, João Leandro de Paula Ferreira<sup>a</sup>,  
Margareth da Eira<sup>b</sup>, Daniel Soares de Souza Dantas<sup>b</sup>, Luís Fernando de Macedo Brígido<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Laboratório de Retrovírus, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, Brazil

<sup>b</sup>Instituto de Infectologia Emílio Ribas, São Paulo, Brazil

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 19 March 2012  
Revised 21 April 2012  
Accepted 24 April 2012  
Available online 4 May 2012

## Keywords:

HIV-1  
Brazil  
Integrase  
Raltegravir  
Genetic resistance

## ABSTRACT

Raltegravir is an integrase inhibitor (INI) licensed for clinical use and other INI are in advanced stage of development. Different resistance mutations in HIV integrase from patients using these antiretroviral drugs have been described and G148H/R/K, N155H and less frequently Y143C/H/R are considered major resistant mutations to raltegravir. Both Stanford Database and Geno2Pheno list F121Y as conferring intermediate resistance “in vitro” both to raltegravir and elvitegravir. We report for the first time the “in vivo” selection F121Y and evolution to Y143R in a 31 years old male clade B HIV-1 infected patient failing a raltegravir-containing salvage regimen. Plasma samples nine months prior to raltegravir (RAL-Naïve) and at weeks 32, 40 and 88 after RAL-containing regimen were analyzed. Antiretroviral susceptibility was evaluated at Stanford and Geno2Pheno from sequences obtained with RT-PCR. After a Viral load at week 12 below 50 copies/mL, viremia raised at week 20 to 4.5log<sub>10</sub>. The emergence of F121Y was observed at week 32 and 40, alongside with L74I, T97A, Q137H and V151I. At week 88 F121Y was no longer detected, L74I and T97A were maintained and Y143R emerged. F121Y might be an alternative pathway to Y143R. Changing of RAL-containing regimen upon the identification of F121Y might avoid the evolution of raltegravir resistance.

© 2012 Elsevier B.V. Open access under the Elsevier OA license.

Integrase inhibitors (INIs) are an important addition to the HIV infection treatment armamentarium. Licensed in 2007, raltegravir (RAL, Merck Laboratories) is the first INI approved for clinical use (FDA, 2007). Other drugs in this class, such as elvitegravir (Gilead Sciences) and dolutegravir (GlaxoSmithKline), are in advanced stage of development (van Lunzen et al., 2012; Molina et al., 2012). In Brazil, raltegravir is used as part of salvage regimens of patients with documented resistance to multiple antiretroviral drugs ([http://www.aids.gov.br/sites/default/files/folder\\_consenso.pdf](http://www.aids.gov.br/sites/default/files/folder_consenso.pdf)).

Despite its high activity when combined with optimized background therapy (OBT), different mutations confer loss of susceptibility to raltegravir, as well as to other INIs (Steigbigel et al., 2008; Shimura et al., 2008; Rowley, 2008; Malet et al., 2009; Mbisa et al., 2011). The pathways G148H/R/K, N155H and, less frequently Y143C/H/R, lead to an important viral resistance to raltegravir (Cooper et al., 2008). Also, some of these mutations also confer cross-resistance to other INIs, such as Q148H/R/K to elvitegravir (Shimura et al., 2008; Malet et al., 2009; Mbisa et al., 2011; Blanco

et al., 2011). Dolutegravir seems less susceptible to genetic resistance (Canducci et al., 2011), but different combinations of substitutions Q148H/K/R, G140S/A and E138 K/A may reduce its susceptibility by 10- to 20-fold (<http://hivdb.stanford.edu/pages/drugSummaries.html>). Along substitutions associated to the loss of susceptibility to raltegravir, non polymorphic accessory mutations can emerge during therapy as result of selective pressure. Moreover, natural polymorphisms of the integrase gene, such as V151I and I72 V, have been associated to a small decrease in susceptibility to INIs (Passaes et al., 2009; Low et al., 2009). Marinello et al. (2008) documented the negative impact of the F121Y substitution on integrase strand transfer activity, while integration patterns remains unchanged. Moreover, albeit never described in clinical isolates, HIV Stanford Resistance Database and Geno2Pheno both list F121Y as conferring a 5–10-fold decrease in raltegravir (Kobayashi et al., 2008; Rowley, 2008; Blanco et al., 2011) and elvitegravir (Shimura et al., 2008) susceptibility, leading to an intermediate resistance profile. Identification of potential mutational pathways is important to understand the evolution of resistance patterns and the drug susceptibility in HIV-1 infection.

In the present study we report the *in vivo* selection of the non-polymorphic substitution F121Y in a 31 years old male patient, diagnosed in August 1998 with HIV-1 infection, who underwent six

\* Corresponding author. Address: Laboratório de Retrovírus, Centro de Virologia, Instituto Adolfo Lutz, Av. Dr. Arnaldo, 355, Cerqueira César, 01246-902 São Paulo, SP, Brazil. Tel.: +55 11 3068 2982; fax: +55 11 3068 2983.

E-mail address: [lubrigido@gmail.com](mailto:lubrigido@gmail.com) (L.F. de Macedo Brígido).

treatment regimens (starting with HAART: zidovudine, lamivudine and nevirapine) prior to the use of RAL-containing therapy. We evaluated the evolution of the viral integrase from a genotype previous fully susceptible to integrase inhibitors to a F121Y intermediate resistant strain, and subsequently to an Y143R fully resistant profile analyzing protease/reverse transcriptase (referred as “polymerase”) and integrase genotypic population sequencing from blood samples prior to raltegravir exposure, collected in 2009 (RAL-NAÏVE), and at weeks 32, 40 and 88 after introduction of RAL-containing regimen. Viral RNA was extracted using the QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Germany) according to manufacturer instructions. Viral load was determined using bDNA method (Versant 3.0 Siemens, Germany) and CD4 + T-cells were measured by flow cytometer (FACS Calibur, BD, USA) during regular clinical follow up at the local laboratory. The study was approved by the ethical committees of the institutions involved.

Polymerase genotyping was performed using TRUGENE® HIV-1 Genotyping Assay or OpenGene® DNA System (Siemens, USA) and a one step RT-PCR using proof reading enzyme, adapted from Van Laethem et al. 2008, followed by a nested PCR to amplify the complete integrase gene. The PCR product was then submitted to direct sequencing using BigDye® v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, USA), resolved in an ABI3130XL (Applied Biosystems, USA). Three independent replicate integrase sequences were obtained from each sample. The sequences were assembled and edited using Sequencher 4.7 (GeneCodes, USA). Sequences Accession numbers: JQ797715 to JQ797734.

Resistance mutations and susceptibility to antiretroviral drugs were analyzed according to Stanford Resistance Database (Supplementary data 1, SD-1), Geno2pheno<sub>[resistance]</sub>, IAS 2011 mutation list (Johnson et al., 2011) and the ANRS algorithm. Sequences were aligned with HXB2 reference sequence using BioEdit v.7.0.9. Subtype screening was done at NCBI Genotyping and REGA BioAfrica websites, confirmed by phylogenetic reconstruction of Neighbor Joining and Maximum Likelihood trees using Paup\* 4.10b (SD-2). Viral load, CD4, antiretroviral treatment, resistance mutations and sampling time points are depicted in SD-3.

Polymerase genotyping (see SD-1) prior to raltegravir exposure predicted a high-level resistance profile to all NNRTI and NRTI except for etravirine, which showed a potential low-level resistance score according to Stanford Database (G190A). As the patient had no prior exposure to the drug and did not use other NNRTI in the year preceding this sampling, the drug was considered here as fully active. The virus had high-level resistance to all PI drugs except for darunavir/r, which exhibited an intermediate resistance profile (I47V, I50V, I84V, L89V). Therefore, the patient started raltegravir regimens at best with one additional active drug (etravirine) and one partially active drug, darunavir/r. This fact may have been determinant for the virological failure within a few weeks. Samples weeks 40 and 88 showed high resistance to etravirine (E138Q, Y181C and G190A). Therefore, after 40 week of exposure the regimen contained only a partially active darunavir.

On the first available sample obtained after raltegravir introduction on the regimen (week 32) the substitution F121Y was observed on all replicate sequences. Alongside this mutation, the emergence of L74I, T97A, Q137H and V151I was observed, as well as synonymous polymorphisms in codon 167. Mutations previously described with F121Y “in vitro”, as T124A and T125 K (Menéndez-Arias, 2010) were not found in these sequences. No relevant change was observed from week 32 to week 40. At week 88, a reversion was observed at positions F121Y, Q137H and V151I to the wild type amino acid, maintaining T97A and showing the emergence of K42R, V72I, L234I, V258I and the major resistance mutation Y143R. T97A is a polymorphic substitution, selected by raltegravir and is related to Y143R/C (Canducci et al., 2009). Although not directly associated to resistance, this mutation is

synergic to Y143 resistant mutants, as it is capable of restoring the replication capacity of the virus (fitness), and it is expected to emerge after the fixation of 143R (Delelis et al., 2010; Reigadas et al., 2011). The viral load documented during the presence of F121Y and T97A is over half log below historical values. However, it was also documented during previous regimens (SD-3) and therefore cannot associate these mutations to a change in replicative fitness.

To determine the proportion of polymorphic positions in the integrase gene and contextualize the amino acid substitutions of the patient’s virus, all 5102 complete integrase sequences available at LANL were downloaded. Subtype B sequences (“B global” alignment,  $n = 2523$ ) were selected for amino acid composition comparison. As expected, the consensus of those sequences was identical to the Consensus B available at LANL. The RAL-NAÏVE sample did not exhibit resistance mutations to integrase inhibitors, but had mutations both in polymorphic positions, as E11D, observed in 26.9% of the B global alignment, as well as in non polymorphic positions, such as Q164 K, occurring in only 0.0004% of sequences. See Supplementary data 4 for amino acid alignment of all study time points. In addition to amino acid substitutions, silent nucleotide substitutions were observed. In a total of 13 nucleotide substitutions in 143-strains, five were observed only in 121-strains. This could indicate an evolution of 143-strains from a 121-strain precursor. Analysis of the phylogenetic reconstruction shows an evolutionary pattern, with the RAL-NAÏVE sequences situated closer to the main subtype B branches, with raltegravir resistant strains further away on the branch. However, the weeks 32/40 (121-strains) and week 88 sequences (143-strains) are located at two separate terminal branches (bootstrap 89), which may suggest an independent evolution of both “121Y” and “143R” strains. Our data therefore cannot determine if a 121Y variant is the origin of the 143R variants or if it evolved directly from other precursors.

In conclusion, this study documents the association of the emergence of F121Y plus L74I, T97A, Q137H and V151I mutational pattern to the virological failure of RAL-containing regimen, followed by a reversion of the F121Y substitution and appearance of Y143R after continuous exposure to the drug. Thus, these results reinforce the role of F121Y on raltegravir resistance, and suggest that F121Y could be an alternative resistance pathway to raltegravir, less fit and therefore substituted by 143R strains. F121Y and these secondary mutations could also be an intermediate step towards the emergence of Y143R. However new generation sequencing or clonal studies are necessary to clarify the mutational pathways and phenotypic studies are necessary to elucidate the impact of these mutations on drug susceptibility and on integrase activity. In either way the change of RAL-containing regimen upon the identification of F121Y might avoid the evolution of raltegravir resistance.

## Funding

FAPESP (2006/61311-0 and 2011/21958-2); JSC and AML were supported by student scholarships from CAPES (M08/10) and CNPq (151152/2011-0), respectively.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.antiviral.2012.04.007>.

## References

Blanco, J.L., Varghese, V., Rhee, S.Y., Gatell, J.M., Shafer, R.W., 2011. HIV-1 Integrase inhibitor resistance and its clinical implications. *J. Infect. Dis.* 203, 1204–1214.



- Canducci, F., Sampaolo, M., Marinozzi, M.C., Boeri, E., Spagnuolo, V., Galli, A., Castagna, A., Lazzarin, A., Clementi, M., Gianotti, N., 2009. Dynamic patterns of human immunodeficiency virus type 1 Integrase gene evolution in patients failing raltegravir-based salvage therapies. *AIDS* 23, 455–460.
- Canducci, F., Ceresola, E.R., Boeri, E., Spagnuolo, V., Cossarini, F., Castagna, A., Lazzarin, A., Clementi, M., 2011. Cross-resistance profile of the novel Integrase inhibitor Dolutegravir (S/GSK1349572) using clonal viral variants selected in patients failing raltegravir. *J. Infect. Dis.* 204, 1811–1815.
- Cooper, D.A., Steigbigel, R.T., Gatell, J.M., Rockstroh, J.K., Katlama, C., Yeni, P., Lazzarin, A., Clotet, B., Kumar, P.N., Eron, J.E., Schechter, M., Markowitz, M., Loutfy, M.R., Lennox, J.L., Zhao, J., Chen, J., Ryan, D.M., Rhodes, R.R., Killar, J.A., Gilde, L.R., Strohmaier, K.M., Meibohm, A.R., Miller, M.D., Hazuda, D.J., Nessler, M.L., DiNubile, M.J., Isaacs, R.D., Tepller, H., Nguyen, B.Y.BENCHMRK Study Teams, 2008. Subgroup and Resistance Analyses of Raltegravir for Resistant HIV-1 Infection. *N. Engl. J. Med.* 359, 355–365.
- Delelis, O., Thierry, S., Subra, F., Simon, F., Malet, I., Alloui, C., Sayon, S., Calvez, V., Deprez, E., Marcelin, A.G., Tchernanov, L., Mouscadet, J.F., 2010. Impact of Y143 HIV-1 Integrase mutations on resistance to raltegravir in vitro and in vivo. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54, 491–501.
- FDA approves new HIV drug – Raltegravir tablets used in combination with other antiretroviral agents. In: Administration USFaD, (Ed.), FDA News, 2007.
- Johnson, V.A., Calvez, V., Günthard, H.F., Paredes, R., Pillay, D., Shafer, R., Wensing, A.M., Richman, D.D., 2011. 2011 update of the drug resistance mutations in HIV-1. *Top Antivir Med.* 19, 156–164.
- Kobayashi, M., Nakahara, K., Seki, T., Miki, S., Kawauchi, S., Suyama, A., Wakasa-Morimoto, C., Kodama, M., Endoh, T., Oosugi, E., Matsushita, Y., Murai, H., Fujishita, T., Yoshinaga, T., Garvey, E., Foster, S., Underwood, M., Johns, B., Sato, A., Fujiwara, T., 2008. Selection of diverse and clinically relevant integrase inhibitor-resistant human immunodeficiency virus type 1 mutants. *Antiviral Res.* 80, 213–222.
- Low, A., Prada, N., Topper, M., Vaida, F., Castor, D., Mohri, H., Hazuda, D., Muesing, M., Markowitz, M., 2009. Natural Polymorphisms of HIV-1 Integrase and Inherent Susceptibilities to a Panel of Integrase Inhibitors. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53, 4275–4282.
- Malet, I., Delelis, O., Soulie, C., Wirten, M., Tchernanov, L., Mottaz, P., Peytavin, G., Katlama, C., Mouscadet, J.F., Calvez, V., Marcelin, A.G., 2009. Quasispecies variant dynamics during emergence of resistance to raltegravir in HIV-1-infected patients. *J. Antimicrob. Chemother.* 63, 795–804.
- Marinello, J., Marchand, C., Mott, B., Bain, A., Thomas, C.J., Pommier, Y., 2008. Comparison of Raltegravir and Elvitegravir on HIV-1 Integrase Catalytic Reactions and on a Series of Drug-Resistant Integrase Mutants. *Biochemistry* 47, 9345–9354.
- Mbisa, J.L., Martin, S.A., Cane, P.A., 2011. Patterns of resistance development with Integrase inhibitors in HIV. *Infect. Drug Resist.* 4, 65–76.
- Menéndez-Arias, L., 2010. Molecular basis of human immunodeficiency virus drug resistance. an update. *Antiviral Res.* 85, 210–231.
- Molina, J.M., Lamarca, A., Andrade-Villanueva, J., Clotet, B., Clumeck, N., Liu, Y., Zhong, L., Margot, N., Cheng, A.K., Chuck, S.L. for the Study 145 Team, 2012. 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.* 12, 27–35.
- Passaes, C.B., Guimarães, M.L., Fernandez, S.L.C., Lorete, R.S., Teixeira, S.L.M., Fernandez, J.C.C., Morgado, M.G., 2009. Lack of primary mutations associated with Integrase Inhibitors among HIV-1 subtypes B, C and F circulating in Brazil. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 51, 7–12.
- Reigadas, S., Masquelier, B., Calmels, C., Laguerre, M., Lazaro, E., Vandenhende, M., Neu, D., Fleury, H., Andreola, M.L., 2011. Structure-analysis of the HIV-1 integrase Y143C/R raltegravir resistance mutation in association with the secondary mutation T97A. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55, 3187–3194.
- Rowley, M., 2008. The discovery of raltegravir, an Integrase inhibitor for the treatment of HIV infection. *Prog. Med. Chem.* 46, 1–28.
- Stanford HIV Resistance database, available at <<http://hivdb.stanford.edu/pages/drugSummaries.html>>.
- Shimura, K., Kodama, E., Sakagami, Y., Matsuzaki, Y., Watanabe, W., Yamataka, K., Watanabe, Y., Ohata, Y., Doi, S., Sato, M., Kano, M., Ikeda, S., Matsuoka, M., 2008. Broad Anti-Retroviral Activity and Resistance Profile of a Novel Human Immunodeficiency Virus Integrase Inhibitor, Elvitegravir (JTK-303/GS-9137). *J. Virol.* 82, 764–774.
- Steigbigel, R.T., Cooper, D.A., Kumar, P.N., Eron, J.E., Schechter, M., Markowitz, M., Loutfy, M.R., Lennox, J.L., Gatell, J.M., Rockstroh, J.K., Katlama, C., Yeni, P., Lazzarin, A., Clotet, B., Zhao, J., Chen, J., Ryan, D.M., Rhodes, R.R., Killar, J.A., Gilde, L.R., Strohmaier, K.M., Meibohm, A.R., Miller, M.D., Hazuda, D.J., Nessler, M.L., DiNubile, M.J., Isaacs, R.D., Nguyen, B.Y., Tepller, H. BENCHMRK Study Teams, 2008. Raltegravir with optimized background therapy for resistant HIV-1 infection. *N. Engl. J. Med.* 359, 339–354.
- Van Laethem, K., Schrooten, Y., Covens, K., Dekeersmaeker, N., De Munter, P., Van Wijngaerden, E., Van Ranst, M., Vandamme, A.M., 2008. A genotypic assay for the amplification and sequencing of Integrase from diverse HIV-1 group M subtypes. *J. Virol. Methods* 153, 176–181.
- van Lunzen, J., Maggiolo, F., Arribas, J.R., Rakhmanova, A., Yeni, P., Young, B., Rockstroh, J.K., Almond, S., Song, I., Brothers, C., Min, S., 2012. 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.* 12, 111–118.



## Short Communication

## HIV-1-infected patients with advanced disease failing a raltegravir-containing salvage regimen in São Paulo, Brazil



Jaqueline de Souza Cavalcanti<sup>a</sup>, Joao Leandro de Paula Ferreira<sup>a</sup>, Jose Ernesto Vidal<sup>b</sup>,  
Paula Morena de Souza Guimarães<sup>a</sup>, Denise Helena Moreira<sup>a</sup>,  
Luis Fernando de Macedo Brigido<sup>a,\*</sup>, São Paulo Salvage Workgroup

<sup>a</sup> Laboratório de Retrovirus, Instituto Adolfo Lutz, Av. Dr Arnaldo 355, Virology Service, São Paulo, SP, 01246-902, Brazil

<sup>b</sup> Instituto de Infectologia Emílio Ribas, São Paulo, Brazil

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 13 July 2013

Accepted 22 October 2013

## Keywords:

HIV-1

Brazil

Integrase

Raltegravir

Genotype

Resistance

## ABSTRACT

Raltegravir (RAL) is the first licensed antiretroviral integrase inhibitor that may be used both for treatment-naïve human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) patients and for salvage therapy. The Brazilian public free access programme limits its use for salvage therapy, with scarce information regarding RAL resistance from patients failing a RAL-containing salvage regimen. This study evaluated RAL resistance mutations detected by population sequencing in 69 HIV-infected patients with advanced disease failing a RAL-containing regimen in a real-world setting. RAL resistance mutations were identified in 47/69 patients (68%). The most common salvage regimen, used by 56/69 patients (81%), included lamivudine, tenofovir, darunavir/ritonavir and RAL. At failure, major RAL resistance mutations included Q148H/R/K (21/47; 45%), N155H (14/47; 30%), Y143R/H/C (3/47; 6%) and E92Q (1/47; 2%). Most samples with Q148H/R/K also showed G140S/A/C (21/47; 45%). RAL resistance was significantly associated with less than two active drugs in the optimised background therapy regimen at failure [39/39 (100%) vs. 9/17 (53%);  $P < 0.001$ ] and with a longer cumulative duration with detectable viraemia (viral load  $> 50$  copies/mL) (86 weeks vs. 32 weeks;  $P = 0.001$ ). A high frequency of RAL mutations was observed in this study. In addition, these results reinforce the importance of close monitoring of RAL-containing regimens to reduce the time of failure and consequent resistance accumulation.

© 2013 Elsevier B.V. and the International Society of Chemotherapy. All rights reserved.

### 1. Introduction

Integration of the retrotranscribed human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) DNA into the human genome is a fundamental step in retroviral replication. Raltegravir (RAL) (Isentress®; Merck Laboratories) is the first integrase inhibitor licensed for clinical use, approved both for treatment-naïve and antiretroviral (ARV)-experienced HIV-infected patients [1,2]. Other integrase inhibitors are available, such as Stribild® (Gilead Sciences), a tablet combination including elvitegravir (EVG) [3], and more recently dolutegravir (Tivicay®; GlaxoSmithKline) [4]. All are analogues of diketo acid, blocking the 3' processing step in the cytoplasm and the strand transfer of viral DNA into the nucleus, known as integrase strand transfer inhibitors (INSTIs) [5].

Despite the capacity of INSTIs to inhibit viral replication, similar mutational pathways that reduce the activity of these

drugs have been described [6]. Treatment failure with RAL may be associated with the selection of mutations in at least four different pathways, including E92Q, Q148H/R/K, N155H and, less frequently, Y143R/H/C [7]. The mutations E92Q, Q148H/R/K and N155H also confer cross-resistance to EVG [6]. Additional mutations such as F121Y that reduce susceptibility to RAL and EVG in vitro [8] have recently been documented in vivo [9].

In 2009, RAL was included among the ARV drugs available for salvage treatment of ARV-experienced patients in Brazil. This drug constitutes an important component of salvage regimens in Brazil, and most patients receiving adequate third-line drug combinations achieve virological suppression [10]. Failure of RAL-containing regimens is observed in certain patients, but information about this situation, a critical scenario where further salvage therapy options are usually limited, is scarce.

The aim of the present study was to assess, in routine clinical conditions, the mutational profile to RAL in samples from HIV-infected patients failing a salvage regimen containing this ARV in Brazil.

\* Corresponding author. Tel.: +55 11 3068 2982; fax: +55 11 3068 2983.

E-mail address: [lubrigido@gmail.com](mailto:lubrigido@gmail.com) (L.F. de Macedo Brigido).

## 2. Patients and methods

### 2.1. Patients

Blood samples from 69 HIV-infected patients with confirmed virological failure during use of a RAL-containing salvage regimen were included in this study. Viral failure was defined by the attending physician based on no virological response, i.e. no viral suppression below the detection limit of 50 copies/mL after 24 weeks on a RAL-containing regimen or detectable viraemia after viral suppression. Samples were collected at clinical sites, all in São Paulo State, Brazil, from July 2009 to March 2013 and were processed at the Retrovirus Laboratory, Instituto Adolfo Lutz, the main public laboratory of São Paulo State.

### 2.2. Quantification of viral load (VL) and CD4 cell count

Plasma VL was quantified using bDNA methodology (VERSANT® HIV-1 RNA 3.0; Siemens, Erlangen, Germany), and CD4 T-lymphocytes were measured by flow cytometry (FACSCalibur™; BD, San José, CA) according to the manufacturers' instructions in laboratories accredited by the National AIDS Programme quality control. CD4 cell counts and quantification of VL were analysed at three time points: before the introduction of RAL; between 12 weeks and 24 weeks after exposure to RAL; and the time of sample collection for integrase genotyping testing.

### 2.3. PCR and genomic sequencing

Sequences were obtained from viral RNA, extracted from plasma using a QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions and stored at  $-70^{\circ}\text{C}$  until use. Amplification of the complete integrase gene was performed with a reverse transcriptase PCR (RT-PCR) assay using SuperScript® III (Invitrogen, Carlsbad, CA) and Platinum® Taq DNA Polymerase, High-Fidelity with corrective action (Invitrogen), followed by a nested PCR with primers described by Van Laethem et al. [11]. The PCR product was then direct-sequenced using a BigDye® v.3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Austin, TX) and resolved in an ABI 3130XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Sequences were assembled and edited using Sequencher 4.7 (Gene Codes Corp., Ann Arbor, MI). The protease and reverse transcriptase gene were genotyped by an in-house methodology [12] or using a TRUGENE® HIV-1 Genotyping Assay (Siemens, Tarrytown, NY).

### 2.4. Determining genotypic resistance, susceptibility to antiretrovirals and genotypic sensitivity score (GSS)

Patients with one or more major RAL resistance mutations as defined by the Stanford University HIV Drug Resistance Database (HIVdb) (<http://hivdb.stanford.edu/index.html>) and the International Antiviral Society – USA (IAS-USA) resistance list [7] were considered as harbouring a RAL resistance mutation. To define the GSS for each drug used in the optimised background therapy (OBT), the drug susceptibility determined at HIVdb was used. The GSS of the OBT was calculated at the beginning of the RAL-containing regimen (GSS1) from previous genotyping tests, and from a new genotypic test at the same sample used to determine RAL resistance collected during salvage therapy failure (GSS2).

The scoring system based on the HIVdb GSS to each drug in the OBT was: a score of 0 was assigned if the interpretation predicted resistance or intermediate resistance; a score of 0.5 was assigned for low-level resistance; and a score of 1 was assigned if the interpretation predicted susceptible virus or only potential low-level resistance. At baseline enfuvirtide was considered to be fully active if it had not been used previously, and at failure was

considered resistant (GSS=0) if it was used for  $\geq 2$  weeks after virological failure. Maraviroc was considered to be fully active if it was not used previously. RAL was not included in the calculation of the GSS. Subtypes were screened using the REGA HIV-1 Subtyping Tool v.2.0 (<http://dbpartners.stanford.edu/RegaSubtyping/>) and the National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genotyping/formpage.cgi>), using phylogeny (PAUP) whenever necessary.

### 2.5. Statistical analysis

Statistical analyses were performed using Epi Info 6 (CDC, Atlanta, GA) and GraphPad software (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA), assuming a significance level of  $P < 0.05$ . Categorical variables were tested using Fisher's exact test, and continuous variables with the Mann–Whitney test. Results of continuous variables were expressed as the median and interquartile range.

### 2.6. Ethical approval

This study was approved by the Ethical and Research Committees of the Instituto Adolfo Lutz, Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo and Instituto de Infectologia Emilio Ribas. All patients signed written informed consent forms at participating clinical sites.

## 3. Results

All 69 patients with confirmed virological failure using a RAL-containing regimen submitted to our laboratory from 2009 to 2013 were included. The most common OBT used by these patients was lamivudine, tenofovir and darunavir/ritonavir (81%). Additional new ARV classes included enfuvirtide in 6 patients (9%), etravirine in 4 patients (6%) and maraviroc in 1 patient (1.4%). The integrase gene subtype was B in 61 patients (88%), F in 5 patients (7%), BF in 2 patients (3%) and D in 1 patient (1%). In five cases a discordant subtype was observed in the protease or reverse transcriptase. Baseline characteristics of the patients according to RAL susceptibility at failure of the salvage regimen are shown in Table 1.

In 22 patients (32%), albeit with detectable viraemia, the integrase genotyping test did not detect any drug resistance mutation (DRM) to RAL. One or more DRM was observed in 47 (68%) of the samples tested, with a DRM pattern that would also predict resistance to elvitegravir in most cases (62%; 43/69) (Fig. 1).

### 3.1. Evolution of CD4 cell counts and quantification of viral load

Plasma HIV-1 RNA and CD4 cell counts obtained between Weeks 12 and 24 were available in 57 cases. Most patients remaining RAL-susceptible at failure had a significantly lower VL (median  $1.76 \log_{10}$ ) compared with cases with RAL resistance (median  $3.85 \log_{10}$ ;  $P = 0.005$ ) (Table 2). Patients with viruses susceptible to RAL at failure more frequently had a decrease in VL at Weeks 12–24 compared with those with RAL DRMs (median  $-1.06 \log_{10}$  vs.  $-0.41 \log_{10}$ ) but the difference was not significant ( $P = 0.063$ ). There was no major difference in the CD4 cell gain between the two groups of patients during Weeks 12–24 of the salvage regimen.

### 3.2. Exposure to raltegravir

The median duration of exposure to RAL in patients with DRMs was ca. 113 weeks compared with 94 weeks for those without a DRM ( $P = 0.161$ ). The cumulative duration on detectable viraemia (VL  $> 50$  copies/mL) during a RAL-containing salvage regimen was

**Table 1**  
Patient baseline characteristics according to identification of raltegravir (RAL) drug resistance mutations.<sup>a</sup>

Characteristic	Total patients (n = 69)	Susceptible to RAL (n = 22)	Resistant to RAL (n = 47)	P-value
Age (years)	42 (22–49)	44 (21–52)	42 (22–48)	0.661
Sex male [n (%)]	46 (67)	16 (73)	30 (64)	0.465
Nadir CD4 count (cells/mm <sup>3</sup> ) <sup>b</sup>	65 (12–155)	40 (7–176)	75 (17–161)	0.374
Zenith viral load (log <sub>10</sub> ) <sup>c</sup>	5.33 (4.72–5.70)	5.08 (4.40–5.59)	5.43 (4.86–5.70)	0.078
No. of regimens (n = 61)	7 (6–9)	7 (6–9)	7 (5–9)	0.693
No. of drugs used (n = 62)	12 (10–14)	12 (10–14)	12 (11–14)	0.939
Treatment time (n = 62)	13 (11–15)	12 (11–15)	13 (11–15)	0.605
GSS1 (n = 48) <sup>d</sup>				
<2 drugs [n (%)]	38 (79)	10 (67)	28 (85)	0.248
≥2 drugs [n (%)]	10 (21)	5 (33)	5 (15)	

GSS, genotypic sensitivity score.

Whenever data were not available for all cases, the number of observations is described alongside the variable.

<sup>a</sup> Data are median (interquartile range) unless otherwise stated.

<sup>b</sup> Lowest value observed during follow-up.

<sup>c</sup> Highest viral load observed during follow-up.

<sup>d</sup> GSS for the predicted (based on the Stanford University HIV Drug Resistance Database) GSS of the optimised background therapy regimen (the sum of all GSS for the antiretrovirals used in the RAL-containing regimen as follows: susceptible or potential low-level resistance = 1; low-level resistance = 0.50; and intermediate resistance or resistance = 0).

significantly higher among those developing a detectable RAL DRM (86 weeks vs. 32 weeks;  $P = 0.001$ ).

### 3.3. Evaluation of the genotypic sensitivity score

Few patients had an HIVdb GSS score more than two in GSS1 (33% among those without a RAL DRM and 15% among those with a RAL DRM;  $P = 0.248$ ). Similarly, darunavir activity (GSS1 = 1) was limited to 60% and 33% ( $P = 0.275$ ), respectively. However, both darunavir activity (69% vs. 3%;  $P < 0.001$ ) and GSS2 of OBT at the time of integrase genotype testing (47% vs. 0%;  $P < 0.001$ ) were significantly lower among those failing with a RAL DRM. Mutations to darunavir more frequent among patients with a DRM to RAL were V32I (67%), L33F (48%), I47V (44%), I54ML (48%) and I84V (56%).

### 3.4. Mutations associated with resistance to raltegravir

Major mutations associated with resistance to RAL observed among patients resistant to this drug were Q148H/R/K (21/47; 45%), N155H (14/47; 30%), Y143R/H/C (3/47; 6%) and E92Q (1/47;

2%). Three patients had the mutations E92Q+N155H (3/47; 6%), two had Y143H+Q148H (2/47; 4%) and one had Y143C+N155H (1/47; 2%). Also, the mutation F121Y causing intermediate resistance to RAL was observed in one patient, evolving to Y143R in a follow-up sample [9]. In 79% of cases (11/14) of sequences showing a resistance mutation in codon 155 the mutation V151I was also present. Other mutations observed with N155H were T97A, E92Q, E138D and G163Q/R. Most samples with Q148H/R/K also showed G140S/A/C (21/47; 45%). In some sequences the mutations V54I, L74M, T97A, Y143H, E138A/K, V151I and G163R were present along with mutation at codon 148. Intermediate resistance to RAL was predicted for a sample that showed mutations L74M+T97A+V151I+G163R. Although not statistically significant, patients carrying virus with a mutation at codon 155 tended to have a lower median VL (3.35 log<sub>10</sub> vs. 3.92 log<sub>10</sub>;  $P = 0.059$ ) and a somewhat higher CD4 count (360 cells/mL vs. 253 cells/mL;  $P = 0.114$ ) compared with individuals who had RAL resistance due to mutation at codon 148. The exposure time to RAL among patients carrying virus with a mutation in codon 155 (144 weeks) was not different compared with those with a mutation in codon 148 (98 weeks;  $P = 0.131$ ).

**Table 2**  
Clinical and laboratory outcome of raltegravir (RAL)-containing salvage therapy.<sup>a</sup>

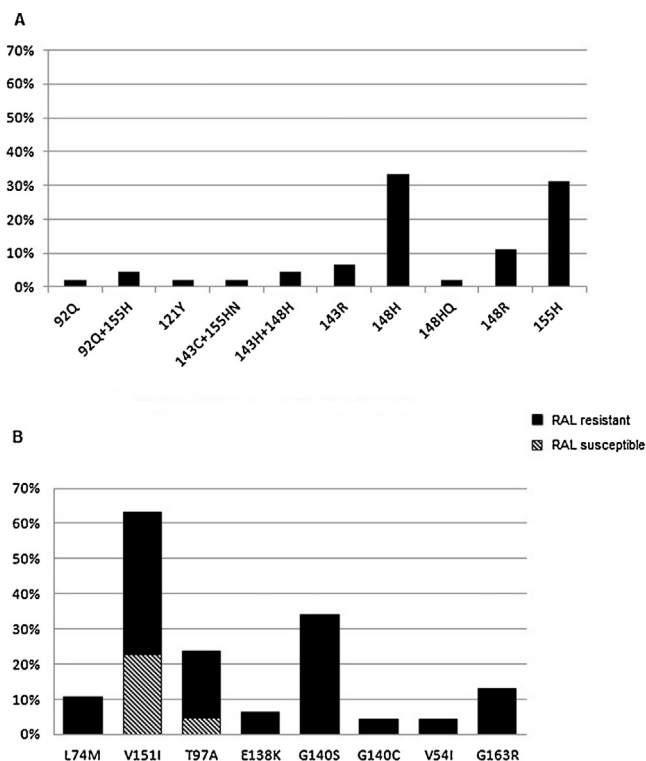
Variable	Total patients (n = 69)	Susceptible to RAL (n = 22)	Resistant to RAL (n = 47)	P-value
CD4 cell count (cells/mm <sup>3</sup> )				
At RAL initiation (n = 56)	190 (46–461)	199 (38–475)	189 (43–459)	0.765
At weeks 12–24 of RAL (n = 55)	282 (111–491)	269 (112–517)	282 (92–515)	0.685
At sample collection (n = 66)	244 (89–464)	179 (51–449)	252 (86–512)	0.577
HIV RNA level (log <sub>10</sub> )				
At RAL initiation (n = 57)	4.42 (3.71–4.76)	3.89 (3.50–4.74)	4.46 (3.99–4.83)	0.207
At weeks 12–24 of RAL (n = 57)	3.23 (1.70–4.23)	1.76 (1.70–3.25)	3.85 (2.16–4.41)	0.005
At sample collection (n = 69)	3.92 (3.24–4.42)	3.89 (3.17–4.33)	3.92 (3.24–4.47)	0.827
RAL exposure (weeks)	111 (61–154)	94 (38–140)	113 (76–161)	0.161
Time with viraemia (weeks)	71 (26–128)	32 (7–65)	86 (46–143)	0.001
GSS2 (n = 56) [n (%)] <sup>b</sup>				
<2 drugs	48 (86)	9 (53)	39 (100)	0.001
≥2 drugs	8 (14)	8 (47)	0 (0)	
Current clinical scenario (n = 55) [n (%)]				
Asymptomatic	42 (76)	13 (76)	28 (74)	0.806
Symptomatic	13 (24)	4 (24)	10 (26)	

GSS, genotypic sensitivity score.

Whenever data were not available for all cases, the number of observations is described alongside the variable.

<sup>a</sup> Data are median (interquartile range) unless otherwise stated.

<sup>b</sup> GSS2 for the predicted (based on the Stanford University HIV Drug Resistance Database) GSS of the background optimised regimen (the sum of all GSS for the antiretrovirals used in the RAL-containing therapy regimen as follows: susceptible or potential low-level resistance = 1; low-level resistance = 0.50; and intermediate resistance or resistance = 0) at the sample used for integrase resistance evaluation.



**Fig. 1.** Proportion of patients with one or more (A) major and (B) minor mutations associated with raltegravir (RAL) resistance according to the International Antiviral Society – USA (IAS-USA) and Stanford University HIV Drug Resistance Database. Major mutations determined RAL resistance and therefore were observed only in RAL-resistant patients (RAL-resistant,  $n = 47$ ), whereas for minor mutations patients without major resistance mutations (RAL-susceptible,  $n = 22$ ) were also included ( $n = 69$ ).

#### 4. Discussion

In this study, a high frequency (68%) of integrase inhibitor resistance mutations was found among HIV-1-infected patients using RAL-containing salvage therapy. The present study represents a larger series of integrase resistance evaluations outside the context of clinical trials from HIV-infected patients using RAL-containing salvage regimens in Latin America. Only a prior small Brazilian observational cohort with reported virological failure in 10 patients using a RAL-containing salvage regimen documented the presence of the mutations Q148H+G140S in 2 of them [13].

Although this population probably will not represent patients failing an initial RAL-containing highly active ARV therapy regimen, they represent cases that will be progressively found in clinical settings of low- and middle-income countries, where first ARV therapy is mostly composed of generic, less-expensive drugs, with new class medication usually reserved for salvage therapy of patients, many at late stage of disease. One of the main characteristics of this group is the limited ARV options of active drugs to compose the salvage regimen. The attempt to rescue patients recycling same class drugs is common in most low- and middle-income countries. However, a recent Brazilian observational prospective study reported 83% virological success in 92 three-class ARV-experienced HIV-infected patients. All these patients received a darunavir-based scheme (83% with full sensitivity to darunavir), including 72% with RAL [10]. This result indicates that similar results to those reported in high-income countries are possible in low- and middle-income countries and reinforces the importance of progressive scaling-up of third-line ARVs in this setting.

In this study, most patients had less than two active drugs in the OBT regimen, with no significant association with RAL DRM emergence. However, a significant association was identified between RAL DRMs and a low GSS2 of the OBT at the sample obtained at the RAL-containing regimen failure. Lower predicted activity of darunavir, a commonly used protease inhibitor used in salvage therapy, was also significantly associated with RAL mutation emergence. Determination of GSS1 was based on reports from previous genotyping tests, available medical records, with incomplete data and testing in some cases performed in other services. On the other hand, GSS2 data were obtained from the same sample used for integrase genotyping, with a significant correlation of low GSS with RAL resistance. Recently, a larger series from a French multi-centre cohort study with 468 HIV-infected treatment-experienced patients receiving a RAL-containing regimen showed that the number of new drugs associated with RAL was an independent variable associated with virological failure [14]. These results support the notion that the composition of the salvage regimen always should consider not only the number of drugs but principally its potency and resistance profile, particularly of the best available protease inhibitor.

In the current study, a long cumulative duration of detectable viraemia ( $VL > 50$  copies/mL) was identified for most cases (median of 71 weeks). This is a worrisome situation and could explain at least in part the presence of integrase inhibitor mutations. The proportion of RAL DRMs in randomised clinical trials is lower than reported here, but the French study, also in a clinical setting, also found a high prevalence of resistance with 27/63 (43%) with RAL-associated resistance mutations [15]. Most demographic and clinical characteristics do not show any association with RAL DRMs (Table 1), but a CD4 cell count gain was observed both in those evolving with mutations to RAL as well as those without detectable mutations after the RAL-containing regimen (Table 2). Importantly, the cumulative duration of detectable viraemia ( $VL > 50$  copies/mL) using RAL was significantly associated with resistance to this drug, which suggests that patients without resistance to RAL may accumulate mutations with time. A prior study reported that the emergence of integrase inhibitor mutations can occur during episodes of low-level viraemia in patients receiving RAL-containing regimens [15]. Thus, opportune genotyping to evaluate integrase-related mutations is necessary in order to structure a salvage regimen and if feasible avoid lost future therapeutic options. In conclusion, in this study a high frequency of RAL DRMs was identified. These results reinforce the importance of close monitoring of RAL-containing regimens in order to reduce the time of failure and the consequent risk of resistance accumulation.

#### Acknowledgments

Participants of the São Paulo Salvage Workgroup that contributed to this work included: Luis Calos Pereira Jr, Max Igor Banks Ferreira Lopes, Margareth da Eira, Carla Vasquez, Denise Lotufo, Simone Queiroz, Norberto Camilo Campos, Giselle I. Lopez Lopes, Gabriela Bastos Cabral, Flavia Jacqueline Almeida, Daniela R. Pellegrino, Alexandre Ely Campeas, Marcos Caseiro, Fernanda Modesto Tolentino, Janaina Martins Montanha, Rosangela Rodrigues, Iris B. Roquin and Valeria Almeida.

**Funding:** This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) [Grant 2011/21958-2]; JSC was supported by a student scholarship from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) [D06/12].

**Competing interests:** None declared.

**Ethical approval:** This study was approved by the Ethical and Research Committees of the Instituto Adolfo Lutz [018/2011],

Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo [CAPPesq no. 0665/2011] and Instituto de Infectologia Emilio Ribas [243/2012].

## References

- [1] Steigbigel RT, Cooper DA, Kumar PN, Eron JE, Schechter M, Markowitz M, et al.; BENCHMRK Study Teams. Raltegravir with optimized background therapy for resistant HIV-1 infection. *N Engl J Med* 2008;359:339–54.
- [2] Lennox JL, DeJesus E, Lazzarin A, Pollard RB, Madruga JV, Berger DS, et al.; STARTMRK Investigators. Safety and efficacy of raltegravir-based versus efavirenz-based combination therapy in treatment-naïve patients with HIV-1 infection: a multicentre, double-blind randomised controlled trial. *Lancet* 2009;374:796–806.
- [3] Sax PE, DeJesus E, Mills A, Zolopa A, Cohen C, Wohl D, et al.; GS-US-236-0102 Study Team. Co-formulated elvitegravir, cobicistat, emtricitabine, and tenofovir versus co-formulated efavirenz, emtricitabine, and tenofovir for initial treatment of HIV-1 infection: a randomised, double-blind, phase 3 trial, analysis of results after 48 weeks. *Lancet* 2012;379:2439–48.
- [4] Kobayashi M, Yoshinaga T, Seki T, Wakasa-Morimoto C, Brown KW, Ferris R, et al. In vitro antiretroviral properties of S/GSK1349572, a next-generation HIV integrase inhibitor. *Antimicrob Agents Chemother* 2011;55: 813–21.
- [5] Espeseth AS, Felock P, Wolfe A, Witmer M, Grobler J, Anthony N, et al. HIV-1 integrase inhibitors that compete with the target DNA substrate define a unique strand transfer conformation for integrase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:11244–9.
- [6] Mbisa JL, Martin SA, Cane PA. Patterns of resistance development with integrase inhibitors in HIV. *Infect Drug Resist* 2011;4:65–76.
- [7] Johnson VA, Calvez V, Günthard HF, Paredes R, Pillay D, Shafer RW, et al. Update of the drug resistance mutations in HIV-1: March 2013. *Top Antivir Med* 2013;21:6–14 [Erratum in: *Top Antivir Med* 2013;21:46].
- [8] Kobayashi M, Nakahara K, Seki T, Miki S, Kawauchi S, Suyama A, et al. Selection of diverse and clinically relevant integrase inhibitor-resistant human immunodeficiency virus type 1 mutants. *Antiviral Res* 2008;80:213–22.
- [9] Souza Cavalcanti J, Minhoto Lança A, de Paula Ferreira JL, da Eira M, de Souza Dantas DS, de Macedo Brígido LF. In-vivo selection of the mutation F121Y in a patient failing raltegravir containing salvage regimen. *Antiviral Res* 2012;95:9–11.
- [10] Vidal JE, Song AT, Matos ML, Bartmann D, Anjos GD, Miranda ÉD, et al. High rate of virologic suppression with darunavir/ritonavir plus optimized background therapy among highly antiretroviral-experienced HIV-infected patients: results of a prospective cohort study in São Paulo, Brazil. *Braz J Infect Dis* 2013;17:41–7.
- [11] Van Laethem K, Schrooten Y, Covens K, Dekeersmaecker 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;153:176–81.
- [12] Rodrigues R, Vazquez CMP, Colares JK, Custodio RM, Bonásser Filho F, Souza LR, et al. Antiretroviral resistance mutations in human immunodeficiency virus type 1 infected patients enrolled in genotype testing at the Central Public Health Laboratory, São Paulo, Brazil: preliminary results. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005;100:97–102.
- [13] Passaes CP, Guimarães ML, Cardoso SW, Pilotto JH, Veloso V, Grinsztejn B, et al. Monitoring the emergence of resistance mutations in patients infected with HIV-1 under salvage therapy with raltegravir in Rio de Janeiro, Brazil: a follow-up study. *J Med Virol* 2012;84:1869–75.
- [14] Marcelin AG, Delaugerre C, Beaudoux C, Descamps D, Morand-Joubert L, Amiel C, et al.; ANRS AC11 Resistance Group. A cohort study of treatment-experienced HIV-1-infected patients treated with raltegravir: factors associated with virological response and mutations selected at failure. *Int J Antimicrob Agents* 2013;42:42–7.
- [15] Gallien S, Delaugerre C, Charreau I, Braun J, Boulet T, Barrail-Tran A, et al. Emerging integrase inhibitor resistance mutations in raltegravir-treated HIV-1-infected patients with low-level viremia. *AIDS* 2011;25:665–9.

## High frequency of dolutegravir resistance in patients failing a raltegravir-containing salvage regimen

Jaqueline de Souza Cavalcanti<sup>1</sup>, João Leandro de Paula Ferreira<sup>1</sup>, Paula Morena de Souza Guimarães<sup>1</sup>, Jose Ernesto Vidal<sup>2</sup> and Luis Fernando de Macedo Brigido<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Retrovirus, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, Brazil; <sup>2</sup>Instituto de Infectologia Emilio Ribas, São Paulo, Brazil

\*Corresponding author. Tel: +55-11-30682982; Fax: +55-11-30682983; E-mail: lubrigido@gmail.com

Received 28 August 2014; returned 26 September 2014; revised 7 October 2014; accepted 9 October 2014

**Objectives:** Dolutegravir is a second-generation integrase strand transfer inhibitor (InSTI) that has been recently approved by the FDA to treat antiretroviral therapy-naïve as well as treatment-experienced HIV-infected individuals, including those already exposed to the first-generation InSTI. Despite having a different mutational profile, some cross-resistance mutations may influence its susceptibility. The aim of this study was to evaluate the impact of a raltegravir-containing salvage regimen on dolutegravir activity.

**Patients and methods:** Blood samples of 92 HIV-infected individuals with virological failure (two or more viral loads >50 copies/mL after 6 months of treatment) using raltegravir with optimized background therapy were sequenced and evaluated according to the Stanford University HIV Drug Resistance Database algorithm.

**Results:** Among the 92 patients analysed, 32 (35%) showed resistance to dolutegravir, in most cases associated with the combination of Q148H/R/K with G140S/A mutations. At genotyping, patients with resistance to dolutegravir had viral load values closer to the highest previously documented viral load.

**Conclusions:** Changes in viraemia during virological failure may indicate the evolution of raltegravir resistance and may predict the emergence of secondary mutations that are associated with a decrease in dolutegravir susceptibility. Early discontinuation of raltegravir from failing regimens might favour subsequent salvage with dolutegravir, but further studies are necessary to evaluate this issue.

**Keywords:** HIV, antiretroviral resistance, integrase inhibitors, Brazil

### Introduction

Dolutegravir (Tivicay<sup>®</sup>; GlaxoSmithKline) is a promising, new integrase strand transfer inhibitor (InSTI), recently licensed by the FDA for clinical use in treatment-naïve<sup>1–3</sup> or treatment-experienced subjects,<sup>4</sup> including those exposed to InSTI.<sup>5</sup> In contrast to the first-generation integrase inhibitors, dolutegravir has a high genetic barrier,<sup>6</sup> and has been proven effective against strains resistant to raltegravir and elvitegravir.<sup>5</sup> Resistance mutations to dolutegravir are not yet thoroughly established, but some mutations selected *in vitro* and *in vivo* by first-generation InSTI were associated with a decrease in dolutegravir susceptibility.<sup>5,7,8</sup> Although dolutegravir may be used in raltegravir-experienced patients, drug activity in this situation is expected to be influenced by intraclass cross-resistance that may compromise its potency. In the VIKING-3 study, patients exposed to raltegravir showed a reduced response to dolutegravir when resistance mutations, especially at codon Q148, were present with two or more other mutations (including L74I, E138A/K or G140S/A).<sup>5</sup> We and others<sup>9,10</sup> have documented important raltegravir resistance in two distinct clinical settings.<sup>4</sup> As could be expected, the time of virological failure correlates to resistance accumulation that

may impact further the use of the same class of drugs.<sup>9</sup> We evaluated integrase sequences from treatment-experienced patients with advanced disease failing a raltegravir-containing salvage regimen to assess the predicted activity of dolutegravir.

### Patients and methods

#### Patients

Blood samples from 92 HIV-infected patients with confirmed virological failure during the use of a raltegravir-containing regimen (two or more viral loads >50 copies/mL after 6 months of treatment) were included in this study. Samples were collected at clinical sites in São Paulo State from July 2009 to July 2013 and processed in the Retrovirus Laboratory at the Adolfo Lutz Institute.

#### PCR and genomic sequencing

Sequences were obtained from viral RNA, extracted from plasma using a commercial kit (QIAamp Viral RNA Mini Kit, Qiagen, USA) according to the manufacturer's instructions. Amplification and sequencing of the complete integrase gene was performed as previously described,<sup>9</sup> with an RT-PCR assay using SuperScript<sup>®</sup> III (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and

Platinum® Taq DNA Polymerase, High Fidelity with corrective action (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), followed by a nested PCR. The PCR product was then direct-sequenced using a BigDye® v.3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems®, Austin, TX, USA) and resolved in an ABI 3130XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems®, Austin, TX, USA). Sequences were edited using Sequencher 4.7 (Gene Codes Corp., Ann Arbor, MI, USA).

### Determining genotypic resistance, antiretroviral susceptibility and genotypic susceptibility score (GSS)

The mutations associated with resistance to InSTI were analysed according to the Stanford University HIV Drug Resistance Database algorithm (<http://hivdb.stanford.edu/index.html>) and the International Antiviral Society–USA (IAS–USA) resistance list.<sup>11</sup> The susceptibility to integrase inhibitors was determined according to the Stanford University HIV Drug Resistance Database algorithm and the five interpretations generated were dichotomized in our analyses as: (i) no resistance, for those with susceptible, potential low-level resistance or low-level resistance prediction; and (ii) resistance, for those with intermediate or high resistance prediction. The GSS of the optimized background therapy (OBT) was calculated

at the beginning of the raltegravir-containing regimen (GSS1) from previous genotyping tests, and from a subsequent genotypic test of the same sample used to determine raltegravir resistance, collected during salvage therapy failure (GSS2). The OBT GSS was the sum of each individual drug. Activity was predicted according to the Stanford University HIV Drug Resistance Database algorithm; GSS scores were defined as: susceptible or potential low-level resistance=1; low-level resistance=0.50; and intermediate resistance or high resistance=0. Raltegravir susceptibility was not included in the calculation of the GSS.

### Statistical analysis

Data were analysed using STATA statistical software version 13.0 (StataCorp LP, College Station, TX, USA) and GraphPad software (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA), using a level of statistical significance of 0.05.

### Ethical approval

This study was approved by the Ethical and Research Committees of the Adolfo Lutz Institute, Secretary of Health of São Paulo, Brazil and

**Table 1.** Demographic, clinical and laboratory data from patients included in the study

Variable	Total patients (n=92)	DTG susceptible (n=60)	DTG resistant (n=32)	P
Age (years), median (IQR)	44 (23–50)	44 (23–50)	44 (28–49)	0.982
Male, n (%)	62 (67)	41 (68)	21 (66)	0.792
Nadir CD4 count (cells/mm <sup>3</sup> ), median (IQR)	51 (13–143)	63 (21–143)	20 (11–141)	0.140
CD4 cell count (cells/mm <sup>3</sup> ), median (IQR)				
at RAL initiation	181 (49–451)	150 (42–465)	229 (55–449)	0.925
at weeks 12–24 of RAL	314 (126–515)	282 (118–498)	316 (83–445)	0.544
at sample collection	221 (89–448)	241 (111–435)	198 (31–448)	0.359
HIV RNA level (log <sub>10</sub> ), median (IQR)				
at RAL initiation	4.44 (3.72–4.82)	4.41 (3.61–4.77)	4.47 (4.09–4.84)	0.420
at weeks 12–24 of RAL	3.04 (1.70–4.21)	2.71 (1.70–4.07)	3.83 (1.92–4.27)	0.120
at sample collection	3.99 (3.21–4.58)	3.82 (3.18–5.54)	4.36 (3.63–7.84)	<b>0.011</b>
Delta viral load	–1.07 (–0.66 to –1.88)	–1.31 (–0.75 to –2.15)	–0.89 (–0.31 to –1.53)	<b>0.033</b>
RAL exposure (weeks)	115 (70–161)	114 (62–155)	122 (75–171)	0.794
Time of viraemia (weeks)	75 (33–132)	71 (29–139)	77 (52–179)	0.655
Number of regimens	7 (7–9)	7 (6–9)	6 (4–8)	0.279
GSS1, n (%)				
<2 drugs	38 (79)	24 (77)	14 (82)	0.923
≥2 drugs	10 (21)	7 (23)	3 (18)	
GSS2, n (%)				
<2 drugs	50 (81)	30 (71)	20 (100)	0.391
≥2 drugs	12 (19)	12 (29)	0 (0)	

RAL, raltegravir; DTG, dolutegravir.

Patients were grouped according to predicted susceptibility to dolutegravir as resistance (intermediate or high resistance) or susceptible (low or no resistance) according to the Stanford University HIV Drug Resistance Database algorithm (<http://hivdb.stanford.edu/index.html>).

Delta viral load is the difference between the highest documented viral load for each patient minus the viral load at genotyping.

GSS corresponds to the sum of the predicted activity of each individual antiretroviral drug used in the salvage therapy excluding raltegravir (OBT). Activity was predicted according to the Stanford University HIV Drug Resistance Database algorithm; GSS scores were defined as: susceptible or potential low-level resistance=1; low-level resistance=0.50; and intermediate resistance or high resistance=0. GSS1 is the OBT GSS at the time of initiation of the raltegravir-containing regimen and GSS2 is the OBT GSS at the time of genotyping.

Values highlighted in bold indicate  $P < 0.05$ .



participating institutions. All patients signed a written informed consent form at participating clinical sites.

## Results and discussion

Among the integrase sequences obtained from 92 patients, 32 (35%) showed an important loss of dolutegravir susceptibility (27 with intermediate resistance and 5 with high-level resistance). All patients had advanced disease, with a low CD4 and with most starting raltegravir-containing salvage therapy with a low optimized background genotypic score, after a median of seven previous regimens (Table 1). Cases with dolutegravir resistance tended to have a decrease in CD4 after initial gain. Moreover, patients with resistance to dolutegravir, as compared with those without resistance, had a higher viral load at the time of collection for genotypic testing ( $P=0.011$ ). At genotyping, patients with resistance had viral load values closer to the highest previously documented viral load than those with no resistance (delta viral load of  $-0.89$  versus  $-1.31$ ,  $P=0.033$ ), suggesting some recovery of replicative fitness. Moreover, although not statistically significant, patients with viraemia higher than 1000 copies/mL between 12 and 24 weeks after initiation of treatment with raltegravir tended to show resistance to dolutegravir ( $P=0.072$ ). The time of virological failure correlates with the number of mutations (Spearman correlation  $r=0.57$ ,  $P=0.0036$ ); it was observed in both resistance and susceptible cases and, although longer for those with dolutegravir resistance, the difference from those who were susceptible is not significant. All patients with resistance to dolutegravir had amino acid substitution at position 148 (glutamine to histidine, arginine or lysine). It was almost invariably accompanied by G140S/A, present in 94% (30/32) of cases. Samples from patients who had G140S/A associated with Q148H/R/K had a higher average viral load at the time of genotyping for integrase compared with those without these two mutations ( $4.26 \log_{10}$  versus  $3.73 \log_{10}$ ;  $P=0.012$ ). The mutation G140S/A generally emerges when Q148H/R/K is selected, and its presence has been related to improved viral fitness,<sup>12</sup> which may explain this increase in viral load. We also observed the accessory mutations L74I in 16% (5/32) and E138K/A in 19% (6/32) of these patients. The mutation F121Y was found in a single previously reported case<sup>13</sup> and G118R was not observed. These mutations have been associated *in vitro* with cross-resistance to all InSTI.<sup>14</sup> A strong association was observed between the presence of mutations G140S/A ( $P<0.001$ ) and E138A/K ( $P<0.001$ ) and dolutegravir resistance. Accordingly, our study found that the number of secondary mutations is associated with a worse predicted response to dolutegravir ( $P=0.006$ ), a prediction that is supported by the clinical observations in the VIKING-3 study, which showed a worse response for patients with two or more resistance-associated mutations, such as G140S/A, L74I and E138A/K.<sup>5</sup> Saladini *et al.*<sup>15</sup> documented the presence of variants G140S/Q148H in the integrase sequences obtained from patients using a raltegravir-containing regimen, although at a lower rate (17.5%) than found in this study. Our study documents that an important proportion of patients failing a raltegravir-containing regimen in public services in São Paulo, Brazil, have intermediate or high resistance to dolutegravir. Changes in viraemia during virological failure may indicate the evolution of raltegravir resistance and may predict the emergence of secondary mutations that are associated with a decrease in dolutegravir susceptibility. As

treatment options for patients with advanced disease are very limited, it is conceivable that prompt discontinuation of raltegravir upon identification of virological failure may favour salvage therapy with dolutegravir, but proper clinical studies are necessary to address this issue.

## Funding

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (grant 2011/21958-2); J. d. S. C. was supported by a student scholarship from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) (D06/12).

## Transparency declarations

None to declare.

## References

- Raffi F, Rachlis A, Stellbrink H *et al.* Once-daily dolutegravir versus raltegravir in antiretroviral-naïve adults with HIV-1 infection: 48 week results from the randomised, double-blind, non-inferiority SPRING-2 study. *Lancet* 2013; **381**: 735–43.
- Walmsley SL, Antela A, Clumeck N *et al.* Dolutegravir plus abacavir-lamivudine for the treatment of HIV-1 infection. *New Engl J Med* 2013; **369**: 1807–18.
- Clotet B, Feinberg J, van Lunzen J *et al.* Once-daily dolutegravir versus darunavir plus ritonavir in antiretroviral-naïve adults with HIV-1 infection (FLAMINGO): 48 week results from the randomised open-label phase 3b study. *Lancet* 2014; **383**: 2222–31.
- Cahn P, Pozniak AL, Mingrone H *et al.* Dolutegravir versus raltegravir in antiretroviral-experienced, integrase-inhibitor-naïve adults with HIV: week 48 results from the randomised, double-blind, non-inferiority SAILING study. *Lancet* 2013; **382**: 700–8.
- Castagna A, Maggiolo F, Penco G *et al.* Dolutegravir in antiretroviral-experienced patients with raltegravir- and/or elvitegravir-resistant HIV-1: 24-week results of the phase III VIKING-3 study. *J Infect Dis* 2014; **210**: 354–62.
- Kobayashi M, Yoshinaga T, Seki T *et al.* In vitro antiretroviral properties of S/GSK1349572, a next-generation HIV integrase inhibitor. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; **55**: 813–21.
- Seki T, Kobayashi M, Wakasa-Morimoto C *et al.* S/GSK1349572 is a potent next generation HIV integrase inhibitor and demonstrates a superior resistance profile substantiated with 60 integrase mutant molecular clones. In: *Abstracts of the Seventeenth Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, San Francisco, CA, 2010*. Abstract 555. Foundation for Retrovirology and Human Health, Alexandria, VA, USA.
- Quashie PK, Mesplède T, Han YS *et al.* Characterization of the R263K mutation in HIV-1 integrase that confers low-level resistance to the second-generation integrase strand transfer inhibitor dolutegravir. *J Virol* 2012; **86**: 2696–705.
- de Souza Cavalcanti J, de Paula Ferreira JL, Vidal JE *et al.* HIV-1-infected patients with advanced disease failing a raltegravir-containing salvage regimen in São Paulo, Brazil. *Int J Antimicrob Agents* 2014; **43**: 287–91.
- Marcelin AG, Delaugerre C, Beaudoux C *et al.* A cohort study of treatment-experienced HIV-1-infected patients treated with raltegravir: factors associated with virological response and mutations selected at failure. *Int J Antimicrob Agents* 2013; **42**: 42–7.
- Wensing AM, Calvez V, Günthard HF *et al.* 2014 update of the drug resistance mutations in HIV-1. *Top Antivir Med* 2014; **22**: 642–50.

**12** Delelis O, Malet I, Na L *et al.* The G140S mutation in HIV integrases from raltegravir-resistant patients rescues catalytic defect due to the resistance Q148H mutation. *Nucl Acids Res* 2009; **37**: 1193–201.

**13** Souza Cavalcanti J, Minhoto Lança A, de Paula Ferreira JL *et al.* *In-vivo* selection of the mutation F121Y in a patient failing raltegravir containing salvage regimen. *Antiviral Res* 2012; **95**: 9–11.

**14** Malet I, Gimferrer Arriaga L, Artese A *et al.* New raltegravir resistance pathways induce broad cross-resistance to all currently used integrase inhibitors. *J Antimicrob Chemother* 2014; **69**: 2118–22.

**15** Saladini F, Meini G, Bianco C *et al.* Prevalence of HIV-1 integrase mutations related to resistance to dolutegravir in raltegravir naïve and pretreated patients. *Clin Microbiol Infect* 2012; **18**: E428–30.